การสกัดและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากข้าวฟ่าง

นางสาวเกษมศรี พงษ์เสรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-3157-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EXTRACTION AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF PROTEINS FROM SORGHUM

Miss Kasemsri Pongseree

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Food Technology

Department of Food Technology
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-3157-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสกัดและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากข้าวฟ่าง
โดย	นางสาวเกษมศรี พงษ์เสรี
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.กัลยา เลาหสงคราม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.สายวรุฬ ชัยวานิชศิริ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.กัลยา เลาหสงคราม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.สายวรุฬ ชัยวานิชศิริ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ตุลยธัญ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เกษมศรี พงษ์เสรี : การสกัดและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากข้าวฟ่าง (EXTRACTION AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF PROTEINS FROM SORGHUM) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. กัลยา เลาหสงคราม, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. สายวรุฬ ชัยวานิชศิริ, 95 หน้า. ISBN 974- 17-3157-4.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการสกัดและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากข้าวฟ่างไทยเพื่อเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหาร พบว่า เมล็ดข้าวฟ่างมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 7.95% โดยน้ำหนักแห้ง แป้งข้าวฟ่างจากการโม่เปียกจะมีปริมาณไขมัน เส้นใย และโปรตีนต่ำกว่าแป้งจากการโม่แห้ง จากสกัดโปรตีนจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ pH 9.0-11.5 และตกตะกอนที่ pH 3.5-4.5 พบว่า เมื่อเพิ่ม pH ในการสกัด ค่าผลผลิตของโปรตีน (% yield) สูงขึ้น โดยแป้งโม่เปียกและโม่แห้งที่ pH 11.5 และตกตะกอนที่ pH 4.0 ให้ % yield สูงที่สุด ($p \leq 0.05$) คือ เท่ากับ 3.40 และ 3.29 % ตามลำดับ แป้งโม่เปียกมี % yield สูงกว่าแป้งโม่แห้งอย่างมีนัยสำคัญในทุกภาวะการสกัด ($p \leq 0.05$) โปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งมีขนาดโมเลกุลหลักเท่ากับ 20, 23, 37, 53 และ 66 kDa ส่วนการสกัดโปรตีนด้วยเอทานอล 95% ที่อัตราส่วนแป้งต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:3-1:7 พบว่า แป้งโม่แห้งมี % yield สูงกว่าแป้งโม่เปียกในทุกอัตราส่วน และที่อัตราส่วนแป้งต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:4 ให้ % yield สูงที่สุด ($p \leq 0.05$) โดยแป้งโม่เปียกและโม่แห้งมี % yield เท่ากับ 1.38 และ 1.78 % ตามลำดับ และขนาดโมเลกุลหลักของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์จากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งเท่ากับ 23 kDa จากการศึกษาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบพบว่า ข้าวฟ่าง แป้งโม่เปียกและโม่แห้งมีสัดส่วนของกรดอะมิโนแต่ละชนิดใกล้เคียงกัน โปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างมีปริมาณกรดอะมิโนที่ชอบน้ำสูงกว่าโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ โดยโปรตีนจากแป้งโม่เปียกมีกรดอะมิโนที่ชอบน้ำสูงกว่าโปรตีนจากแป้งโม่แห้ง เมื่อศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่สกัดได้ พบว่า โปรตีนจากแป้งโม่แห้งที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ pH 9.0 และตกตะกอนที่ pH 4.5 มีความสามารถในการจับน้ำ (WHC) ความสามารถในการจับน้ำมัน (OHC) และ Emulsifying activity index (EAI) สูงกว่าโปรตีนที่สกัดที่ภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โปรตีนจากแป้งโม่แห้งที่สกัดที่ pH 10.0 และตกตะกอนที่ pH 4.0 มีความสามารถในการเกิดฟอง (FC) สูงสุด โปรตีนจากแป้งโม่เปียกที่สกัดที่ pH 9.0 และตกตะกอนที่ pH 3.5 มีความคงตัวของอิมัลชัน (ESI) สูงสุด ขณะที่โปรตีนที่ตกตะกอนที่ pH 4.0 มีความคงตัวของฟอง (FS) สูงสุด ($p \leq 0.05$) ส่วนโปรตีนจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ที่อัตราส่วน 1:4 มี WHC, OHC, EAI และ ESI สูงกว่าโปรตีนที่สกัดที่อัตราส่วนอื่น ($p \leq 0.05$) และโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ไม่มีสมบัติในการเกิดฟอง จากการวัดลักษณะเนื้อสัมผัสและประเมินความชอบโดยรวมของตัวอย่างเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์ที่เติมโปรตีนสกัดจากแป้งโม่แห้งด้วยสารละลายด่างที่สกัดที่ pH 11.5 และตกตะกอนที่ pH 4.5 (APD) โปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่อัตราส่วนแป้งต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:4 (SPD) โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง (SPI) และตัวอย่างที่ไม่ได้เติมโปรตีน (R) พบว่า ตัวอย่าง SPD มีความแข็ง ความยืดหยุ่น และการเกาะตัวกันสูงที่สุด โดยตัวอย่างที่เติม SPI ได้คะแนนความชอบโดยรวมสูงที่สุด

ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร	ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา	2545	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4272206123 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY
KEY WORD : EXTRACTION / FUNCTIONAL PROPERTIES / MILLING / PROTEIN / SORGHUM

KASEMSRI PONGSEREE : EXTRACTION AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF PROTEINS FROM SORGHUM. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF. KALAYA LAOHASONGKRAM, Ph. D., THESIS COADVISOR : ASSOC.PROF. SAIWARUN CHAIWANICHSIRI, Ph. D., 95 pp. ISBN 974-17-3157-4.

This research was aimed to study the extraction and functional properties of protein from Thai sorghum, KU 439, for using as food ingredient. Grain sorghum containing 7.95% protein (dry basis) was milled by wet and dry methods and the flour was defatted using hexane. It was found that the dry-milled flour contained higher fat, fiber and protein contents than the wet-milled flour. For extraction of protein at pH 9.0-11.5 using NaOH and precipitation at pH 3.5-4.5, it was found that the % yield of protein increased as the extraction pH increased. The highest yield of 3.40% and 3.29% were obtained from the wet- and dry-milled flours extracted at pH 11.5 and precipitated at pH 4.0. The % yield from the wet-milled flour was significantly higher than the dry-milled flour in all extraction conditions ($p \leq 0.05$). The molecular weights of the extracted protein were 20, 23, 37, 53 and 66 kDa. For extraction of protein using 95% ethanol at the ratio of 1:3 to 1:7 (flour to alcohol), the dry-milled flour gave a higher yield than the wet-milled flour. The highest yields of 1.38 and 1.78% were obtained from the wet and dry-milled flours extracted at 1:4 ratio. The molecular weight of the extracted protein was 23 kDa. From the amino acid analysis, the grain sorghum and the dry- and wet-milled flours had the similar proportion of amino acids. The alkaline-extracted proteins and the wet-milled flour showed to have more hydrophilic amino acids than those of the alcohol-extracted protein and the dry-milled flour. For the alkaline-extracted protein, the highest water-holding capacity (WHC), oil-holding capacity (OHC) and emulsifying activity index (EAI) were obtained from the dry-milled flour (APD) extracted at pH 9.0 and precipitated at pH 4.5, while the highest foaming capacity (FC) was from the APD extracted at pH 10.0 and precipitated at pH 4.0, emulsion stability index (ESI) and foam stability (FS) were from the wet-milled flour (APW) extracted at pH 9.0 and precipitated at pH 3.5 and 4.0, respectively. For the alcohol-extracted protein, the highest WHC, OHC, EAI and ESI were obtained from the dry- and wet-milled flours (SPD and SPW) extracted at the ratio of 1:4. Both SPD and SPW showed no FC. From the texture measurement and preference test of the fish fingers containing 3% of the APD extracted at pH 11.5 and precipitated at pH 4.0, SPD extracted at 1:4 ratio, soy protein isolate (SPI) and the control, it was found that the samples containing SPD had the highest hardness, springiness and cohesiveness, while those containing SPI had the highest preference score.

Department	Food Technology	Student's signature……
Field of study	Food Technology	Advisor's signature……..
Academic year	2002	Co-Advisor's signature……

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความเมตตาของ รองศาสตราจารย์ ดร.กัลยา เลาหสงคราม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.สายวรุฬ ชัยวานิชศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และแนวทางในการแก้ไข ปรับปรุงแก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาที่ดำเนินการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ตุลยธัญ และอาจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์ ที่ร่วมเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งกรุณาชี้แนะแนวทางในการปรับปรุงวิทยาพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณผู้จัดการบริษัท สตรองแพค จำกัด (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์ถุงเพื่อใช้ในการเก็บตัวอย่าง

ขอขอบคุณคุณศรายุทธ โพธิ์โน ที่ได้คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจผู้วิจัยตลอดระยะเวลาที่ทำงานวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย และทุนอุดหนุนและส่งเสริมงานวิจัยระดับปริญญาโท-เอกในสถาบันอุดมศึกษาของรัฐ จากทบวงมหาวิทยาลัย

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา น้องชาย และญาติพี่น้อง ที่ได้ส่งเสริมและให้กำลังใจพร้อมความห่วงใยจนผู้วิจัยทำงานด้วยความก้าวหน้าตลอดมา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร และทุกท่านที่ได้ความช่วยเหลือ สนับสนุนในการทำวิจัย และให้กำลังใจผู้วิจัยตลอดมา

เกษมศรี พงษ์เสรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย……	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……..	จ
กิตติกรรมประกาศ……	ฉ
สารบัญ……..	ช
สารบัญตาราง……	ฌ
สารบัญรูป……..	ญ
บทที่	
1 บทนำ……..	1
2 วารสารปริทัศน์……...	2
2.1 ข้าวฟ่าง…….	2
2.2 โปรตีน……	3
2.3 โปรตีนในธัญชาติ……..	5
2.4 สมบัติเชิงหน้าที่ด้านต่างๆที่สำคัญของโปรตีน…….	8
2.5 การสกัดและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากธัญชาติ……..	10
2.6 การใช้ประโยชน์จากธัญชาติในผลิตภัณฑ์อาหาร……	14
3 ขั้นตอนการทดลอง……	16
3.1 การเตรียมวัตถุดิบ…….	16
3.2 การสกัดโปรตีน…….	16
3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน และการวัดสมบัติเชิงหน้าที่……	17
3.4 การใช้โปรตีนในผลิตภัณฑ์อาหาร……...	18
4 ผลการทดลองและวิจารณ์……...	19
4.1 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ……...	19
4.2 การสกัดโปรตีน……	21
4.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน……..	30
4.4 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน……...	34
4.5 การวัดสมบัติเชิงหน้าที่……	37

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.6 การใช้โปรตีนในผลิตภัณฑ์อาหาร..... 55

5 สรุปและข้อเสนอแนะ..... 58

รายการอ้างอิง..... 60

ภาคผนวก..... 66

ภาคผนวก ก..... 67

ภาคผนวก ข..... 72

ภาคผนวก ค..... 74

ภาคผนวก ง..... 82

ภาคผนวก จ..... 84

ภาคผนวก ฉ..... 85

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 95

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน (%) ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนส่วนต่างๆ ของเมล็ดข้าวฟ่าง……7
4.1 องค์ประกอบทางเคมีของข้าวฟ่าง แป้งที่ได้การโม่แห้ง แป้งที่ได้จากการโม่เปียก แป้งที่ได้จากการโม่แห้งและผ่านการสกัดไขมัน และแป้งที่ได้จากการโม่เปียก และผ่านการสกัดไขมัน……..……..20
4.2 ปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ……..…22
4.3 % Yield ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ……..…..24
4.4 % Protein recovery ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ…..……..…..25
4.5 ปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนต่างๆ…26
4.6 % Yield ของโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนต่างๆ……...28
4.7 % Protein recovery ของโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนต่างๆ…29
4.8 ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในข้าวฟ่าง แป้ง และโปรตีนสกัด……35
4.9 ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในโปรตีนจากข้าวสาลี……...36
4.10 ค่า WHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ……...38
4.11 ค่า WHC ของโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนต่างๆ……40
4.12 ค่า OHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ……..……42
4.13 ค่า OHC ของโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนต่างๆ……..43
4.14 ค่า EAI ของโปรตีนที่สกัดได้ด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ……45
4.15 ค่า ESI ของโปรตีนที่สกัดได้ด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ……..……47
4.16 ค่า EAI ของโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนต่างๆ……48
4.17 ค่า ESI ของโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนต่างๆ……50
4.18 ค่า FC ของโปรตีนที่สกัดได้ด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ……..52
4.19 ค่า FS ของโปรตีนที่สกัดได้ด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ…..……54
4.20 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสในด้านความแตกต่างของเนื้อสัมผัสของเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์……..56
4.21 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสในด้านความชอบโดยรวมของเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์..56
4.22 ค่าความแข็ง ความยืดหยุ่น และการเกาะตัวกันของเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์ทั้ง 4 สูตร…..57

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 โครงสร้างและชนิดของกรดอะมิโนทั้ง 21 ชนิด……4

2.2 ภาพตัดขวางของเมล็ดข้าวฟ่าง ……6

4.1 ปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ……22

4.2 % yield ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ……24

4.3 % protein recovery ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ……25

4.4 ปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่อัตราส่วนต่างๆ ……27

4.5 % yield ของโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่อัตราส่วนต่างๆ……29

4.6 % protein recovery ของโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่อัตราส่วนต่างๆ….29

4.7 SDS-PAGE pattern ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งและโม่เปียกด้วยแอลกอฮอล์ ที่อัตราส่วนแป้งต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ1:3, 1:4, 1:5,1:6 และ 1:7……31

4.8 SDS-PAGE pattern ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งด้วยสารละลายด่างที่ pH 9, 10, 11 และ11.5 และตกตะกอนที่ pH 3.5, 4.0 และ 4.5 ตามลำดับ……32

4.9 SDS-PAGE pattern ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกด้วยสารละลายด่างที่ pH9, 10, 11และ 11.5 และตกตะกอนที่ pH 3.5, 4.0 และ 4.5 ตามลำดับ……33

4.10 ค่า WHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ……39

4.11 ค่า WHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่อัตราส่วนต่างๆ……40

4.12 ค่า OHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ……42

4.13 ค่า OHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่อัตราส่วนต่างๆ……44

4.14 ค่า EAI ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ……46

4.15 ค่า ESI ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ……47

4.16 ค่า EAI ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่อัตราส่วนต่างๆ……49

4.17 ค่า ESI ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่อัตราส่วนต่างๆ……50

4.18 ค่า FC ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ……52

4.19 ค่า FS ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ……54

บทที่ 1

บทนำ

ข้าวฟ่างเป็นพืชที่ปลูกมากในประเทศไทยโดยเฉพาะในแถบภาคเหนือและบางจังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง ข้าวฟ่างประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 75% โปรตีน 8-12% และน้ำมัน 3-4% (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2540) จึงอาจจัดได้ว่าข้าวฟ่างเป็นแหล่งที่ดีของคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน แต่เนื่องจากประเทศไทยบริโภคข้าวเป็นอาหารหลักและเมล็ดข้าวฟ่างมีความแข็งมากเมื่อเทียบกับเมล็ดข้าวจึงทำให้คนไทยไม่นิยมนำข้าวฟ่างมาใช้บริโภค ดังนั้นการปลูกข้าวฟ่างในปัจจุบัน ส่วนใหญ่จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เลี้ยงสัตว์และส่งออกเป็นอาหารสัตว์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าประเทศไทยยังมีการใช้ประโยชน์จากข้าวฟ่างน้อยมาก และเมื่อพิจารณาโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ พบว่า โปรตีนในข้าวฟ่างประกอบไปด้วยโปรตีนหลัก 4 ชนิด ได้แก่ อัลบูมิน (albumin) 1-8% โกลบูลิน (globulin) 2-9% คาเฟอริน (kafirin) 32-59% และกลูเตลิน (glutelin) 19-37% (Virupaksha and Sastry, 1968) โดยสัดส่วนของโปรตีนแต่ละชนิดในข้าวฟ่างคล้ายคลึงกับสัดส่วนของโปรตีนแต่ละชนิดที่มีในข้าวสาลีซึ่งจัดเป็นธัญชาติโปรตีนสูง ดังนั้นโปรตีนจากข้าวฟ่างที่สกัดด้วยสารละลายด่าง น่าจะมีสมบัติเชิงหน้าที่ที่ใกล้เคียงกับโปรตีนจากข้าวสาลี นอกจากนี้ข้าวฟ่างยังเป็นแหล่งของวัตถุดิบที่มีราคาถูก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสกัดและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากข้าวฟ่างเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเป็นส่วนประกอบ (ingredient) ที่ใช้เติมในอาหารเพื่อประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น เป็นตัวดูดซับน้ำในอาหาร (water-absorbing agent) เป็นสารช่วยให้เกิดฟอง (foaming agent) หรือเป็นตัวช่วยให้เกิดอิมัลชันในอาหาร (emulsifier) รวมทั้งเป็นการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับผลิตภัณฑ์อาหาร นอกจากนี้ยังเพิ่มการใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบที่มีในประเทศให้มากขึ้น ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะเป็นแนวทางในการขยายผลสู่อุตสาหกรรมระดับประเทศต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 ข้าวฟ่าง (Sorghum)

ข้าวฟ่างเป็นพืชหลักตระกูลหญ้าในวงศ์ Gramineae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์โดยรวมว่า *Sorghum vulgare* มีลักษณะ คือ เมล็ดกลมรีติดกันเป็นช่อ มีความแข็ง สีและลักษณะเมล็ดจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ เมื่อพิจารณาความแตกต่างของรวงและลักษณะปรากฏภายนอก สามารถแบ่งได้เป็น 4 ชนิด (Martin, 1970) คือ

2.1.1 **ข้าวฟ่างที่ใช้เมล็ด (Grain sorghum)** kernel มีขนาดใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวฟ่างชนิดอื่นๆ ลำต้นไม่มีความหวาน หรืออาจจะหวานเล็กน้อย เมล็ดใช้เป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของมนุษย์โดยเฉพาะในแถบอเมริกา อัฟริกา อเมริกาใต้ และเอเชีย ข้าวฟ่างชนิดนี้ใช้เป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตเป็นเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ โดยทั่วไปเมล็ดมีทั้งสีขาว เหลือง แดง และสีชมพู นอกจากนี้ยังมีเมล็ดที่มีสีน้ำตาลเนื่องจากมีสารแทนนิน (tannin) เป็นองค์ประกอบและจะมีความขมกว่าเมล็ดสีอื่นๆ ซึ่งเมล็ดสีน้ำตาลมีทั้งพันธุ์ที่นิยมใช้ในการผลิตเหล้า ที่เรียกว่า เกาเหลียง (kaoliangs) พันธุ์ที่ใช้เป็นอาหารนก และพันธุ์ที่ประเทศอัฟริกานิยมใช้ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (brewing) (Martin, 1970) Hubbard, Hall และ Earle (1950) ได้หาองค์ประกอบในข้าวฟ่างที่ใช้เมล็ด พบว่า ในน้ำหนักแห้ง100 กรัม ประกอบไปด้วย โปรตีน 12.4 % ไขมัน 3.6% เส้นใยอาหารหยาบ 2.7% เกลือแร่ 1.7% และคาร์โบไฮเดรตชนิดละลายน้ำได้ 79.7% Virupaksha และ Sastry (1968) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในข้าวฟ่างที่ใช้เมล็ดพบว่ามีปริมาณ 10-19% โดยน้ำหนักแห้ง ส่วนข้าวฟ่างที่ใช้เมล็ดที่ปลูกในประเทศไทยจะมีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 8-12% (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2540)

2.1.2 **ข้าวฟ่างหวาน (Sorgos หรือ Sweet sorghum)** kernel มีขนาดเล็กกว่าเมล็ดข้าวฟ่างทั่วๆไป ลำต้นสูง และมีความหวาน เนื่องจากในลำต้นมีน้ำตาลถึง 20° Brix จึงใช้ในการผลิตน้ำตาล (Martin, 1970)

2.1.3 **ข้าวฟ่างไม้กวาด (Broomcorns)** kernel มีขนาดเล็กเช่นเดียวกับข้าวฟ่างหวาน แต่ลำต้นจะแห้งและไม่มีความหวาน เปลือกแข็ง ใช้ในการผลิตไม้กวาด (Martin, 1970)

2.1.4 **ข้าวฟ่างหญ้า (Glass sorghums)** ลำต้นเล็กสูง เมล็ดเล็กเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวฟ่างที่ใช้เมล็ดและข้าวฟ่างหวาน ใช้ทั้งลำต้นและเมล็ดในการเลี้ยงสัตว์ (Martin, 1970)

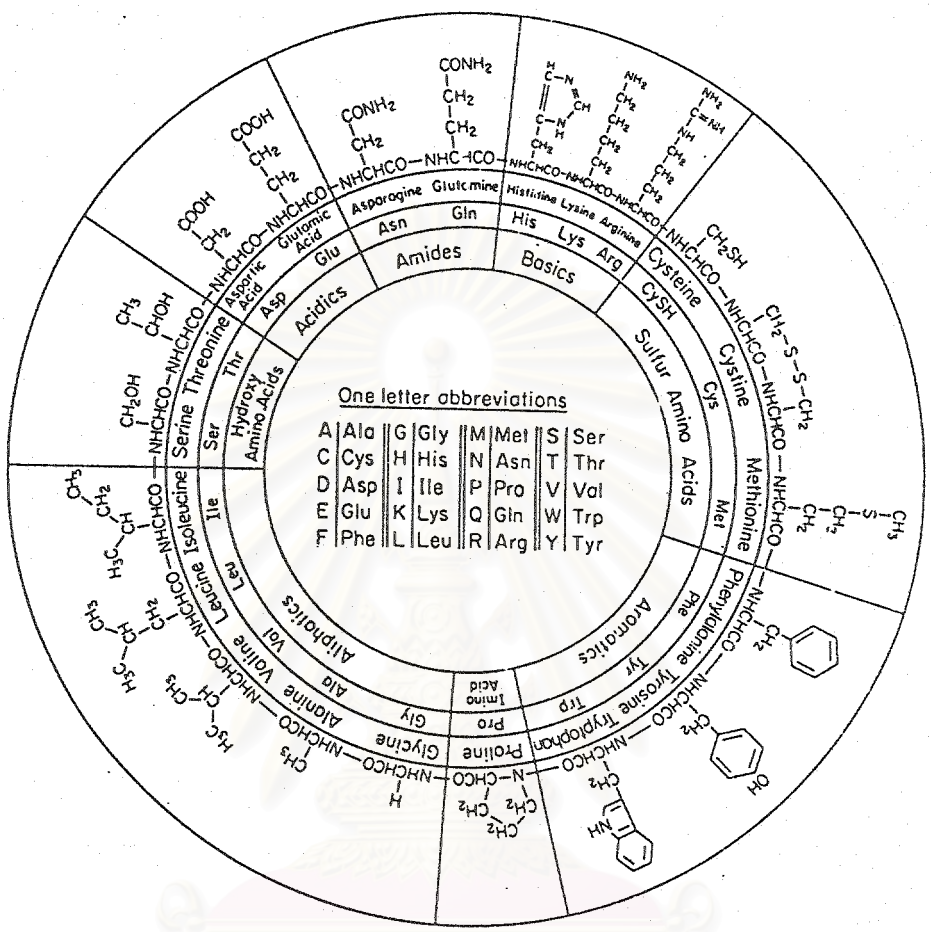
ข้าวฟ่างในประเทศไทยที่มีการปลูกมาก คือ ข้าวฟ่างที่ใช้เมล็ด ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ ข้าวฟ่างพันธุ์แท้ และ ข้าวฟ่างพันธุ์ลูกผสม ซึ่งข้าวฟ่างพันธุ์แท้ที่มีคุณภาพดีและนิยมปลูก สามารถนำมาบริโภคได้แก่ พันธุ์ KU 439 ซึ่งเมล็ดมีสีขาว และพันธุ์ KU 630 ซึ่งเมล็ดมีสีแดง เนื่องจากมีแคโรทีนในเมล็ดสูงกว่า โดยข้าวฟ่างทั้งสองพันธุ์เป็นข้าวฟ่างที่มีระดับสารแทนนินต่ำ คือ น้อยกว่า 0.16 % (ศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ, 2538)

2.2 **โปรตีน** (Protein)

โปรตีนเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ที่มีความซับซ้อน โปรตีนเกิดจากกรดอะมิโนทั้ง 21 ชนิด มาเรียงต่อกันเป็นสายโดยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ (peptide bond) เนื่องจากความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนที่มาเรียงต่อกัน จึงทำให้โปรตีนที่เกิดขึ้นมีความหลากหลาย ความแตกต่างของโปรตีนอาจจะเป็นความแตกต่างในด้านสมบัติทางเคมีและด้านโครงสร้าง เช่น โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) และโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) (รูปที่ 2.1) การจัดกลุ่มของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ จะดูจากลักษณะของสายโซ่ (side chain) ซึ่งจะมีทั้งมีขั้ว (polar) และไม่มีขั้ว (non-polar) และการแบ่งกลุ่มของกรดอะมิโนนั้นจะแบ่งตามสมบัติทางเคมีของสายโซ่ (Krull and Wall, 1969) โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีขั้วในระดับที่สูงจะสามารถละลายน้ำได้ (water soluble) กรดอะมิโนที่มีความเป็นกรดหรือเป็นด่างจัดอยู่ในกลุ่มของกรดอะมิโนที่มีความเป็นขั้วสูงที่สุด ซึ่งกรดอะมิโนกลุ่มนี้จะมีอยู่ในโปรตีนจำพวกอัลบูมินและโกลบูลิน ในทางตรงกันข้าม โปรตีนจากข้าวสาลี คือ ไกลอะดินและกลูเตนินจะมีกรดอะมิโนที่มีขั้วในระดับต่ำจึงละลายในน้ำไม่ดีนัก กรดอะมิโนที่อยู่ในรูปของเอไมด์ (amide) เช่น กลูตามีนและแอสพาราจีน ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้จะเพิ่มปริมาณไนโตรเจนในโปรตีน ส่วนกลุ่มที่มีหมู่ไฮดรอกซิลจะสามารถเกิดพันธะเอสเทอร์กับกรดฟอสฟอริก กรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบนั้นสามารถเกิดพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างสายเปปไทด์ข้างเคียง หรือระหว่างส่วนต่างๆในสายเปปไทด์เดียวกัน (DeMan, 1976)

โปรตีนพบทั้งในสัตว์และในพืช เนื่องจากโปรตีนประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 21 ชนิด แต่มีเพียง 9 ชนิดที่เป็นกรดอะมิโนจำเป็น ได้แก่ ไลซีน เมไธโอนีน ธรีโอนีน วาลีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน ฟีนิลอลานีน ฮีสทีดีน และทริปโตเฟน โดยทั่วไปโปรตีนจากสัตว์จะมีคุณค่าทางอาหารสูงกว่าโปรตีนจากพืช เนื่องจากโปรตีนพืชหลายชนิดยังขาดกรดอะมิโนจำเป็น โปรตีนจากไข่จัดเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพดีที่สุด และใช้เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบคุณภาพของโปรตีน โปรตีนจากธัญชาติมักขาดไลซีน (Kent, 1983) ส่วนโปรตีนจากถั่วเหลืองจะมีไลซีนอยู่สูงแต่จะขาดเมไธโอนีนหรือมีในปริมาณต่ำ โปรตีนจากเมล็ดฝ้าย (cotton seed) จะขาดไลซีน และโปรตีนจากถั่วลิสง

จะขาดเมไธโอนีนและไลซีน ในมันฝรั่งถึงแม้จะมีปริมาณโปรตีนเพียงเล็กน้อยแต่โปรตีนที่พบมีคุณภาพสูงเทียบเท่ากับโปรตีนจากไข่ทั้งฟอง (DeMan, 1976)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างและชนิดของกรดอะมิโนทั้ง 21 ชนิด

ที่มา : Light (1974)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 โปรตีนในธัญชาติ (Cereal Proteins)

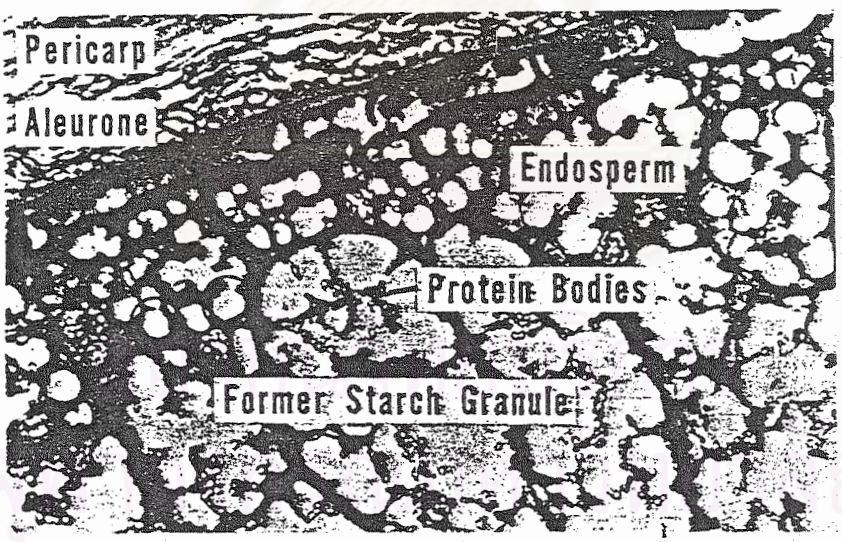
โปรตีนในข้าวฟ่างและธัญชาติอื่นๆ สามารถจำแนกได้เป็น 4 ชนิด ตามความสามารถในการละลาย คือ อัลบูมินเป็นโปรตีนที่ละลายได้ในน้ำ โกลบูลินเป็นโปรตีนที่ละลายได้ในสารละลายน้ำเกลือเจือจาง (5% NaCl) โพรลามินเป็นโปรตีนที่ละลายได้ในแอลกอฮอล์ และกลูเตนินเป็นโปรตีนที่ละลายได้ในสารละลายกรดหรือด่างเจือจาง (Wall and Blessin, 1970) ซึ่งโปรตีนในข้าวฟ่างประกอบด้วยอัลบูมิน 1-8% โกลบูลิน 2-9% โพรลามิน 32-59% และกลูเตนิน 19-37% (Virupaksha and Sastry, 1968) โดยโพรลามินที่พบในข้าวฟ่างจะเรียกว่า คาเฟอริน (kafirins) (Wall and Blessin, 1970)

อัลบูมินและโกลบูลินจะอยู่รวมกันที่เนื้อส่วนนอก (external portion) ของเมล็ดข้าวฟ่างบริเวณชั้นของ aleurone layer ของเอ็นโดสเปอร์ม (รูปที่ 2.2) อัลบูมินและโกลบูลินเป็นโปรตีนที่มีคุณค่าทางโภชนาการดีที่สุด เนื่องจากประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำเป็นทั้ง 9 ชนิดในปริมาณสูง (Wall and Blessin, 1970) โดย Youssef (1998) พบว่า อัลบูมินจะมีไลซีน ทรีโอนีน และไกลซีนเป็นองค์ประกอบอยู่สูงกว่าโปรตีนชนิดอื่น ส่วนโกลบูลินจะมีวาลีนและอาร์จีนีนเป็นองค์ประกอบอยู่สูงกว่าโปรตีนชนิดอื่น ส่วน Virupaksha และ Sastry (1968) พบว่า โกลบูลินจะมีไลซีน อาร์จีนีน ไลซีน และวาลีนเป็นองค์ประกอบอยู่สูงกว่าโปรตีนชนิดอื่น (ตารางที่ 2.1) แต่ทั้งอัลบูมินและโกลบูลินมักสูญเสียไปในการขัดสีและการโม่เพราะโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้ อยู่ที่ผิวนอกของเมล็ด (Chibber, Mertz and Axtell, 1978; Wall and Blessin, 1970)

คาเฟอรินในข้าวฟ่างจะอยู่ที่เนื้อส่วนใน (interior part) โดยอยู่ในชั้นที่ถัดเข้ามาจากชั้น aleurone layer (Chibber et al., 1978; Wall and Blessin, 1970) คาเฟอรินจัดเป็นโปรตีนที่มีคุณค่าทางโภชนาการต่ำที่สุด เนื่องจากมีปริมาณของกรดอะมิโนจำเป็นที่เป็นองค์ประกอบต่ำที่สุด (Youssef, 1998) กรดอะมิโนที่พบมากในโปรตีนชนิดนี้ ได้แก่ กรดกลูตามิก (Wall and Blessin, 1970) และในคาเฟอรินจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนประเภทไม่มีขั้วอยู่สูง เช่น ลิวซีน โพรลีน และ อลานีน (ตารางที่ 2.1) จึงทำให้คาเฟอรินเป็นโปรตีนที่ละลายได้ในแอลกอฮอล์ คาเฟอรินในข้าวฟ่างมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Beckwith and Jones, 1972) โดยจะมีอยู่ 3 รูป คือ แอลฟา (α-), เบต้า (β-) และแกมมา (γ-) โดยจะมีคาเฟอรินในรูปของ α- มากที่สุด รองลงมา คือ γ- และ β- ตามลำดับ จากการตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel) โดยไม่เติม reducing agent ลงไป พบว่า จะมีแถบของโปรตีนอยู่ 3 แถบ คือ มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 28, 22 และ 19 kDa และเมื่อแยกคาเฟอรินแต่ละชนิดมาตรวจหาน้ำหนักโมเลกุล พบว่า α-kafirin มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 25 และ 23 kDa β- kafirin มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 20 kDa และ γ-kafirin มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 28 kDa

(Watterson, Shull and Kirleis, 1993) ส่วน Mazhar, Chandrashekar และ Shetty (1993) พบว่า α-kafirin มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 28 และ 22 kDa β- kafirin มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 18 kDa และ γ-kafirin มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 27 kDa

กลูเตลินจะกระจายตัวอยู่ในส่วนเอนโดสเปอร์มของเมล็ด (Chibber, Mertz and Axtell, 1978) โดยอยู่เป็นกลุ่มของโปรตีนเมตริกซ์ (protein metrix) (Wall and Blessin, 1970) (รูปที่ 2.2) กลูเตลินจัดเป็นโปรตีนที่คุณค่าทางโภชนาการปานกลาง (Wall and Blessin, 1970) เนื่องจากมีปริมาณของกรดอะมิโนจำเป็นทั้ง 8 ชนิด ในปริมาณที่รองจากอัลบูมินและโกลบูลิน (Youssef, 1998) Watterson และคณะ (1993) ได้ตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้จากข้าวฟ่าง และพบว่า โมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบหลักในกลูเตลินจะอยู่ในช่วง18-24 และ 45-60 kDa ซึ่งกลูเตลินจัดเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเนื่องจากประกอบด้วย subunits ซึ่งเกิดจากสายพอลิเปปไทด์มาต่อกัน เป็นจำนวนมาก การตัดพันธะไดซัลไฟด์จะทำให้น้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยของกลูเตลินลดลง เนื่องจากแต่ละพอลิเปปไทด์ของกลูเตลินเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ในกลูเตลินจะมีส่วนของ subunit ที่ละลายได้ทั้งในน้ำหรือในแอลกอฮอล์ เรียกส่วนนี้ว่า alcohol-soluble reduced glutelin (ASG) หรือ reduced soluble protein (RSP) ซึ่งก็คือ γ-kafirin (Watterson et al., 1993; Mazhar et al.,1993)



รูปที่ 2.2 ภาพตัดขวางของเมล็ดข้าวฟ่าง

ที่มา : Wall และ Blessin (1970)

ตารางที่ 2.1 ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน (%) ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนส่วนต่างๆ ของเมล็ดข้าวฟ่าง

Amino acid	Endosperm meal	ปริมาณกรดอะมิโน (%) ในโปรตีนส่วนต่างๆ		
		Globulin	Prolamin (Kafirin)	Glutelin
Lysine	1.7	3.36	0.14	3.12
Histidine	2.16	1.45	0.67	3.12
Arginine	3.25	6.14	0.66	5.91
Aspartic acid	6.25	8.68	6.72	9.07
Threonine	3.81	4.87	-	4.88
Serine	4.5	5.55	3.32	5.38
Glutamic acid	20.75	15.8	25.07	24.08
Proline	10.31	5.33	11.63	14.86
Glycine	3.27	6.25	1.28	5.33
Alanine	12.58	6.74	13.96	9.4
Half cystine	1.08	1.99	Trace	1.21
Valine	7.25	6.46	5.88	5.5
Methionine	1.51	2.24	1.33	-
Isoleucine	4.91	3.45	2.04	4.07
Leucine	16.58	6.72	15.33	12.49
Tyrisine	4.64	4.01	5.17	3.23
Phenylalanine	6.4	4.77	5.84	4.9

ที่มา : Virupaksha และ Sastry (1968)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 สมบัติเชิงหน้าที่ด้านต่าง ๆ ที่สำคัญของโปรตีน

โปรตีนในอาหารมีความแตกต่างกันทั้งในด้านของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ ขนาดโมเลกุล โครงสร้าง (globular หรือ fibrous) และค่า isoelectric point (pI) การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและกายภาพจะมีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

ความสามารถในการจับน้ำ (Water Holding Capacity)

น้ำที่อยู่ในโครงสร้างของโปรตีนซึ่งเป็นเจลหรือผงแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ น้ำที่จับกับโมเลกุลของโปรตีน (bound water) หรือเรียกว่า absorbed water (Kneifel et al., 1991) และน้ำที่ถูกจับอยู่ในโปรตีนเมตริกซ์ ซึ่งจะเรียกว่า retained water ซึ่งการจับกันของ absorbed water จะขึ้นกับสมบัติทางเคมีกายภาพ ได้แก่ ชนิดของกรดอะมิโนและ pH โดยกรดอะมิโนที่มีความเป็นกรดหรือเป็นด่างจะยิ่งสามารถจับน้ำได้ดี (Barbut, 1996) ซึ่ง Bull และ Breese (1968) ได้ศึกษาความสามารถในการจับน้ำของโกลบูลินจากโปรตีนชนิดต่างๆ พบว่า ความสามารถในการจับน้ำมีความสัมพันธ์กับผลรวมของหมู่กรดอะมิโนประเภทมีขั้ว เช่น ไฮดรอกซิล คาร์บอนิล และหมู่ที่เป็นด่าง ส่วนหมู่เอไมด์จะยับยั้งความสามารถในการจับน้ำ นอกจากนี้ถ้าโปรตีนประกอบด้วยพันธะไฮโดรเจนและพันธะมีขั้วสูงจะยิ่งสามารถจับน้ำได้ดี เนื่องจากสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้ดี ส่วน retained water จะขึ้นกับโครงสร้างของเมตริกซ์ เช่น pore size

ความสามารถในการจับน้ำมัน (Oil Holding Capacity)

ความสามารถในการจับน้ำมัน คือ การจับกันของสายโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (nonpolar side chains) กับไขมัน (Sathe, Desphande and Salunkhe, 1982; Idouraine, Yensen and Weber, 1991) ซึ่งขึ้นกับโครงสร้างของโปรตีนเมตริกซ์ เช่น pore size และ strand size ชนิดของไขมัน ขนาดของหยดไขมัน (fat droplet size) และปัจจัยอื่นๆ เช่น เติมสาร emulsifying agent Interaction ระหว่างโปรตีนกับไขมันจะขึ้นกับ โครงสร้างของเจล และการกระจายตัวหรือการเกิดอิมัลชันของไขมัน (emulsification) (Barbut, 1996)

Emulsifying Activity

เป็นค่าที่บอกถึงความสามารถของโปรตีนที่ช่วยให้เกิดอิมัลชันและช่วยให้อิมัลชันที่เกิดขึ้นมีความเสถียร (Ivey, Webb and Jones, 1970) ซึ่ง Pearce และ Kinsella (1978) ได้หาค่าของ Emulsifying Activity Index (EAI) โดยวัดเป็นค่าของพื้นที่ของ interface ที่ถูกทำให้เสถียรต่อน้ำหนักของโปรตีน โดยการวัดค่าความขุ่น (turbidity) ของอิมัลชันที่ความยาวคลื่น 500 nm. เมื่ออยู่

ในน้ำ (aqueous solution) โปรตีนจะพับตัว (fold) เพื่อให้อยู่ในรูปร่าง (conformation) ที่เสถียร โดยจะหันส่วนที่มีขั้วซึ่งเป็นส่วนที่ชอบน้ำออกไป แต่ในอิมัลชันจะประกอบไปด้วยส่วนของน้ำและน้ำมัน โปรตีนจะกระจายตัวไปที่ผิวระหว่างน้ำและน้ำมัน โดยจะคลายตัวและหันส่วนที่ไม่มีขั้วซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำไปทางน้ำมัน หันส่วนที่มีขั้วมาทางน้ำ ซึ่งโปรตีนจะเกิดการเสียสภาพ การคลายตัวของโปรตีนจะขึ้นกับความยืดหยุ่นของโปรตีน โดยโปรตีนที่มีความยืดหยุ่นสูงจะเกิดอิมัลชันได้ดี ความเสถียรของรูปร่างเดิมของโปรตีน (stability of native conformation) นอกจากนี้ยังขึ้นกับ อุณหภูมิ pH และไอออน (Kinsella, 1979)

ความเสถียรหรือความคงตัวของอิมัลชัน (Emulsion Stability)

เป็นค่าที่บอกถึงอิมัลชันที่เหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งความคงตัวของอิมัลชันจะขึ้นกับความแข็งแรง ความเหนียวและความยืดหยุ่นของฟิล์มโปรตีนที่เกิดเป็น adsorbed layer ซึ่งอยู่ระหว่างชั้นของน้ำและน้ำมัน (Hill, 1998)

ความสามารถในการเกิดฟอง (Foaming Capacity)

โปรตีนที่สามารถให้ฟองสูงจะต้องถูกดูดซับ (adsorbed) ที่ผิวระหว่าง (interface) น้ำกับอากาศได้อย่างรวดเร็ว โดยการดูดซับของโปรตีนจะเริ่มจากโปรตีนเคลื่อนที่ไปยังผิวระหว่างน้ำกับอากาศและเกิดการเคลื่อนที่ไปยังชั้นผิวหน้า (surface layer) และเกิดการจัดเรียงโครงสร้างใหม่ (structural reorganization) ของโปรตีนที่ adsorbed layer หรือเรียกว่า เกิดการเสียสภาพที่ผิวหน้า (surface denaturation) โดยโปรตีนจะเคลื่อนไปที่ผิวระหว่างน้ำกับอากาศโดยการแพร่ (diffusion) การพา (convection) หรือเกิดจากทั้งสองวิธีร่วมกัน (Wilde and Clark, 1996) ซึ่งโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจะเกิดการแพร่ไปที่ผิวระหว่างน้ำกับอากาศได้เร็ว ดังนั้นโปรตีนที่มีขนาดเล็กและเปปไทด์จึงเกิดฟองได้ดี (Grunden, Vadehra and Baker, 1974) ส่วนตัวขัดขวาง (barrier) การดูดซับในการเกิดฟองนั้น จะเกี่ยวข้องกับการเกิดการเสียสภาพที่ผิวหน้า ซึ่งเกิดจากตัวโปรตีนมาอัดตัวกันแน่นที่ผิวระหว่างน้ำกับอากาศ การเกิดฟองเกิดจากโปรตีนจับกันด้วย surface hydrophobicity โดยโปรตีนจะเกิดการเชื่อมจับกับกันที่ผิวระหว่างน้ำกับอากาศ ซึ่งโปรตีนที่มี surface hydrophobicity สูง จะมีอัตราการดูดซับสูง จึงทำให้เกิดฟองได้ดี (Townsend and Nakai, 1983) ซึ่งสิ่งสำคัญในการเกิดฟองของโปรตีน คือ ขนาด surface hydrophobicity และ ความยืดหยุ่นทางด้านโครงสร้างของโปรตีน (Wilde and Clark, 1996)

ความเสถียรหรือความคงตัวของฟอง (Foaming Stability)

โปรตีนที่ให้ฟองที่คงตัวเมื่อเกิดเป็น adsorbed layer จะต้องมีความเหนียวข้น (thick) ความยืดหยุ่น (elastic) และ มี viscoelastic สูง โดยความคงตัวของฟองจะเกิดจาก ความแข็งแรงของ viscoelastic adsorbed layer ที่เกิดขึ้น ซึ่งทำให้ขับน้ำออกมาน้อย (Wilde and Clark, 1996) นอกจากนี้ยังขึ้นกับแรงทางไฟฟ้า ซึ่งโปรตีนที่มีการกระจายตัวของประจุบวกและลบเท่ากันและสม่ำเสมอตลอดโมเลกุลและโมเลกุลข้างเคียงก็มีผลรวมของประจุใกล้เคียงกันและมีลักษณะการกระจายตัวของประจุเหมือนๆ กัน เช่น โปรตีนที่ตกตะกอนที่ pI จะมีความเสถียรของฟองมากที่สุด เพราะผลรวมของประจุเป็นศูนย์ จึงมีแรงผลักกันน้อยที่สุด (Buckingham, 1970; Waniska and Kinsella, 1979 ; Kim and Kinsella, 1985; LeMeste et al., 1990) ซึ่งโปรตีนที่มีความสามารถในการเกิดฟองสูง ไม่จำเป็นจะต้องมีความคงตัวของฟองสูงด้วย

2.5 การสกัดและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากธัญชาติ

Wu (1978) ได้ศึกษาการสกัดและสมบัติเชิงหน้าที่ของข้าวฟ่างพันธุ์ที่มีไลซีนเป็นองค์ประกอบสูง 2 พันธุ์ (IS และ P) และพันธุ์ที่มีไลซีนต่ำ 1 พันธุ์ (TE) โดยใช้วิธีการโม่แห้ง และนำข้าวฟ่างที่ผ่านการโม่ไปร่อนแยกผ่านตะแกรงขนาด 100 mesh สกัดโปรตีนจากแป้งที่เตรียมโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการสกัดข้าวฟ่างพันธุ์ IS และ P คือ ที่ pH 11.9 และพันธุ์ TE คือ ที่ pH 11.8 เพราะที่ pH ดังกล่าวเป็นจุดที่สามารถสกัดโปรตีนออกมาได้มากที่สุด และนำสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ไปตกตะกอนโปรตีนโดยใช้กรดไฮโดรคลอริก (HCl) พบว่า pH ที่ทำให้เกิดการตกตะกอนโปรตีนมากที่สุด คือ 3.6-5.2 โดยข้าวฟ่างพันธุ์ IS คือ ที่ pH 5.2 ส่วนพันธุ์ P และ TE คือ ที่ pH 4.8 ข้าวฟ่างพันธุ์ IS, P และ TE มีค่า % yield ของตะกอนโปรตีนที่สกัดได้เป็น 12, 8 และ 6 % ตามลำดับ และมีความเข้มข้นของโปรตีน (% protein) ในตะกอนโปรตีนที่สกัดได้เป็น 48.3, 56.6 และ 60.3% ตามลำดับ ในด้านสมบัติเชิงหน้าที่นั้น พบว่า โปรตีนที่สกัดได้จากข้าวฟ่างพันธุ์ที่มีไลซีนสูงทั้ง 2 พันธุ์ มีค่าความสามารถในการจับน้ำใกล้เคียงกัน คือเท่ากับ 4.5 และ 4.4 (g/g dry protein) ตามลำดับ และมีค่าสูงกว่าข้าวฟ่างพันธุ์ที่มีไลซีนต่ำเล็กน้อย ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.0 (g/g dry protein) ส่วนสมบัติในด้านการเกิดอิมัลชันนั้น พบว่า ข้าวฟ่างพันธุ์ที่มีไลซีนสูงมีค่า emulsifying activity เท่ากับ 54 และ 53% ตามลำดับ และมีค่าความคงตัวของอิมัลชัน (emulsion stability) เท่ากับ 47 และ 40% ตามลำดับ ขณะที่โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง (Soy Protein Isolate, SPI) มีค่า emulsifying activity และค่าความคงตัวของอิมัลชัน เท่ากับ 45 และ 44% ตามลำดับ ส่วนข้าวฟ่างพันธุ์ที่มี

ไลซีนต่ำมีค่าทั้งสองเท่ากับ 3 % ซึ่งต่ำมากเมื่อเทียบกับข้าวฟ่างพันธุ์ที่มีไลซีนสูงและ SPI ดังนั้น โปรตีนที่สกัดได้จากข้าวฟ่างพันธุ์ที่มีไลซีนสูงทั้ง 2 พันธุ์ จึงเหมาะที่จะใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ในอาหาร และโปรตีนที่สกัดได้จากข้าวทั้งสามพันธุ์เหมาะที่จะใช้เป็นตัวดูดซับน้ำในอาหาร (water-absorbing agent) Wu และ Stringfellow (1980) ได้ศึกษาการสกัดและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากข้าวสาลีพันธุ์ทั่วไป (Ar) และพันธุ์ที่มีโปรตีนสูง 2 พันธุ์ (K และ At) โดยใช้วิธีการโม่แห้ง และร่อนแยกแป้งผ่านตะแกรงที่มีขนาดของรู 150 μm สกัดโปรตีนจากแป้งที่เตรียมโดยใช้สารละลายด่าง (NaOH) พบว่า pH 11.1 เป็น pH ที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรตีนจากข้าวสาลีทั้ง 3 พันธุ์ ซึ่งจะสามารถสกัดโปรตีนออกมาได้ประมาณ 77 % โดยในการสกัดโปรตีนนั้นเมื่อเพิ่ม pH ในการสกัดให้สูงขึ้นจนถึง pH 11.5 จะสามารถสกัดโปรตีนออกมาได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และต้องใช้สารละลายกรดในการตกตะกอนโปรตีนเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้โปรตีนที่สกัดได้ที่ pH สูงขึ้น จะมีโอกาสเกิดการเสียสภาพ (denaturation) มากขึ้น ส่วนการตกตะกอนโปรตีนนั้น พบว่า pH 6.3 เป็นจุดที่โปรตีนเกิดการตกตะกอนมากที่สุด คือ 85% ข้าวสาลีพันธุ์ Ar, K และ At มีค่า % yield ของตะกอนโปรตีนที่สกัดได้เป็น 14, 16 และ 20% ตามลำดับ และมีความเข้มข้นของโปรตีนในตะกอนโปรตีนที่สกัดได้เป็น 88.0, 96.3 และ 90.4% ตามลำดับ ในด้านสมบัติเชิงหน้าที่ พบว่า โปรตีนที่สกัดจากข้าวสาลีพันธุ์ Ar พันธุ์ K และ At มีค่าความสามารถในการจับน้ำเท่ากับ 3.0, 3.0 และ 2.7 (g/g dry protein) ตามลำดับ มีค่า emulsifying activity เท่ากับ 47, 98 และ 66% ตามลำดับ และมีค่าความคงตัวของอิมัลชันเท่ากับ 46, 97 และ 64% ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าโปรตีนที่สกัดได้จากแป้งสาลีมีสมบัติในด้าน emulsifying activity และในด้านการรักษาความคงตัวของอิมัลชันได้ดีกว่า SPI จึงเหมาะที่จะใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ Idouraine และคณะ (1991) ได้ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของอัลบูมินและโกลบูลินที่สกัดได้จากถั่วเทพารี (Tepary bean) เปรียบเทียบกับ SPI โดยโม่ถั่วแบบแห้ง โดยนำแป้งถั่วที่ได้จากการโม่แห้งไปร่อนแยกโดยใช้ตะแกรงขนาด 30 mesh แล้วสกัดโปรตีนจากแป้งถั่วเทพารีที่ผ่านการสกัดไขมันออกด้วยเฮกเซน โดยสกัดอัลบูมินด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และสกัดโกลบูลินโดยใช้สารละลายน้ำเกลือ พบว่า ความสามารถในด้านการจับน้ำของ SPI มีค่าเท่ากับ 3.86 (g/g dry sample) ในขณะที่อัลบูมินและโกลบูลินละลายในน้ำ ในด้านความสามารถในการจับน้ำมัน พบว่า อัลบูมิน โกลบูลิน และ SPI มีค่าเท่ากับ 3.10, 1.14 และ 0.83 (ml /g dry sample) ตามลำดับ ในด้านความสามารถในการอุ้มน้ำมันของอิมัลชันมีค่าเท่ากับ 31.5, 27.0 และ 31.2 (ml. oil / 100 mg protein) ส่วนสมบัติในด้านการเกิดฟองนั้นพบว่า อัลบูมิน โกลบูลิน และ SPI มีค่าความสามารถในการเกิดฟองเท่ากับ 586, 150 และ 237 % ตามลำดับ และมีค่าความคงตัวของฟองเท่ากับ 32, 6 และ 14% ตามลำดับ ซึ่งอัลบูมินที่สกัดจากแป้งถั่วมีความสามารถในการเกิดฟองสูงและมีความคงตัวของฟองดี จึงเหมาะที่จะใช้ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่และผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆ ที่

ต้องการการเกิดฟอง Were, Hettiarachchy และ Kalapathy (1997) ได้ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากถั่วเหลืองที่ผ่านการดัดแปรด้วยด่าง และโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอนไซม์ปาเปน เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการดัดแปร โดยโม่ถั่วเหลืองที่ผ่านการนำเปลือกออกแล้วด้วยวิธีการโม่แห้ง ร่อนแยกแป้งที่ผ่านการสกัดไขมันออกด้วยเฮกเซนผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh แล้วสกัดโปรตีนจากแป้งถั่วเหลืองโดยใช้น้ำกลั่นในอัตราส่วนแป้งต่อน้ำเท่ากับ 1 : 10 ปรับให้มี pH 9 แล้วตกตะกอนที่ pH 4.5 ทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง ดัดแปรโปรตีนโดยนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนหรือด่างแล้วทำแห้งอีกครั้ง พบว่า ความสามารถในการจับน้ำของโปรตีนถั่วเหลืองที่ไม่ดัดแปร โปรตีนถั่วเหลืองที่ดัดแปรด้วยด่าง และโปรตีนถั่วเหลืองที่ดัดแปรด้วยเอนไซม์ปาเปน มีค่าเท่ากับ 0.21, 4.0 และ 3.13 (g /g dry sample) ตามลำดับ โปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอนไซม์ปาเปนจะมีค่า emulsifying activity สูงสุด รองลงมา คือ โปรตีนถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการดัดแปร และโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการดัดแปรด้วยด่าง ตามลำดับ ในขณะที่โปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการดัดแปรด้วยด่างมีค่าความคงตัวของอิมัลชันสูงสุด รองลงมา คือ โปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอนไซม์ปาเปน และโปรตีนถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการดัดแปร ตามลำดับ ส่วนสมบัติในด้านการเกิดฟอง พบว่า โปรตีนที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอนไซม์ปาเปนจะมีความสามารถในการเกิดฟองใกล้เคียงกับโปรตีนไข่ขาวแต่ความคงตัวของฟองยังต่ำกว่าเล็กน้อย จึงเหมาะที่จะใช้แทนโปรตีนไข่ขาวในผลิตภัณฑ์ประเภท whipped topping เบเกอรี่ และไอศกรีม Shih และ Daigle (1997) ได้ศึกษาถึงการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) ในการแยกโปรตีนจากข้าวเจ้า ปรับสารละลายที่ผ่านการย่อยให้มี pH 4 แล้วเหวี่ยงแยก นำส่วนตะกอนที่ได้ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่า โปรตีนข้าวเจ้าที่สกัดได้ จะมีความสามารถในการละลายและมีค่า emulsifying activity index (EAI) ต่ำ ในช่วง pH 4 –5 เนื่องจากที่ pH 4.6 เป็นค่า pI ของโปรตีนจากข้าวเจ้า และเมื่อเพิ่มหรือลด pH จาก 4.6 พบว่า โปรตีนจากข้าวเจ้าจะมีความสามารถในการละลายและมีค่า EAI เพิ่มขึ้น และเมื่อดัดแปรโปรตีนที่สกัดได้จากข้าวเจ้าโดยการใช้เอนไซม์โปรตีเอส (protease) พบว่า โปรตีนที่ผ่านการดัดแปรจะมีความสามารถในการละลายเพิ่มสูงขึ้น จึงเหมาะที่จะเติมลงในเครื่องดื่มเพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีน Sathe และ Salunkhe (1981) ได้ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของอัลบูมิน โกลบูลิน Protein concentrate (PC) และ Protein isolate (PI) จากถั่ว Great north bean พบว่า อัลบูมิน โกลบูลิน PC และ PI มีความสามารถในการจับน้ำเท่ากับ 3.18, 2.77, 5.93 และ 2.73 (g/g dry sample) ตามลำดับ และมีความสามารถในการจับน้ำมันเท่ากับ 3.29, 3.23, 4.12 และ 1.57 (g/g dry sample) ตามลำดับ มีความสามารถในการเกิดฟองเท่ากับ 80, 40, 64 และ 4 (% volume increase) ตามลำดับ ขณะที่โปรตีนไข่ขาว (egg albumin) มีความสามารถในการเกิดฟองเท่ากับ 40 (% volume increase) และโปรตีนทั้งสี่ชนิดมีความคงตัวของฟองใกล้เคียงกันแต่จะต่ำกว่าในไข่ขาว ซึ่งจัดได้ว่าโปรตีนทั้งสี่ชนิดที่สกัดได้มี

ความสามารถในการเกิดฟองระดับปานกลาง ในขณะที่ความสามารถในการอุ้มน้ำมันของอิมัลชัน (emulsion capacity) มีค่าเท่ากับ 63.8, 44.0, 72.6 และ 63.8 (g/g dry sample) ตามลำดับ และมีค่าความคงตัวของอิมัลชันเท่ากับ 50, 100, 85, 100 และ 60 % ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า PC จะมีสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์ดีที่สุด เนื่องจากมีค่าของสมบัติในด้านการเกิดอิมัลชันสูงสุด ซึ่งสัมพันธ์กับค่าความสามารถในการจับน้ำและจับน้ำมัน จึงเหมาะที่จะใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ Ahmedna, Prinyawiwatkul และ Rao (1999) ได้ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากข้าวสาลี (solubilized wheat protein isolate, SWPI) เปรียบเทียบกับโซเดียมเคซีเนต (sodium caseinate, NaCAS) ไข่ขาวผง (DEW) non-fat dry milk (NFDM) และ SPI พบว่า SWPI มีความสามารถในการจับน้ำ ความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟองสูงกว่า NaCAS, DEW, NFDM และ SPI แต่มีความสามารถในการจับน้ำมันใกล้เคียงกันกับ NaCAS, DEW, NFDM และ SPI และเมื่อเติม SWPI ในอาหารประเภทไอศกรีม คุกกี้ ขนมอบ และแผ่นเนื้อแฮมเบอเกอร์เพื่อช่วยปรับปรุงและรักษาคุณภาพของอาหารเหล่านั้น พบว่า การเติม SWPI ในปริมาณไม่เกิน 5% ทำให้ผู้บริโภคยอมรับผลิตภัณฑ์อาหารเหล่านั้น ในการสกัดโปรตีนนอกจากจะใช้สารละลายด่างและเอนไซม์แล้ว ยังสามารถใช้ตัวทำละลายชนิดอื่นได้ด้วย Buffo, Weller และ Gennadios (1997) ได้ผลิตฟิล์มบริโภคจากคาเฟอรินโดยเปรียบเทียบกับฟิล์มที่ผลิตจากซีน (zine) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ละลายได้ในแอลกอฮอล์ที่สกัดจากข้าวโพด โดยสกัดคาเฟอรินจากโปรตีนของข้าวฟ่างซึ่งแยกได้จากสตาร์ชในขั้นตอนการโม่เปียกโดยใช้เอทานอลความเข้มข้น 95% ในอัตราส่วน 1:5 (w/w) ที่อุณหภูมิ 65 °C ตกตะกอนโดยเติมน้ำกลั่นลงไปและทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ –5 °C แยกตะกอนโปรตีนโดยการเหวี่ยงแยก และทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง และพบว่า การเติม reducing agent เช่น ซัลไฟต์ (sulfite) จะช่วยทำลายพันธะไดซัลไฟด์ทำให้สกัดคาเฟอรินได้ดีขึ้น ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Xie และ Seib (2000) ที่พบว่า การโม่เปียกข้าวฟ่างที่ผ่านการแช่ในน้ำที่เติมโซเดียมไบซัลไฟต์ลงไป 0.32% จะทำให้การแยกสตาร์ชออกจากโปรตีนทำได้ดีขึ้น มีค่า % yield ของสตาร์ชเท่ากับ 69.4% และมีค่า recovery สูงถึง 92-95 % โดยสตาร์ชที่ผลิตได้มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบเพียง 0.3% ส่วนโปรตีนที่แยกได้มีค่า recovery 48% ของโปรตีนจากเมล็ดข้าวฟ่างและมีสตาร์ชเป็นองค์ประกอบเพียง 2% เนื่องจากซัลไฟต์ไปทำให้โปรตีนเมตริกซ์นุ่มขึ้น จึงแยกโปรตีนออกมาได้ง่ายขึ้น (Watson, 1970) Lim และคณะ (1999) ได้ศึกษาการสกัดโปรตีนออกจากสตาร์ชของข้าวเจ้าโดยใช้สารละลาย 4 ชนิด คือ 0.1% และ 0.2% NaOH, โดเดซิลเบนซีนซัลโฟเนต (dodecyl benzene sulfonate, DoBS) ความเข้มข้น 1.2% ซึ่งมีโซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) 0.12% และโซเดียมลอริวซัลเฟต (Sodium lauryl sulfate, SLS) ความเข้มข้น 1.2% ซึ่งมีโซเดียมซัลไฟต์ 0.12% พบว่า สารละลาย DoBS และ SLS มีประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนใกล้เคียงกัน และมีประสิทธิภาพดีกว่า 0.1% และ 0.2% NaOH เนื่องจากทั้งสารละลาย DoBS และ SLS มี Na_2SO_3

เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีหน้าที่ในการตัดพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างโมเลกุลของโปรตีน Steenson และ Sathe (1995) ได้ศึกษาถึงกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนจากและขนาดโมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิด โดยโม่ข้าวเจ้าแบบแห้งและร่อนแยกผ่านตะแกรงขนาด 50 mesh นำแป้งที่ได้ไปสกัดไขมันออกโดยใช้อะซีโตน สกัดแยกส่วนโปรตีนโดยสกัดอัลบูมินและโกลบูลินด้วยน้ำเกลือ (2%NaCl) แยกอัลบูมิน ออกจากโกลบูลินโดยการ dialysis สกัดโพรลามินด้วยเอทานอลความเข้ม 70% และสกัดกลูเตลินด้วยสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 10% และทำแห้งโปรตีนโดยวิธีแช่เยือกแข็ง พบว่า โปรตีนในข้าวเจ้าพันธุ์ดังกล่าวประกอบด้วยอัลบูมินโกลบูลิน โพรลามิน และกลูเตนิน เท่ากับ 5.9, 13.8, 5.8 และ 74.5% ของโปรตีนทั้งหมด ตามลำดับ โดยโปรตีนทั้ง 4 ชนิด จะประกอบไปด้วยกรด กลูตามิก กรดแอสปาติก และอลานีนในปริมาณสูง และทรีโอนีนจัดเป็นกรดอะมิโนที่ขาดมากที่สุด (first limiting amino acid) ในโปรตีนทั้งสี่ชนิดและในโปรตีนโดยรวม สายเปปไทด์หลักของอัลบูมินมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 14.1 kDa โกลบูลินมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 13.9 และ 20.3 kDa โพรลามินมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 13.6 kDa และกลูเตนินมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 20.4 และ 30.9 kDa ตามลำดับ

2.6 การใช้โปรตีนจากธัญชาติในผลิตภัณฑ์อาหาร

การใช้โปรตีนในทางอุตสาหกรรมอาจใช้เพื่อเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำ หรือใช้เป็นตัวดูดซับน้ำมันที่มีอยู่ในอาหาร เป็นสารช่วยให้เกิดอิมัลชัน (emulsifier) ช่วยให้อิมัลชันมีความคงตัว เป็นสารช่วยในการเกิดฟองและรักษาเสถียรภาพของฟองนั้นไว้ และใช้เพิ่มปริมาณโปรตีน (fortified protein) ในอาหาร Ahmed, Abd El-Moniem และ Yassen (1996) พบว่า โปรตีนที่สกัดได้จากลูกเดือยและข้าวฟ่างโดยใช้สารละลายด่าง เหมาะที่จะใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหาร ในปัจจุบันนี้มีการใช้โปรตีนกันแพร่หลายและเป็นประโยชน์มากขึ้นกว่าเดิม เช่น ซีน (zein) ใช้เป็นตัวเคลือบเม็ดยา ลูกกวาด และขนมหวานต่างๆ หรือใช้โพรลามินคาเฟอริน และซีนในการผลิตฟิล์มบริโภคได้ (Gennadios and Weller, 1990) Buffo และคณะ (1997) ได้ทดลองผลิตฟิล์มบริโภคจากคาเฟอรินโดยเปรียบเทียบสมบัติของฟิล์มที่ได้กับฟิล์มที่ผลิตจากซีนที่ใช้ในทางการค้าและพบว่า ฟิล์มที่ผลิตจากคาเฟอรินมีค่าการซึมผ่านของไอน้ำ (water vapor permeability) ใกล้เคียงกับฟิล์มที่ผลิตจากซีน คือ มีค่าเท่ากับ 5.5 และ 5.7 g.mm / m^2.hr.kPa ตามลำดับ และมีค่าการทนต่อแรงดึง (tensile strength) เท่ากับ 2.1 และ 2.6 MPa ตามลำดับ Rayas, Hernandez และ Ng (1997) ได้พัฒนาวิธีการผลิตฟิล์มบริโภคจากโพรลามินของข้าวสาลีหลายๆ พันธุ์ เพื่อผลิตฟิล์มที่มีคุณภาพดีสำหรับใช้เป็นบรรจุภัณฑ์สำหรับอาหาร

Cuq, Gontard และ Guilbert (1998) ใช้กลูเตนร่วมกับโปรตีนชนิดอื่นๆที่ได้จากพืชและสัตว์ เช่น soy protein, collagen, egg albumin เป็นต้น และสารเคมีบางชนิด เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตวัสดุบรรจุภัณฑ์จากโปรตีน (agro-packaging materials) ซึ่งมีสมบัติทนแรงกล (mechanical strength) และสมบัติกันการซึมผ่าน Gomez-Guillen, Borderias และ Montero (1996) ได้ทดลองเติมโปรตีนประเภท nonmuscle proteins เช่น ไข่ขาว โปรตีนจากถั่วเหลือง เคซีน และกลูเตน ลงในเนื้อปลาซาร์ดีนบดคุณภาพสูงและคุณภาพต่ำ เพื่อศึกษาสมบัติต่างๆของเจลที่ได้ พบว่า การเติมโปรตีนต่างๆ ที่เป็น nonmuscle proteins ลงไปในเนื้อปลาบดคุณภาพสูง จะรบกวนการเกิดเจล แต่การเติมโปรตีนเหล่านี้ในเนื้อปลาซาร์ดีนบดคุณภาพต่ำจะช่วยปรับปรุงคุณภาพของเจลให้ดีขึ้น และเกือบทุกตัวอย่างของเนื้อปลาซาร์ดีนบดคุณภาพสูงและคุณภาพต่ำที่เติมกลูเตนลงไป จะมีค่า cohesiveness, elasticity และปริมาณความชื้นสูงกว่าตัวอย่างที่มีการเติมโปรตีนชนิดอื่น อย่างไรก็ตามการใช้โปรตีน เช่น SPI กลูเตน หรือโปรตีนสกัดอื่นๆ ก็มีข้อจำกัดในอาหารบางประเภท เช่น การเติมในผลิตภัณฑ์ประเภทไส้กรอก กำหนดให้ใช้ได้ไม่เกิน 3.5% ของอิมัลชั่น ซึ่งถ้าเติมในปริมาณสูงกว่านี้ต้องรายงานว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการใช้โปรตีนจากพืชทดแทนเนื้อสัตว์บางส่วน (Henrickson, 1978)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ขั้นตอนการทดลอง

3.1 การเตรียมวัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้ คือ เมล็ดข้าวฟ่าง (grain sorghum) พันธุ์ KU 439 (*Sorghum bicolor*) นำมาโม่ให้เป็นแป้งโดยวิธีการโม่แบบแห้ง (Wu, 1978) และแบบเปียก (Xie and Seib, 2000) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.1 และ ก.2 ตามลำดับ) หลังจากนั้นนำแป้งที่ได้จากการโม่ทั้งสองแบบไปสกัดไขมัน (Youssef, 1998) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.3) แล้ววิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของข้าวฟ่าง แป้งที่ได้จากการโม่ทั้งสองแบบ แป้งที่ได้จากการโม่ทั้งสองแบบและผ่านการสกัดไขมัน ดังนี้

3.1.1 ปริมาณความชื้น โดยดัดแปลงวิธีของ A.O.A.C. (1995) section 32.1.03 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.4)

3.1.2 ปริมาณเถ้า โดยดัดแปลงวิธีของ A.O.A.C.(1995) section 32.1.05 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.5)

3.1.3 ปริมาณไขมัน โดยดัดแปลงวิธีของ A.O.A.C.(1995) section 32.1.13 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.6)

3.1.4 ปริมาณเส้นใย โดยดัดแปลงวิธีของ A.O.A.C.(1995) section 32.1.15 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.7)

3.1.5 ปริมาณโปรตีน โดยดัดแปลงวิธีของ A.O.A.C.(1995) section 32.1.22 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.8)

3.1.6 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต คำนวณจากผลต่างของ 100 กับปริมาณองค์ประกอบอื่น

3.2 การสกัดโปรตีน

การสกัดโปรตีนจะสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.25 N (Wu, 1978) และเอทานอล 95% (Buffo et al., 1997) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ข.1 และ ข.2 ตามลำดับ)

3.2.1 สกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้แป้งที่ได้จากการโม่แบบแห้งและแบบเปียกและผ่านการสกัดไขมัน ปรับตัวอย่างให้มี pH 9, 10, 11 และ 11.5 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.25 N ทำการสกัดที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เหวี่ยงแยกสารละลายโปรตีนออกจากแป้ง สกัดโปรตีนออกจากแป้งซ้ำ 2 ครั้ง ตกตะกอนโปรตีนจากสารละลาย

โปรตีนโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.5 N โดยปรับสารละลายโปรตีนให้มี pH 3.5, 4.0 และ 4.5 สกัดโปรตีนซ้ำ 2 ครั้ง

วางแผนการทดลองแบบ Asymmetrical Factorial Design 2x4x3 ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Version 9.0

3.2.2 สกัดโดยใช้เอทานอล 95% โดยใช้แป้งที่ได้จากการโม่แห้งและโม่เปียกและผ่านการสกัดไขมัน แปรอัตราส่วนแป้ง : แอลกอฮอล์เป็น 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 และ 1:7 (w/w) สกัดที่ 65°C นาน 30 นาที กรองแยกสารละลายโปรตีนออกจากแป้ง สกัดโปรตีนซ้ำ 2 ครั้ง

วางแผนการทดลองแบบ Asymmetrical Factorial Design 2x5 ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Version 9.0

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน และการวัดสมบัติเชิงหน้าที่

3.3.1 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีนที่สกัดได้ โดยดัดแปลงวิธีของ A.O.A.C.(1995) section 32.1.22 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.8) คำนวณหาค่า % yield และ % protein recovery ของโปรตีนที่สกัดได้ในทุกภาวะการสกัด จากสมการ (1) และ (2) ตามลำดับ

$$\%\ \text{yield ของโปรตีน} = \frac{\text{ปริมาณตะกอนโปรตีน(g)} \times \text{ปริมาณโปรตีน(\%)}}{\text{ปริมาณแป้งที่ใช้ในการสกัดโปรตีน (g)}} \quad (1)$$

$$\%\ \text{protein recovery} = \frac{\%\ \text{yield ของโปรตีน} \times 100}{\%\ \text{โปรตีนที่มีในแป้งที่ใช้ในการสกัด}} \quad (2)$$

3.3.2 ตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนทุกตัวอย่างที่สกัดได้โดยการทำ SDS - PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) โดยดัดแปลงวิธีของ Laemmli (1970) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค.1)

3.3.3 วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในวัตถุดิบ แป้งที่ได้จากการโม่แบบเปียกและแบบแห้ง โปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งและโม่เปียกที่ pH 11.5 และตกตะกอนที่ pH 4.0

และโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งและโม่เปียกด้วยแอลกอฮอล์ที่อัตราส่วน 1:4 โดยใช้เทคนิค HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ด้วยคอลัมน์ Water AccQ.Tag (Cohen and Michaud, 1993) ซึ่งเป็นคอลัมน์ที่ใช้หลักการแยกสารแบบ Reverse phase

3.3.4 วัดสมบัติเชิงหน้าที่ (functional properties) ของโปรตีนทุกตัวอย่างที่สกัดได้ในด้านต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับ soy protein isolate ดังนี้

- Water Holding Capacity และ Oil Holding Capacity ตามวิธีของ Were และคณะ (1997) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค.2)
- Emulsifying Activity และ Emulsion Stability ตามวิธีของ Pearce และ Kinsella (1978) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค.3)
- Foaming Capacity และ Foaming Stability ตามวิธีของ Sathe และ Salunkhe (1981) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค.4)

3.4 การใช้โปรตีนในผลิตภัณฑ์อาหาร

นำโปรตีนที่สกัดได้จากแป้งโม่แห้งด้วยสารละลายด่างที่ pH 11.5 และตกตะกอนที่ pH 4.5 และโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งด้วยแอลกอฮอล์ที่อัตราส่วน 1:4 เติมลงในเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์ (fish finger) ที่ผลิตจากปลาทรายแดง (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง) 3% ของส่วนผสม เปรียบเทียบตัวอย่างที่ได้กับตัวอย่างที่เติมโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองปริมาณ 3% และตัวอย่างที่ไม่ได้เติม (control) โดยการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสเพื่อหาความแตกต่างและความชอบโดยรวมโดยใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน 20 คน (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก จ) และวิเคราะห์เนื้อสัมผัสด้วยเครื่อง Texture Analyzer (Stable micro system รุ่นTAXT2i) โดยใช้โปรแกรม Texture Profile Analysis (TPA)

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Version 9.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของข้าวฟ่างพันธุ์ KU 439 แป้งที่ได้จากการโม่แบบแห้งและแบบเปียก และแป้งโม่แห้งและโม่เปียกที่ผ่านการสกัดไขมันออก (ตารางที่ 4.1) พบว่าแป้งที่ได้จากการโม่แบบเปียกและแบบแห้งมีไขมันและคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณเส้นใย โปรตีนและเถ้าในแป้งลดลงจากวัตถุดิบ เนื่องจากในการผลิตแป้งมีการร่อนแยกส่วนของเปลือกซึ่งเป็นส่วนที่มีเส้นใยเป็นองค์ประกอบหลัก มีโปรตีนและเถ้าเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยออกไปจึงทำให้องค์ประกอบอื่นๆ มีสัดส่วนที่เพิ่มขึ้น แป้งที่ได้จากการโม่แห้งมีค่าความชื้นลดลงเนื่องจากหลังการโม่และร่อนแป้งจะนำแป้งไปอบที่ 40°C นาน 16 ชั่วโมง เพื่อลดความชื้นก่อนการบรรจุเช่นเดียวกับในแป้งโม่เปียก แต่แป้งที่ได้จากการโม่เปียกจะมีค่าความชื้นมากกว่าเนื่องจากมีการแช่เมล็ดข้าวฟ่างในน้ำก่อนโม่เป็นเวลานานถึง 48 ชั่วโมง เพื่อช่วยให้เมล็ดนุ่ม ทำให้โม่ได้ง่ายขึ้นและเป็นการรักษาคุณภาพของสตาร์ชที่เป็นองค์ประกอบ จึงทำให้แป้งก่อนนำไปอบมีความชื้นสูงกว่าแป้งโม่แห้งมาก แป้งที่ได้จากการโม่เปียกมีองค์ประกอบทางเคมีโดยเฉพาะความชื้นใกล้เคียงกับผลการทดลองของ Yang และ Seib (1996) ซึ่งได้ทดลองโม่เปียกเมล็ดข้าวฟ่างพันธุ์ yellow ส่วนแป้งที่ได้จากการโม่แห้งมีองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ยกเว้นโปรตีน ใกล้เคียงกับผลการทดลองของ Jones และ Beckwith (1970) ซึ่งได้ทดลองโม่แห้งเมล็ดข้าวฟ่างพันธุ์ OK 612, RS 626 และ TE 77 โดยแป้งโม่แห้งที่ได้จากข้าวฟ่างทั้ง 3 พันธุ์ มีองค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกันและมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าแป้งโม่แห้งที่ได้จากการทดลอง ทั้งนี้เนื่องจากข้าวฟ่างพันธุ์ KU 439 มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าโปรตีนในข้าวฟ่างทั้ง 3 พันธุ์ แป้งที่ได้จากการโม่เปียกและโม่แห้งจะต้องผ่านการสกัดไขมันเนื่องจากไขมันสามารถละลายได้ในสารละลายด่างและแอลกอฮอล์ ซึ่งใช้ในการสกัดโปรตีนทำให้โปรตีนที่สกัดได้มีไขมันปนเปื้อนและอาจมีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ ซึ่งแป้งที่ผ่านการสกัดไขมันมีไขมันเหลืออยู่ไม่เกิน 0.9% (dry basis) ซึ่งจัดว่าน้อยมาก

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของข้าวฟ่าง แป้งที่ได้จากการโม่แห้ง แป้งที่ได้จากการโม่เปียก แป้งที่ได้จากการโม่แห้งและผ่านการสกัดไขมัน และแป้งที่ได้จากการโม่เปียกและผ่านการสกัดไขมัน

องค์ประกอบ	ปริมาณ[1] (% Dry Basis) ในตัวอย่าง				
	S[3]	DSF[3]	WSF[3]	DDSF[3]	DWSF[3]
ความชื้น[4]	-	-	-	-	-
เถ้า	1.66 ± 0.01	0.60 ± 0.01	0.67 ± 0.02	0.63 ± 0.02	0.74 ± 0.03
ไขมัน	2.33 ± 0.06	3.75 ± 0.20	3.39 ± 0.21	0.90 ± 0.07	0.88 ± 0.02
เส้นใย	2.99 ± 0.08	0.23 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.29 ± 0.02
โปรตีน	7.95 ± 0.02	7.70 ± 0.03	7.06 ± 0.05	8.66 ± 0.13	6.39 ± 0.14
คาร์โบไฮเดรต[2]	85.07 ± 0.10	87.72 ± 0.17	88.68 ± 0.19	89.50 ± 0.08	90.69 ± 0.10

[1] ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

[2] คำนวณจากผลต่างของ 100 กับปริมาณขององค์ประกอบอื่นๆ

[3] S ข้าวฟ่าง

DSF แป้งที่ได้จากการโม่แห้ง

WSF แป้งที่ได้จากการโม่เปียก

DDSF แป้งที่ได้จากการโม่แห้งและผ่านการสกัดไขมัน

DWSF แป้งที่ได้จากการโม่เปียกและผ่านการสกัดไขมัน

[4] ความชื้นของ S 11.86 ± 0.03 % , DSF 8.65 ± 0.16%, WSF 10.26 ± 0.31%, DDSF 7.62 ± 0.10% และ DWSF 9.21 ± 0.12%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การสกัดโปรตีน

4.2.1 การสกัดด้วยสารละลายด่าง

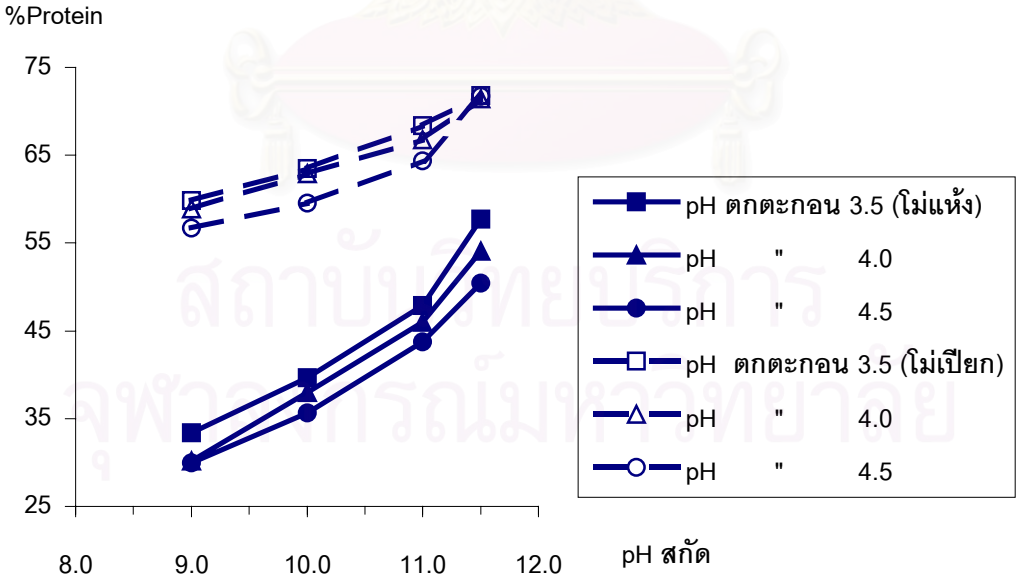
จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณโปรตีน (%protein content) ในตะกอนโปรตีนที่สกัดได้จากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งด้วยสารละลายด่าง (ตารางที่ ฉ.1) พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อค่าปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้ง ได้แก่ วิธีการโม่ pH ในการสกัด pH ในการตกตะกอน และอิทธิพลร่วมของทั้งสามปัจจัย โดยเมื่อ pH ในการสกัดเพิ่มขึ้น ปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีนจะเพิ่มสูงขึ้น และที่สภาวะการสกัดเดียวกัน ตะกอนโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกจะมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าตะกอนโปรตีนที่สกัดได้จากแป้งโม่แห้ง (ตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1) ซึ่งอาจเป็นเพราะในการโม่เปียกมีขั้นตอนการแช่น้ำและมีการเติม $NaHSO_3$ ลงไป ซึ่งจะช่วยให้เมล็ดและโปรตีนเมตริกซ์นุ่มขึ้น ทำให้การสกัดโปรตีนง่ายขึ้น สามารถแยกโปรตีนกับคาร์โบไฮเดรตออกจากกันได้ดีขึ้น (Watson, 1970) และตะกอนโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งและตกตะกอนที่ pH 3.5 จะมีค่าปริมาณโปรตีนมากที่สุด ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งในแต่ละภาวะการสกัดมีค่าประมาณ 52-66 และ 28-55% ตามลำดับ ซึ่งองค์ประกอบอื่นในตะกอนโปรตีนที่สกัดได้ส่วนใหญ่น่าจะเป็นคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ อะไมโลส และอะไมโลเพคติน เนื่องจากเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่มากที่สุดในแป้งโม่เปียกและโม่แห้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 ปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ

pH ตกตะกอน / pH สกัด	ปริมาณโปรตีน (%dry basis)		
	3.5	4.0	4.5
โม่แห้ง			
9.0	$31.91^{p} \pm 1.60$	$30.60^{q} \pm 0.83$	$27.66^{r} \pm 0.75$
10.0	$39.85^{m} \pm 0.63$	$38.47^{n} \pm 0.35$	$35.08^{o} \pm 0.73$
11.0	$45.72^{j} \pm 0.77$	$44.45^{k} \pm 0.87$	$41.67^{l} \pm 0.91$
11.5	$55.14^{f} \pm 1.11$	$53.96^{g} \pm 0.67$	$48.01^{i} \pm 0.76$
โม่เปียก			
9.0	$55.46^{f} \pm 0.90$	$54.54^{fg} \pm 0.96$	$52.56^{h} \pm 0.79$
10.0	$58.89^{de} \pm 0.82$	$58.31^{e} \pm 0.56$	$55.22^{f} \pm 0.85$
11.0	$63.24^{b} \pm 0.69$	$61.81^{c} \pm 0.78$	$59.54^{d} \pm 0.62$
11.5	$66.53^{a} \pm 1.41$	$66.18^{a} \pm 1.27$	$66.34^{a} \pm 1.41$

a, b, c ... ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.1 ปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ

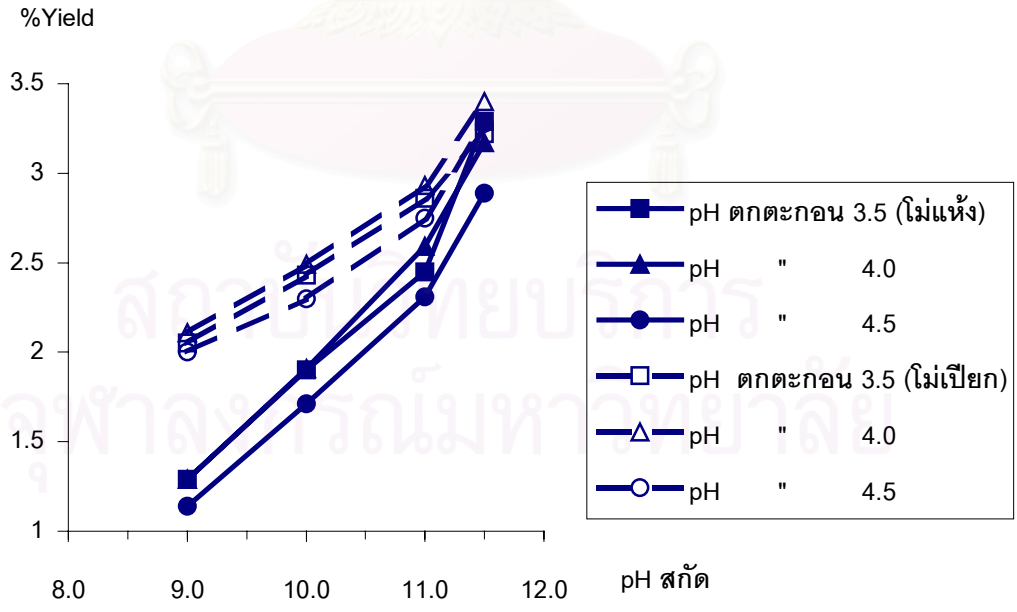
เมื่อคำนวณหา %yield ของโปรตีนที่สกัดได้จากแต่ละภาวะการสกัด พบว่า ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อค่า %yield ของโปรตีนที่สกัดได้จากแป้งโม่เปียกและแป้งโม่แห้งด้วยสารละลายด่าง ได้แก่ วิธีการโม่ pH ในการสกัด pH ในการตกตะกอน และอิทธิพลร่วมของทั้งสามปัจจัย (ตารางที่ ฉ. 2) โดยเมื่อ pH ในการสกัดสูงขึ้น %yield ของโปรตีนที่สกัดได้ทั้งจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งมีค่าเพิ่มมากขึ้น (ตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.2) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Wu (1978) และ Wu และ Stringfellow (1980) และที่ทุก pH ของการสกัด เมื่อ pH ของการตกตะกอนเท่ากับ 4.0 จะได้ปริมาณโปรตีนตกตะกอนมากที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะค่า pI ของโปรตีนในข้าวฟ่างที่ใช้มีค่าประมาณ pH 4.0 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Wu (1978) ที่พบว่า ค่า pI ของโปรตีนในข้าวฟ่าง 3 พันธุ์ที่ศึกษามีค่าอยู่ในช่วง pH 3.6-5.3 นอกจากนี้ % yield ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกจะมีค่าสูงกว่า %yield ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้ง และเมื่อคำนวณหา % protein recovery ของโปรตีนที่สกัดได้จากแต่ละภาวะการสกัด (ตารางที่ 4.4) พบว่า ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อค่า %protein recovery ของโปรตีนที่สกัดได้จากแป้งโม่เปียกและแป้งโม่แห้งด้วยสารละลายด่าง ได้แก่ วิธีการโม่ pH ในการสกัด pH ในการตกตะกอน และอิทธิพลร่วมระหว่างการโม่และ pH ในการสกัด (ตารางที่ ฉ.3) โดยเมื่อ pH ในการสกัดเพิ่มสูงขึ้นค่า %protein recovery ของโปรตีนที่สกัดได้ทั้งจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งมีค่าเพิ่มมากขึ้น และโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกมีค่า %protein recovery สูงกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งในทุกภาวะการสกัด (รูปที่ 4.3) โดยโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งที่ pH 11.5 และตกตะกอนที่ pH 4.0 จะมีค่า % protein recovery เท่ากับ 53.18 และ 38.03 % ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่า สารละลายด่างสามารถสกัดโปรตีนออกจากแป้งโม่เปียกได้มากกว่าแป้งโม่แห้ง เนื่องจากโปรตีนเมตริกซ์ในแป้งโม่เปียกอ่อนนุ่มกว่าโปรตีนเมตริกซ์ในแป้งโม่แห้ง เพราะการโม่เปียกจะมีการแช่น้ำและเติมโซเดียมไบซัลไฟต์ลงไป จึงช่วยให้การสกัดโปรตีนทำได้ง่ายกว่า (Watson, 1970) โปรตีนส่วนที่เหลืออาจอยู่ในแป้งเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นการเพิ่มเวลาในการสกัดโปรตีนให้นานขึ้น จึงอาจทำให้ได้ %yield ที่สูงขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 %Yield ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ

pH ตกตะกอน / pH สกัด	%Yield ของโปรตีน (%dry basis)		
	3.5	4.0	4.5
โม่แห้ง			
9.0	$1.29^{m} \pm 0.09$	$1.29^{m} \pm 0.04$	$1.14^{n} \pm 0.04$
10.0	$1.90^{k} \pm 0.06$	$1.91^{k} \pm 0.03$	$1.71^{l} \pm 0.05$
11.0	$2.45^{g} \pm 0.05$	$2.59^{f} \pm 0.06$	$2.31^{h} \pm 0.08$
11.5	$3.29^{b} \pm 0.04$	$3.29^{b} \pm 0.09$	$2.89^{d} \pm 0.08$
โม่เปียก			
9.0	$2.05^{ij} \pm 0.08$	$2.11^{i} \pm 0.07$	$2.00^{j} \pm 0.08$
10.0	$2.43^{g} \pm 0.07$	$2.49^{g} \pm 0.07$	$2.30^{h} \pm 0.08$
11.0	$2.86^{d} \pm 0.08$	$2.93^{d} \pm 0.07$	$2.75^{e} \pm 0.06$
11.5	$3.22^{bc} \pm 0.10$	$3.40^{a} \pm 0.10$	$3.28^{b} \pm 0.09$

a, b, c … ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



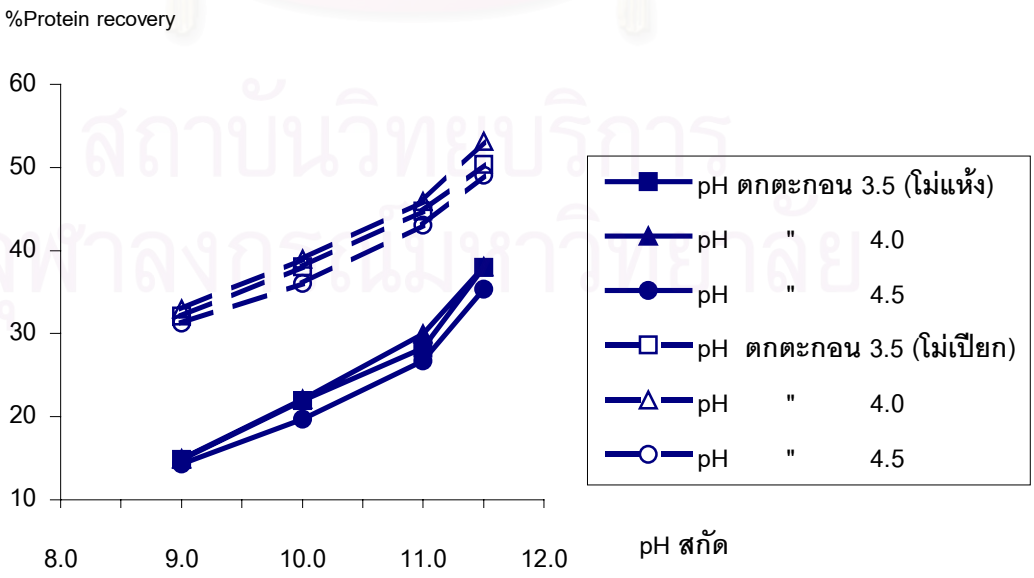
รูปที่ 4.2 %yield ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ

ตารางที่ 4.4 %Protein recovery ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ

pH ตกตะกอน / pH สกัด	%Protein recovery ของโปรตีน (%dry basis)		
	3.5[B]	4.0[A]	4.5[C]
โม่แห้ง			
9.0	14.88[g] ± 1.08	14.95[g] ± 0.55	13.19[g] ± 0.42
10.0	21.92[f] ± 0.64	22.11[f] ± 0.33	19.70[f] ± 0.54
11.0	28.29[e] ± 0.58	29.93[e] ± 0.65	26.68[e] ± 0.95
11.5	37.96[c] ± 0.44	38.03[c] ± 1.08	35.31[c] ± 4.60
โม่เปียก			
9.0	32.08[d] ± 1.20	32.98[d] ± 1.04	31.28[d] ± 1.32
10.0	38.04[c] ± 1.10	38.98[c] ± 1.04	36.06[c] ± 1.18
11.0	44.74[b] ± 1.26	45.90[b] ± 1.21	43.04[d] ± 0.89
11.5	50.34[a] ± 1.49	53.18[a] ± 1.01	49.05[a] ± 4.55

a, b, c…. ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งหมายถึง ค่า %Protein recovery ของโปรตีน มีความแตกต่างกันในวิธีการโม่และ pH ในการสกัด มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

A, B และ C ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอนหมายถึง ค่า %Protein recovery ของโปรตีน ที่ pH ในการตกตะกอนต่างกัน มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.3 %protein recovery ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ

4.2.2 การสกัดด้วยแอลกอฮอล์

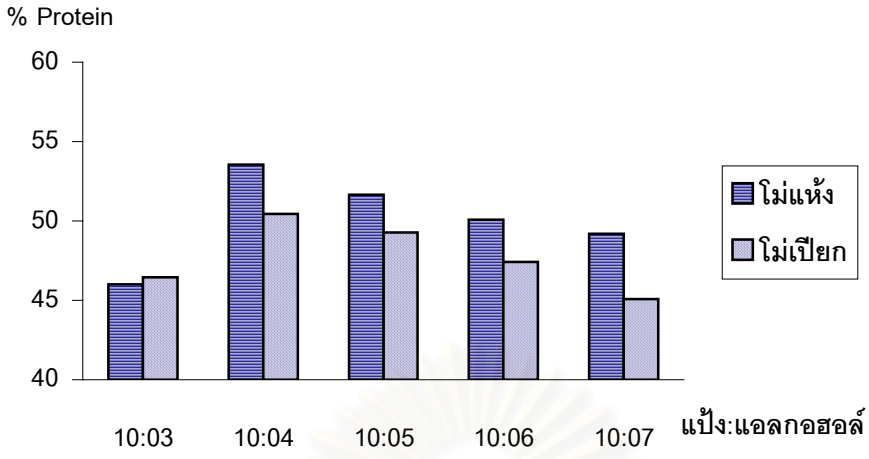
จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งด้วยเอทานอล 95% พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อค่าปริมาณโปรตีนของตะกอนโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งด้วยแอลกอฮอล์ได้แก่ วิธีการโม่ อัตราส่วนของแป้งต่อแอลกอฮอล์ และอิทธิพลร่วมของทั้งสองปัจจัย (ตารางที่ ฉ.4) โดยตะกอนโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งและโม่เปียกที่อัตราส่วน 1:4 จะมีปริมาณของโปรตีนสูงที่สุด ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.4) และปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีนที่สกัดได้มีค่าใกล้เคียงกับการทดลองของ Buffo และคณะ (1997) ที่สกัดคาเฟอรินจากโปรตีนของข้าวฟ่างและพบว่า คาเฟอรินที่สกัดได้มีปริมาณโปรตีนประมาณ 51% ซึ่งในตะกอนของคาเฟอรินที่สกัดได้จะมีน้ำตาลหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ เช่น กลูโคส ฟรุกโทส ราฟฟิโนส (raffinose) และสตาร์ซีโอส (starchyose) เนื่องจากน้ำตาลสามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่มีขั้ว ซึ่งแอลกอฮอล์มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) จึงทำให้น้ำตาลเหล่านี้ละลายปนออกมากับเอทานอล 95% ที่ใช้ (Watson, 1984)

ตารางที่ 4.5 ปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนต่างๆ

อัตราส่วนของ	ปริมาณโปรตีน (% dry basis)	
แป้ง : แอลกอฮอล์ (w/w)	แป้งโม่แห้ง	แป้งโม่เปียก
1:3	$46.01^{f} \pm 0.70$	$46.44^{f} \pm 0.59$
1:4	$53.55^{a} \pm 0.73$	$50.46^{c} \pm 0.40$
1:5	$51.67^{b} \pm 0.57$	$49.28^{d} \pm 0.60$
1:6	$50.09^{c} \pm 0.54$	$47.40^{e} \pm 0.56$
1:7	$49.20^{d} \pm 0.90$	$45.07^{g} \pm 0.63$

a, b, c … ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.4 ปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่อัตราส่วนต่างๆ

เมื่อคำนวณหา %yield ของโปรตีนที่สกัดได้ พบว่า ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อค่า % yield ของโปรตีนที่สกัดได้จากแป้งโม่เปียกและแป้งโม่แห้งด้วยเอทานอล 95% ได้แก่ วิธีการโม่ อัตราส่วนของแป้งต่อแอลกอฮอล์ และอิทธิพลร่วมของทั้งสองปัจจัย (ตารางที่ ฉ. 5) โดยที่อัตราส่วนของแป้งต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:4 จะสามารถสกัดโปรตีนจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งได้มากกว่าที่อัตราส่วนอื่น (ตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.5) ซึ่งผลที่ได้แตกต่างจาก Buffo และคณะ (1997) ที่สกัดคาเฟอรินจากโปรตีนของข้าวฟ่างและพบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมคือ 1:5 (w/w) นอกจากนี้ %yield ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งจะมีค่าสูงกว่า %yield ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลของค่าปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีน แต่ตรงข้ามกับค่า %yield ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่าง อาจเป็นเพราะการโม่เปียกทำให้แกมมาคาเฟอรินซึ่งสามารถละลายน้ำได้บางส่วนละลายออกจากโปรตีนในแป้งไปกับน้ำที่ใช้ในการโม่ (Watterson et al., 1993; Mazhar et al., 1993) ทำให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในแอลกอฮอล์ในแป้งโม่เปียกน้อยกว่าแป้งโม่แห้ง และเมื่อคำนวณหา %protein recovery ของโปรตีนที่สกัดได้ (ตารางที่ 4.7) พบว่า ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อค่า %protein recovery ของโปรตีนที่สกัดได้จากแป้งโม่เปียกและแป้งโม่แห้งด้วยเอทานอล 95%ได้แก่ วิธีการโม่ อัตราส่วนของแป้งต่อแอลกอฮอล์ และอิทธิพลร่วมของทั้งสองปัจจัย (ตารางที่ ฉ.6) โดยโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งที่อัตราส่วนแป้งต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:4 จะมีค่า %protein recovery สูงสุด คือ 21.55 และ 20.60% ตามลำดับ (รูปที่ 4.6) โดยโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกมีค่า %protein recovery สูงกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งในทุกภาวะการสกัด ($p \leq 0.05$) เนื่องจาก $NaHSO_3$ ที่เติมลงไปในขั้นตอนการแช่น้ำจะช่วยให้เมตริกซ์ของโปรตีนนุ่มขึ้น การสกัดโปรตีนทำได้ดีขึ้น (Watson, 1970) และแนวโน้มของค่า %protein recovery ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์จาก

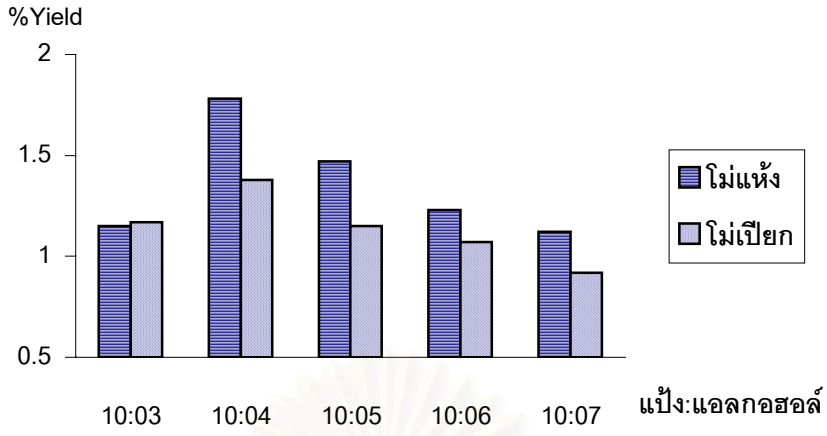
แป้งโม่เปียกและโม่แห้งสอดคล้องกับโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่าง เนื่องจากโปรตีนที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้งสองชนิดสกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งชนิดเดียวกัน สารละลายโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์จะมีการเติมน้ำลงไป 2 เท่าของน้ำหนักสารละลาย เพื่อช่วยให้โปรตีนตกตะกอนมากขึ้น เนื่องจากความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้เปลี่ยนไป แม้ว่าโปรตีนจากแป้งข้าวฟ่างจะละลายได้ดีที่เอทานอลความเข้มข้น 70% (Buffo et al., 1997; Raton, 1996) แต่เลือกใช้เอทานอลความเข้มข้น 95% ในการสกัด เพราะถ้าแอลกอฮอล์เจือจางมากขึ้นจะมีส่วนของน้ำมากขึ้น และในการสกัดจะสกัดที่อุณหภูมิ 65°C ซึ่งสตาร์ชในแป้งจะมีโอกาสเกิดการเจลาติไนซ์ (gelatinization) มากขึ้น (Buffo et al., 1997) ทำให้การสกัดโปรตีนทำได้ยากขึ้น โดยอุณหภูมิเริ่มต้นในการเกิดการเจลาติไนซ์ของสตาร์ชข้าวฟ่างจนถึงการเกิดการเจลาติไนซ์สมบูรณ์ คือ 68-76°C (Martin, 1970) ซึ่งโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างและแอลกอฮอล์น่าจะเป็นโปรตีนคนละชนิดกัน ดังนั้นจึงตรวจหาขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนที่สกัดได้โดยวิธี SDS-PAGE

ตารางที่ 4.6 %Yield ของโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนต่างๆ

อัตราส่วนของ	%Yield ของโปรตีน (%dry basis)	
แป้ง : แอลกอฮอล์ (w/w)	แป้งโม่แห้ง	แป้งโม่เปียก
1:3	$1.22^{c} \pm 0.03$	$1.17^{cd} \pm 0.09$
1:4	$1.78^{a} \pm 0.11$	$1.38^{b} \pm 0.11$
1:5	$1.47^{b} \pm 0.12$	$1.15^{cd} \pm 0.10$
1:6	$1.23^{c} \pm 0.08$	$1.07^{d} \pm 0.04$
1:7	$1.12^{d} \pm 0.07$	$0.92^{e} \pm 0.04$

a, b, c … ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

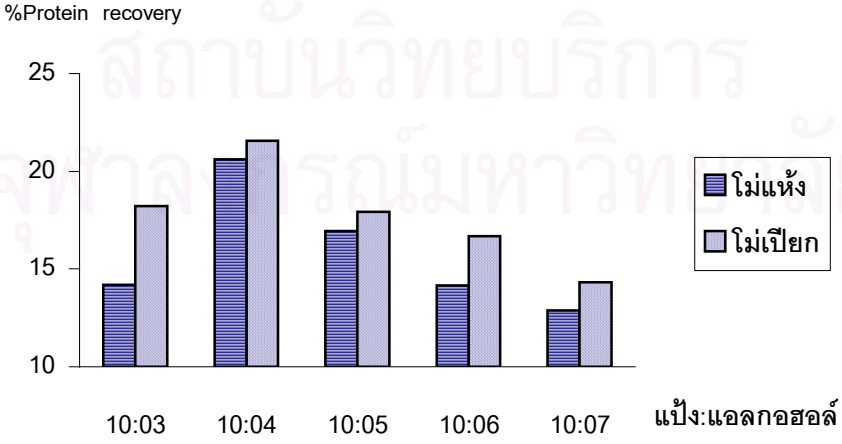


รูปที่ 4.5 %yield ของโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่อัตราส่วนต่างๆ

ตารางที่ 4.7 %Protein recovery ของโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนต่างๆ

อัตราส่วนของ	%Protein recovery ของโปรตีน (%dry basis)	
แป้ง : แอลกอฮอล์ (w/w)	แป้งโม่แห้ง	แป้งโม่เปียก
1:3	$14.18^{d} \pm 0.32$	$18.23^{b} \pm 1.41$
1:4	$20.60^{a} \pm 1.30$	$21.55^{a} \pm 1.66$
1:5	$16.94^{bc} \pm 1.39$	$17.94^{bc} \pm 1.59$
1:6	$14.17^{d} \pm 0.90$	$16.69^{c} \pm 0.62$
1:7	$12.88^{d} \pm 0.83$	$14.32^{d} \pm 0.55$

a, b, c … ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

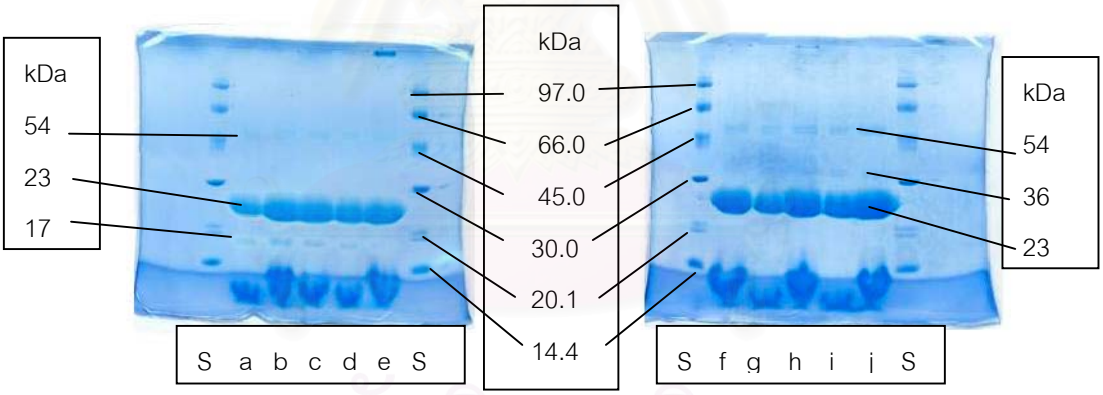


รูปที่ 4.6 %protein recovery ของโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่อัตราส่วนต่างๆ

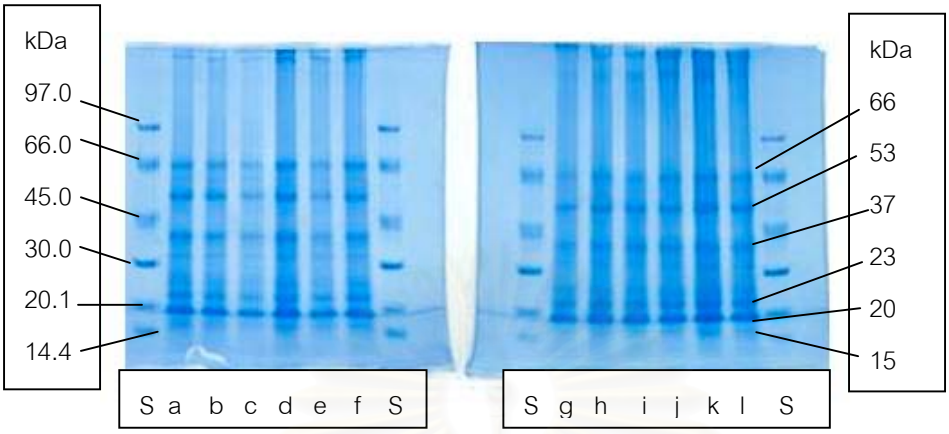
4.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

จากการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE พบว่า โปรตีนที่สกัดได้จากข้าวฟ่างด้วยแอลกอฮอล์และสารละลายด่าง มีขนาดของน้ำหนักโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกัน (รูปที่ 4.7-4.9) ซึ่งแสดงว่า เป็นโปรตีนคนละชนิดกัน โดยโปรตีนสกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งด้วยแอลกอฮอล์มีขนาดของน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันเล็กน้อย โปรตีนที่สกัดได้จากแป้งโม่เปียกจะมีโมเลกุลขนาด 23, 36 และ 54 kDa เป็นองค์ประกอบ ขณะที่โปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งจะมีโมเลกุลขนาด 17, 23, และ 54 kDa เป็นองค์ประกอบ โดยโมเลกุลหลัก (major component) ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนจะมีขนาดเท่ากับ 23 kDa เหมือนกัน จากการทดลองของ Watterson และคณะ (1993) พบว่า แอลฟาคาเฟอรินจะมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 23 และ 25 kDa เบต้าคาเฟอรินจะมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 20 kDa และแกมมาคาเฟอรินจะมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 28 kDa โดยเอนโดสเปอร์มแบบขุ่นจะมีแอลฟา- เบต้า- และแกมมาคาเฟอรินประมาณ 80-84, 7-8 และ 9-12% ตามลำดับ ส่วนเอนโดสเปอร์มแบบใสจะมีแอลฟา- เบต้า- และแกมมาคาเฟอรินประมาณ 66-71, 10-13 และ 9-12% ตามลำดับ และการทดลองของ Mazhar และคณะ (1993) ที่ได้แยกและตรวจหาลักษณะของคาเฟอรินจากข้าวฟ่างพันธุ์ *Sorghum bicolor* (L.) Moench ที่พบว่า แอลฟาคาเฟอรินจะมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 22 และ 28 kDa เบต้าคาเฟอรินจะมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 19 kDa และแกมมาคาเฟอรินจะมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 27 kDa ดังนั้นโปรตีนที่สกัดจากทั้งแป้งโม่เปียกและโม่แห้งด้วยแอลกอฮอล์น่าจะเป็นโปรตีนประเภทคาเฟอริน ส่วนการที่ตรวจพบโมเลกุลขนาด 54 kDa ด้วยนั้น เป็นเพราะกลูเตลินในข้าวฟ่างมีส่วนของพอลิเปปไทด์ที่สามารถละลายได้ทั้งในน้ำและในแอลกอฮอล์ซึ่งเรียกว่า alcohol-soluble reduced glutelin (ASRG) หรือ reduced soluble protein (RSP) ซึ่งเป็นส่วนที่โมเลกุลมีขนาดใหญ่ (Shull, Watterson and Kirleis, 1991) โดย Evans, Schussler และ Taylor (1987) ได้แยกส่วนของ reduced soluble protein จากเอนโดสเปอร์มของข้าวฟ่างและพบว่า มีโมเลกุล 28 kDa เป็นองค์ประกอบหลัก และโมเลกุลขนาด 49 kDa เป็นองค์ประกอบรอง ส่วนโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งจะมีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 15-66 kDa และประกอบด้วยโมเลกุลหลักที่มีขนาดเท่ากัน คือ 20, 23, 37, 53 และ 66 kDa สอดคล้องกับผลการทดลองของ Watterson และคณะ (1993) ที่ได้ตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้จากข้าวฟ่างและพบว่า ขนาดโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบหลักในกลูเตลินจะอยู่ในช่วง 18-24 และ 45-60 kDa ซึ่งโมเลกุลที่มีขนาด 60 kDa จะพบในเอนโดสเปอร์มของข้าวฟ่างที่มีเนื้อขุ่น (opaque endosperm) และจะพบน้อยมากหรือไม่พบในเอนโดสเปอร์มที่มีเนื้อใส (vitreous

endosperm) ซึ่งผลดังกล่าวใกล้เคียงกับผลการทดลองที่ได้ ดังนั้นโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างน่าจะเป็นโปรตีนประเภทกลูเตลิน ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่เนื่องจากประกอบไปด้วยสายโพลีเปปไทด์หลายสายต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ที่เชื่อมต่อระหว่างโมเลกุล (Watson, 1970) ทั้งโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์และสารละลายด่างจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งจะมีขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบย่อยแตกต่างกันเล็กน้อย (รูปที่ 4.8 และ 4.9) อาจเป็นเพราะผลของการเติมโซเดียมไบซัลไฟต์ในน้ำที่ใช้แช่ข้าวฟ่างในขั้นตอนการโม่เปียก ซึ่งโซเดียมไบซัลไฟต์จะตัดพันธะไดซัลไฟด์ทั้งในสายโปรตีนเดียวกันและระหว่างสายโปรตีน (Watterson et al., 1993; Mazhar et al., 1993) จึงอาจทำให้โปรตีนที่ละลายน้ำได้ออกไปกับน้ำที่ใช้ในการโม่ โปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่เปียกจึงมีโปรตีนที่มีขนาดเล็กซึ่งมีขนาดโมเลกุลประมาณ 20-45 kDa และเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบย่อยอยู่น้อยกว่าโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่แห้ง

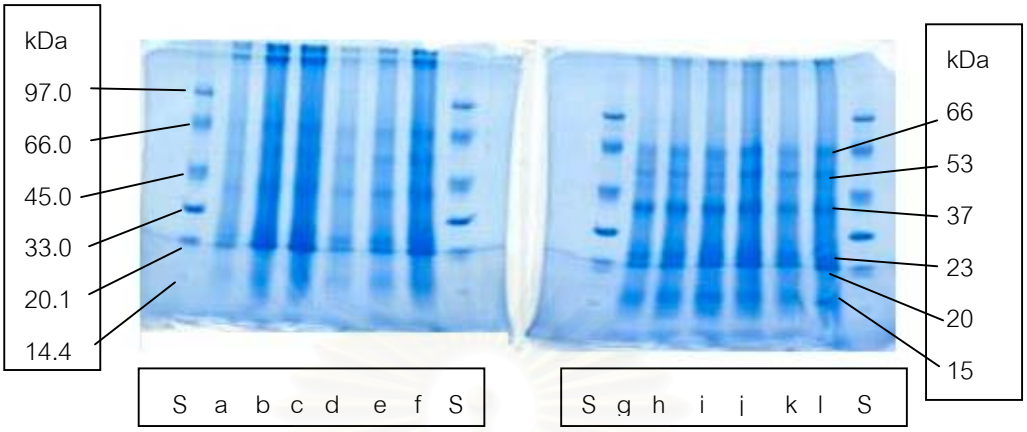


รูปที่ 4.7 SDS-PAGE pattern ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์จากแป้งโม่แห้ง ที่อัตราส่วนแป้งต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:3 (a), 1:4 (b), 1:5 (c),1:6 (d) และ 1:7 (e) (ภาพซ้าย) และโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียก ที่อัตราส่วนแป้งต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ1:3 (f), 1:4 (g), 1:5 (h),1:6 (i) และ 1:7 (j) (ภาพขวา) S คือ molecular weight marker ปริมาณโปรตีนต่อ well เท่ากับ 10 ไมโครกรัม



รูปที่ 4.8 SDS-PAGE pattern ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งด้วยสารละลายด่างที่ pH 9 ตกตะกอนที่ pH 3.5 (a), 4.0 (b) และ 4.5 (c) สกัดที่ pH10 ตกตะกอนที่ pH 3.5 (d), 4.0 (e) และ 4.5 (f) (รูปซ้าย) สกัดที่ pH11 ตกตะกอนที่ pH 3.5 (g), 4.0 (h) และ 4.5 (i) และสกัดที่ pH11.5 ตกตะกอนที่ pH 3.5 (j), 4.0 (k) และ 4.5 (l) (รูปขวา) S คือ molecular weight marker ปริมาณโปรตีนต่อ well เท่ากับ 10 ไมโครกรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.9 SDS-PAGE pattern ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกด้วยสารละลายด่างที่ pH 9 ตกตะกอนที่ pH 3.5 (a), 4.0 (b) และ 4.5 (c) สกัดที่ pH10 ตกตะกอนที่ pH 3.5 (d), 4.0 (e) และ 4.5 (f) (รูปซ้าย) สกัดที่ pH11 ตกตะกอนที่ pH 3.5 (g), 4.0 (h) และ 4.5 (i) และสกัดที่ pH11.5 ตกตะกอนที่ pH 3.5 (j), 4.0 (k) และ 4.5 (l) (รูปขวา) S คือ molecular weight marker ปริมาณโปรตีนต่อ well เท่ากับ 10 ไมโครกรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน

เมื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่อยู่ในรูป L-configuration ซึ่งเป็นรูปของกรดอะมิโนที่พบในธรรมชาติ (Damodaran, 1996) ในเมล็ดข้าวฟ่าง แป้งโม่เปียกและโม่แห้ง โปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งและโม่เปียกที่ pH 11.5 และตกตะกอนที่ pH 4.0 และโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งและโม่เปียกด้วยเอทานอลที่อัตราส่วน 1:4 พบว่า เมล็ดข้าวฟ่าง แป้งโม่เปียกและโม่แห้งมีสัดส่วนของกรดอะมิโนแต่ละชนิดใกล้เคียงกัน โปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกด้วยสารละลายด่างหรือแอลกอฮอล์จะมีปริมาณกรดอะมิโนที่ชอบน้ำ ได้แก่ กรดอะมิโนที่มีความเป็นกรด (กรดแอสปาติกและกรดกลูตามิก) กรดอะมิโนที่มีความเป็นด่าง (ไลซีน อีสทีดีน และอาร์จีนีน) และกรดอะมิโนที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (ซีรีน ธรีโอนีน และไทโรซีน) รวมกันสูงกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้ง โปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์จะประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ ได้แก่ ไกลซีน อลานีน โพรลีน วาลีน ไอโซลูซีน ลูซีน และฟีนิลอลานีน รวมกันสูงกว่าโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่าง (ตารางที่ 4.8) เนื่องจากกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำจะละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ (Wall and Blessin,1970) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทำ SDS-PAGE (รูปที่ 4.7-4.9) ที่พบว่าโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างและแอลกอฮอล์จะมีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Youssef (1998) ที่พบว่าโปรตีนที่สกัดด้วยด่างเป็นกลูเตลิน และโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์เป็นคาเฟอริน เมื่อพิจารณาปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดในข้าวฟ่าง แป้งที่ได้จากการโม่เปียกและโม่แห้ง พบว่า กรดอะมิโนที่มีปริมาณสูง ได้แก่ กลูตามิก อลานีน โพรลีน และลูซีน ซึ่งผลที่ได้มีแนวโน้มที่คล้ายคลึงกับผลการทดลองของ Virupaksha และ Sastry (1968) ที่พบว่า สัดส่วนของกรดอะมิโนแต่ละชนิดในข้าวฟ่างแต่ละพันธุ์มีแนวโน้มที่คล้ายคลึงกัน เมื่อพิจารณาปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดในโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างและแอลกอฮอล์ พบว่ากรดอะมิโนที่มีปริมาณสูงในโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งด้วยสารละลายด่าง ได้แก่ กรดแอสปาติก กรดกลูตามิก อาร์จีนีน และลูซีน นอกจากนี้ยังตรวจพบซิสตีน และเมไธโอนีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ส่วนกรดอะมิโนที่มีปริมาณสูงในโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งด้วยแอลกอฮอล์ ได้แก่ กรดกลูตามิก อลานีน โพรลีน และลูซีน และยังตรวจพบเมไธโอนีนซึ่งมีปริมาณต่ำกว่าในโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่าง และผลที่ได้มีความคล้ายคลึงกับไกลอะดินซึ่งเป็นโปรตีนที่ละลายได้ในแอลกอฮอล์หรือโพรลามินที่อยู่ในข้าวสาลี และประกอบด้วยกรดกลูตามิก โพรลีน และลูซีนในปริมาณสูง และมีปริมาณของเมไธโอนีนต่ำกว่ากลูเตนิน (ตารางที่ 4.9) (Kent, 1983)โปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งด้วยสารละลายด่างหรือแอลกอฮอล์จะมีปริมาณของเมไธโอนีนสูงกว่าแป้งที่ผ่านการโม่เปียกและโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียก และโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่แห้งจะมีปริมาณของซิสตีนสูงกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียก ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Youssef (1998) ที่พบว่า กลูเต

ลินมีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่าคาเฟอรินเนื่องจากประกอบด้วยกรดอะมิโนจำเป็นสูงกว่า และคาเฟอรินเป็นโปรตีนที่มีคุณค่าทางโภชนาการด้อยกว่าโปรตีนชนิดอื่น ๆ ในข้าวฟ่าง เนื่องจากมีกรดอะมิโนจำเป็นอยู่น้อยกว่าอัลบูมิน โกลบูลิน และกลูเตนิน ตามลำดับ

ตารางที่ 4.8 ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในข้าวฟ่าง แป้ง และโปรตีนสกัด

กรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโน (g / 100 g protein)						
	ข้าวฟ่าง	WSF[1]	DSF[1]	APW[1]	APD[1]	SPW[1]	SPD[1]
แอสปาติก	6.41	5.93	6.68	7.97	7.80	6.44	6.14
ซีรีน	4.60	4.38	4.76	5.37	5.02	3.88	3.73
กลูตามิก	21.78	22.71	21.18	16.02	15.71	27.60	27.45
ไกลซีน	3.42	2.86	3.63	5.68	5.79	1.00	1.33
ฮีสทีดีน*	2.39	2.39	2.62	3.96	3.58	1.26	1.20
อาร์จีนีน	3.82	3.32	4.50	9.43	9.22	1.70	1.93
ธรีโอนีน*	3.34	3.66	3.84	4.39	4.31	2.57	2.63
อลานีน	9.36	9.73	9.15	6.25	6.60	10.88	11.15
โพรลีน	8.78	8.58	8.27	5.94	5.85	8.06	8.31
ซีสตีน	ND	ND	ND	1.75	2.41	ND	ND
ไทโรซีน	3.10	3.24	3.14	3.49	3.70	4.01	4.29
วาลีน*	5.30	5.06	5.07	6.07	5.68	4.63	4.67
เมไธโอนีน*	0.66	0.34	1.24	2.06	2.12	0.16	0.66
ไลซีน*	2.66	2.44	2.71	4.41	4.75	0.55	0.07
ไอโซลูซีน*	4.94	5.17	4.65	4.37	4.12	4.37	4.14
ลูซีน*	12.92	13.82	12.39	7.94	8.20	16.62	16.41
ฟีนิลอลานีน*	6.52	6.33	6.18	4.88	5.19	6.24	5.87

* กรดอะมิโนจำเป็น

[1] WSF หมายถึง แป้งที่ผ่านการโม่เปียก

DSF หมายถึง แป้งที่ผ่านการโม่แห้ง

APW หมายถึง โปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกด้วยสารละลายด่างที่ pH 11.5 และตกตะกอนที่ pH 4.0

APD หมายถึง โปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งด้วยสารละลายด่างที่ pH 11.5 และตกตะกอนที่ pH 4.0

SPW	หมายถึง	โปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกด้วยแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน 1:4
SPD	หมายถึง	โปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งด้วยแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน 1:4
ND	หมายถึง	ตรวจไม่พบ (not determined)

ตารางที่ 4.9 ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในโปรตีนจากข้าวสาลี

กรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโน (g / 100 g protein)			
	กลูเตนิน[1]	ไกลอะดิน[1]	อัลบูมิน	โกลบูลิน
แอสปาติก	3.9	3.0	7.9	6.3
ซีรีน	5.9	5.1	4.7	9.1
กลูตามิก	34.1	40.0	17.7	5.9
ไกลซีน	4.5	1.8	3.1	5.6
ฮีสทีดีน*	2.4	2.3	4.3	2.2
อาร์จีนีน	4.2	2.7	7.5	14.5
ธรีโอนีน*	3.3	2.3	2.9	4.5
อลานีน	3.1	2.3	5.6	4.3
โพรลีน	11.0	14.7	8.4	3.3
ซีสตีน	2.5	3.1	6.7	12.6
ไธโรซีน	3.6	2.6	3.4	2.3
วาลีน*	4.5	4.4	8.1	2.2
เมไธโอนีน*	1.7	1.5	0	0.4
ไลซีน*	2.3	0.7	11.2	12.2
ไอโซลูซีน*	3.9	4.5	4.1	1.4
ลูซีน*	6.9	7.2	10.7	9.2
ฟีนิลอลานีน*	4.8	5.6	5.0	3.2
ทริปโตเฟน*	2.1	0.7	ND	ND

ที่มา : Kent (1983)

* กรดอะมิโนจำเป็น

[1]กลูเตนิน	โปรตีนจากข้าวสาลีที่ละลายได้ในสารละลายกรดหรือด่างเจือจาง (Kent, 1983)	
ไกลอะดิน	โปรตีนจากข้าวสาลีที่ละลายได้ในแอลกอฮอล์ (Kent, 1983)	
ND	หมายถึง	ตรวจไม่พบ

4.5 การวัดสมบัติเชิงหน้าที่

4.5.1 สมบัติด้านการจับน้ำ (Water Holding Capacity, WHC)

เมื่อคำนวณหาค่า WHC ต่อกรัมโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้ง พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อค่า WHC ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้ง ได้แก่ วิธีการโม่ pHในการสกัด pHในการตกตะกอน อิทธิพลร่วมระหว่างการโม่และ pHในการสกัด และอิทธิพลร่วมของการโม่และ pHในการตกตะกอน (ตารางที่ ฉ.7) โดยเมื่อ pH ในการสกัดสูงขึ้น ค่า WHC ของโปรตีนที่สกัดได้จากแป้งโม่แห้งมีค่าลดลง (ตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.10) อาจเป็นเพราะเมื่อ pH ในการสกัดสูงขึ้นจะทำให้โปรตีนที่สกัดได้เกิดการเสียสภาพมากขึ้น (Wu and Stringfellow, 1980) จึงทำให้ค่า WHC ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งที่ pH 9.0 มีค่าสูงกว่าโปรตีนที่สกัดที่ภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และโปรตีนที่ตกตะกอนที่ pH 4.5 จะมีค่า WHC สูงกว่าโปรตีนที่ตกตะกอนที่ภาวะอื่น ส่วนโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งและตกตะกอนที่ pH 4.0 จะมีค่า WHC ต่ำกว่าโปรตีนที่ตกตะกอนที่ pH 4.5 และ 3.5 ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นเพราะที่ pH 4.0 เป็น pI ของโปรตีนในข้าวฟ่าง เนื่องจากที่ pI โปรตีนจะมี interaction ระหว่างโปรตีนด้วยกันเองสูงและมี interaction ระหว่างโปรตีนกับน้ำน้อย (Damodaran, 1996) นอกจากนี้ยังพบว่า โปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกมีค่า WHC ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งมีค่า WHC สูงกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกในทุกภาวะการสกัด ถึงแม้ว่าโปรตีนที่สกัดด้วยได้จากแป้งโม่เปียกจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่ชอบน้ำโดยรวมสูงกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้ง แต่อาจเป็นเพราะสายเปปไทด์ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งเกิดการคลายเกลียวและหันส่วนที่ชอบน้ำออกมาด้านนอกมากกว่าสายเปปไทด์ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียก และผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Vioque และคณะ (1999)ที่พบว่า การเติมซัลไฟต์ในขั้นตอนการสกัดโปรตีนด้วยสารละลายด่างจะทำให้โปรตีนที่สกัดได้มีความสามารถในการจับน้ำและจับน้ำมันได้ต่ำกว่าโปรตีนที่ไม่มีการเติมซัลไฟต์ในขั้นตอนการสกัด ซึ่งแป้งโม่เปียกจะมีการเติมโซเดียมไบซัลไฟต์ในขั้นตอนการแช่น้ำ เมื่อเปรียบเทียบค่า WHC ของโปรตีนที่สกัดได้กับ SPI ซึ่งมีค่า WHC เท่ากับ 8.88 ± 0.25 (g water / g dry protein) จะเห็นได้ว่า โปรตีนที่สกัดได้จากแป้งโม่แห้งที่บางภาวะมีค่า WHC สูงกว่า SPI และค่า WHC ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกมีค่าต่ำกว่า SPI

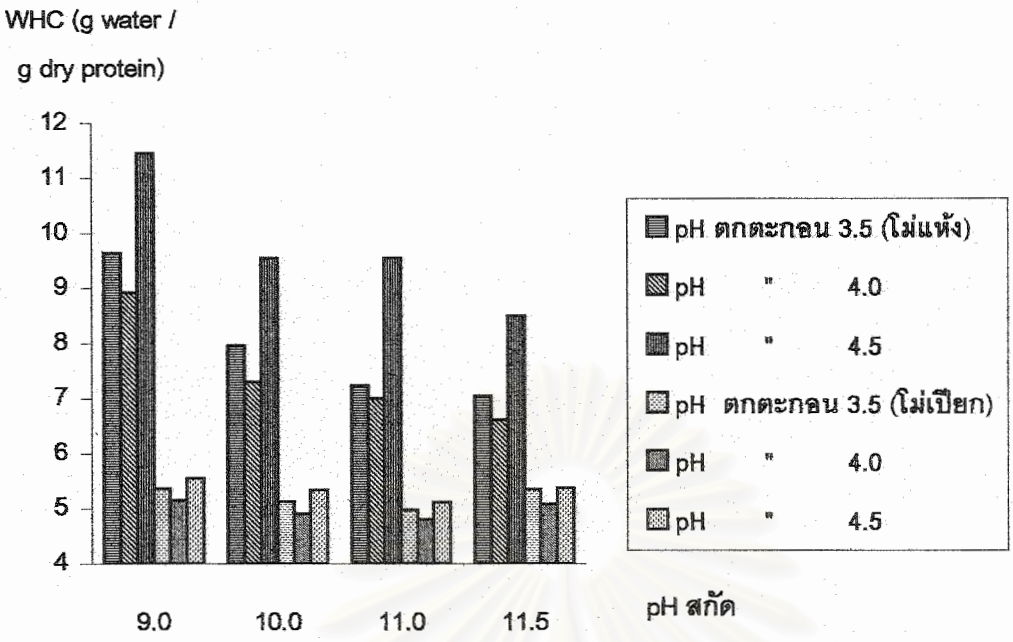
ตารางที่ 4.10 ค่า WHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ

pH ตกตะกอน / pH สกัด	WHC (g water / g dry protein)		
	3.5	4.0	4.5
โม่แห้ง			
9.0	$9.64^{aB} \pm 0.61$	$8.92^{aC} \pm 0.59$	$11.46^{aA} \pm 0.63$
10.0	$7.97^{bB} \pm 0.30$	$7.30^{bC} \pm 0.36$	$9.54^{bA} \pm 0.32$
11.0	$7.23^{cB} \pm 0.15$	$7.00^{cC} \pm 0.34$	$8.67^{cA} \pm 0.33$
11.5	$7.05^{cB} \pm 0.19$	$6.61^{cC} \pm 0.23$	$8.49^{cC} \pm 0.27$
โม่เปียก			
9.0	$5.36^{dD} \pm 0.25$	$5.15^{dD} \pm 0.26$	$5.54^{dD} \pm 0.25$
10.0	$5.13^{dD} \pm 0.27$	$4.90^{dD} \pm 0.20$	$5.33^{dD} \pm 0.28$
11.0	$4.97^{dD} \pm 0.26$	$4.80^{dD} \pm 0.22$	$5.11^{dD} \pm 0.17$
11.5	$5.35^{dD} \pm 0.26$	$5.08^{dD} \pm 0.33$	$5.37^{dD} \pm 0.27$

a, b, c.... ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งหมายถึง ค่า WHC ของโปรตีนที่มีความแตกต่างกันในวิธีการโม่และ pH ในการสกัด มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

A, B, C....ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอนหมายถึง ค่า WHC ของโปรตีนที่มีความแตกต่างกันในวิธีการโม่และ pH ในการตกตะกอน มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.10 ค่า WHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ

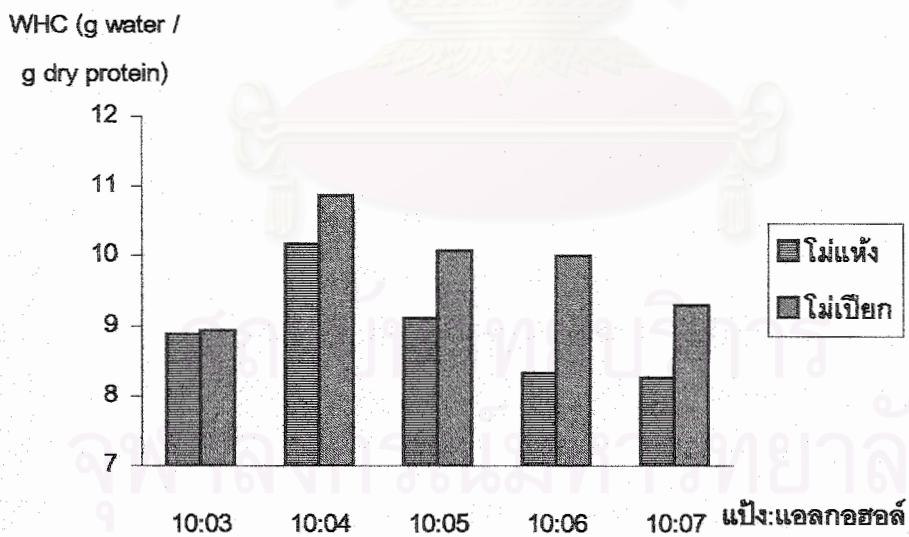
เมื่อคำนวณหาค่า WHC ต่อกรัมโปรตีนที่สกัดด้วยเอทานอล 95% จากแป้งโม่เปียกและโม่แห้ง พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อค่าWHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์จากแป้งโม่เปียกและโม่แห้ง ได้แก่ วิธีการโม่ อัตราส่วนของแป้งต่อแอลกอฮอล์ และอิทธิพลร่วมของทั้งสองปัจจัย (ตารางที่ ฉ.8) โดยโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์จากแป้งโม่เปียกที่อัตราส่วนแป้งต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:4 จะมีค่า WHC สูงที่สุด และโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกในทุกอัตราส่วนของแป้งต่อแอลกอฮอล์จะมีค่า WHC สูงกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้ง ($p \leq 0.05$) ซึ่งอาจเป็นเพราะโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกประกอบกรดอะมิโนประเภทชอบน้ำโดยรวมสูงกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้ง (ตารางที่ 4.8) โปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งที่อัตราส่วน 1:4 จะมีค่า WHC สูงกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งที่อัตราส่วนอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.11 และรูปที่ 4.11) ถึงแม้ว่าโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์จะประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำในปริมาณมากกว่าโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่าง เนื่องจากกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำจะละลายได้ดีในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (Wall and Blessin, 1970) แต่ค่า WHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ส่วนใหญ่มีค่าสูงกว่าโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่าง อาจเพราะเป็นโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ประกอบด้วยกรดกลูตามิกและไทโรซีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีความชอบน้ำสูงกว่ากรดอะมิโนที่ชอบน้ำชนิดอื่นในปริมาณที่สูงโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างมาก (ตารางที่ 4.8) จึงทำให้สามารถจับน้ำได้ดีกว่า เนื่องจากกรดกลูตามิกและไทโรซีนอย่างละ 1 โมเลกุล สามารถจับน้ำได้ 7 โมเลกุล ขณะที่กรดแอสปาติก ไลซีน อีสทีดีน อาร์จีนีน โพรลามีน ซีรีน

ทรีโอนีน กลูตามีน และแอสพาราจีนอย่างละ 1 โมเลกุล สามารถจับน้ำได้ 6, 4, 4, 3 ,3, 2, 2, 2 และ 2 โมเลกุล ตามลำดับ (Damodaran, 1996; Barbut, 1996) และเมื่อเปรียบเทียบค่า WHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์กับ SPI พบว่า โปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ทั้งจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งส่วนใหญ่มีค่า WHC สูงกว่า SPI

ตารางที่ 4.11 ค่า WHC ของโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนต่างๆ

อัตราส่วนของ	WHC (g water /g dry protein)	
แป้ง : แอลกอฮอล์ (w/w)	แป้งโม่แห้ง	แป้งโม่เปียก
1:3	$8.88^{cde} \pm 0.72$	$8.93^{cd} \pm 0.26$
1:4	$10.16^{b} \pm 0.52$	$10.86^{a} \pm 0.44$
1:5	$9.11^{c} \pm 0.52$	$10.07^{b} \pm 0.37$
1:6	$8.33^{de} \pm 0.79$	$9.99^{b} \pm 0.25$
1:7	$8.26^{e} \pm 0.71$	$9.29^{c} \pm 0.46$

a, b, c ... ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.11 ค่า WHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่อัตราส่วนต่างๆ

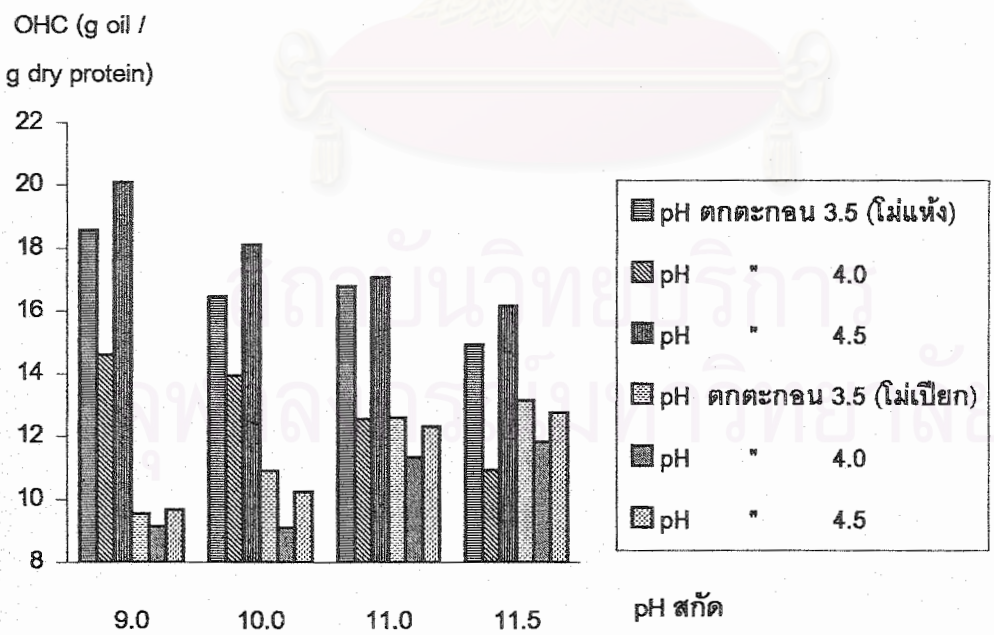
4.5.2 สมบัติด้านการจับน้ำมัน (Oil Holding Capacity, OHC)

เมื่อคำนวณหาค่า OHC ต่อกรัมโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งในแต่ละภาวะการสกัด พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อค่า OHC ของโปรตีนที่สกัดได้จากแป้งโม่เปียกและแป้งโม่แห้ง ได้แก่ วิธีการโม่ pH ในการสกัด pH ในการตกตะกอน และอิทธิพลร่วมของทั้งสามปัจจัย (ตารางที่ ฉ.9) โดยเมื่อ pH ในการสกัดโปรตีนเพิ่มสูงขึ้น ค่า OHC ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งมีค่าลดลง ขณะที่ OHC ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกมีค่าเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.12 และรูปที่ 4.12) อาจเป็นเพราะโปรตีนในแป้งโม่แห้งเกิดการเสียสภาพมากกว่าโปรตีนในแป้งโม่เปียกเนื่องจากความร้อนที่เกิดจากแรงเสียดทานในขณะที่โม่ ในขณะที่แป้งโม่เปียกจะมีการเติมน้ำลดไปช่วยลดความร้อน (Chen, Lu and Lii, 1999) และเมื่อนำแป้งโม่แห้งและโม่เปียกไปสกัดโปรตีน โปรตีนที่สกัดได้จากแป้งโม่แห้งจะมีส่วนที่เกิดการเสียสภาพมากกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียก โดยเมื่อ pH ในการสกัดโปรตีนสูงขึ้น จะทำให้โปรตีนที่สกัดได้เกิดการเสียสภาพมากขึ้น (Wu and Stringfellow, 1980) เมื่อ pH ของการตกตะกอนเท่ากับ 4.5 ค่า OHC ของโปรตีนที่สกัดได้จากแป้งโม่แห้งมีค่าสูงกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งที่ตกตะกอนที่ pH อื่น ขณะที่ pH ของการตกตะกอนเท่ากับ 3.5 ค่า OHC ของโปรตีนที่สกัดได้จากแป้งโม่เปียกมีค่าสูงกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกที่ตกตะกอนที่ pH อื่น อาจเป็นเพราะโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งมีสัดส่วนของกรดอะมิโนแต่ละประเภทที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.8) ทำให้ pH ที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนที่มีความสามารถในการจับน้ำมันจึงแตกต่างกัน ที่ภาวะการสกัดเดียวกัน พบว่า โปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่แห้งมีค่า OHC สูงกว่าโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่เปียก อาจเป็นเพราะโปรตีนที่สกัดได้จากแป้งโม่แห้งประกอบด้วยกรดอะมิโนประเภทไม่ชอบน้ำสูงกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียก และผลที่ได้คล้ายคลึงกับผลการทดลองของ Vioque และคณะ (1999) ที่พบว่า การเติมซัลไฟต์ในขั้นตอนการสกัดโปรตีนจะทำให้โปรตีนที่สกัดได้มีความสามารถในการจับน้ำมันต่ำกว่าโปรตีนที่ไม่มีการเติมซัลไฟต์ในขั้นตอนการสกัด และเมื่อเปรียบเทียบค่า OHC ของโปรตีนที่สกัดได้กับ SPI ซึ่งมีค่า OHC เท่ากับ 2.77 $\pm$ 0.47 (g oil / g dry protein) จะเห็นได้ว่า โปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่แห้งและโม่เปียกมีค่า OHC สูงกว่า SPI มาก เพราะโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างเป็นประเภทกลูเตลินซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนประเภทไม่ชอบน้ำสูงกว่า SPI ซึ่งเป็นโปรตีนประเภทโกลบูลินซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโนประเภทชอบน้ำ (Kinsella, 1979) ผลที่ได้มีแนวโน้มคล้ายคลึงกับ Idouraine และคณะ(1991) ที่พบว่า โปรตีนที่สกัดได้จากถั่วเทพารีสามารถจับไขมันได้ดีกว่า SPI เพราะมีสายโปรตีนที่มีลักษณะไม่ชอบน้ำ (hydrophobic side chains) มากกว่า SPI

ตารางที่ 4.12 ค่า OHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ

pH ตกตะกอน / pH สกัด	OHC (g oil / g dry protein)		
	3.5	4.0	4.5
โม่แห้ง			
9.0	$18.57^{b} \pm 0.14$	$14.60^{ef} \pm 0.21$	$20.09^{a} \pm 0.24$
10.0	$16.48^{cd} \pm 0.21$	$13.93^{f} \pm 0.28$	$18.12^{b} \pm 0.19$
11.0	$16.80^{cd} \pm 0.15$	$12.56^{gh} \pm 0.28$	$17.08^{c} \pm 0.29$
11.5	$14.92^{e} \pm 0.19$	$10.93^{jk} \pm 0.22$	$16.16^{d} \pm 0.20$
โม่เปียก			
9.0	$9.54^{lm} \pm 0.34$	$9.13^{m} \pm 0.42$	$9.66^{lm} \pm 0.46$
10.0	$10.90^{jk} \pm 0.18$	$9.10^{m} \pm 0.42$	$10.23^{kl} \pm 0.32$
11.0	$12.60^{gh} \pm 0.17$	$11.34^{ij} \pm 0.47$	$12.31^{gh} \pm 0.11$
11.5	$13.14^{g} \pm 0.33$	$11.81^{hi} \pm 0.28$	$12.75^{g} \pm 0.25$

a, b, c ... ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



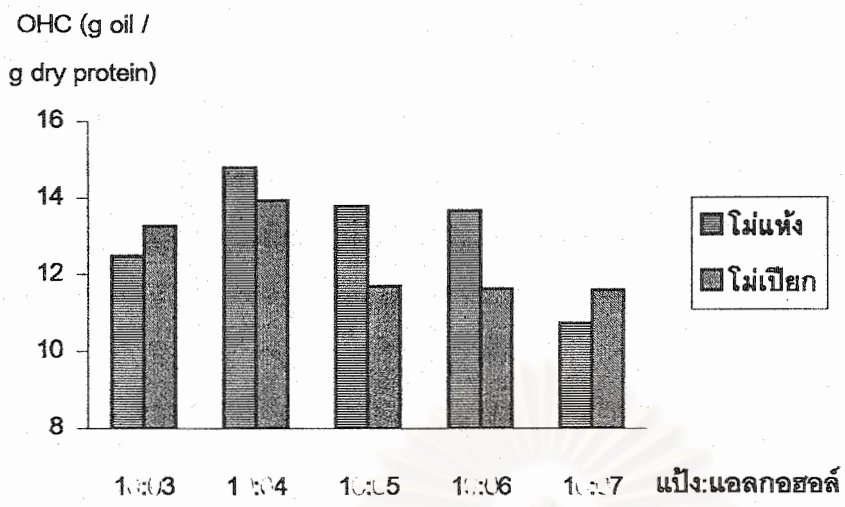
รูปที่ 4.12 ค่า OHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ

เมื่อคำนวณหาค่า OHC ต่อกรัมโปรตีนที่สกัดด้วยเอทานอล 95% จากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งพบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อค่า OHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์จากแป้งโม่เปียกและโม่แห้ง ได้แก่ วิธีการโม่ อัตราส่วนของแป้งต่อแอลกอฮอล์ และอิทธิพลร่วมของทั้งสองปัจจัย (ตารางที่ ฉ. 10) โดยค่า OHC ของโปรตีนที่สกัดได้จากแป้งโม่เปียกที่อัตราส่วนของแป้งต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:4 จะมีค่าสูงสุด (ตารางที่ 4.13 และรูปที่ 4.13) ซึ่งโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งที่อัตราส่วน 1:4 จะมีค่า OHC สูงกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งที่อัตราส่วนอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และค่า OHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์มีค่าสูงกว่าค่า OHC ของ SPI และโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่เปียกเป็นส่วนใหญ่ แต่มีค่าต่ำกว่าโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่แห้งเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจาก SPI และโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่เปียกจะประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำอยู่น้อยกว่าโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ (ตารางที่ 4.8) จึงทำให้จับน้ำมันได้น้อยกว่าโปรตีนที่ด้วยแอลกอฮอล์ (Idouraine et al., 1991) ถึงแม้ว่าโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำโดยรวมสูงกว่าโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่าง แต่โปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่แห้งมีค่า OHC สูงกว่าโปรตีนที่สกัดด้วยด้วยแอลกอฮอล์ ซึ่งอาจเป็นเพราะโครงสร้างของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างมีความยืดหยุ่นสูง จึงทำให้สายเปปไทด์จะหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำออกมาเวลาอยู่ในน้ำมัน และหันส่วนที่ชอบน้ำออกมาเวลาอยู่ในน้ำ (Kinsella, 1979)

ตารางที่ 4.13 ค่า OHC ของโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนต่างๆ

อัตราส่วนของ แป้ง : แอลกอฮอล์ (w/w)	OHC (g oil /g dry protein)	
	แป้งโม่แห้ง	แป้งโม่เปียก
1:3	$12.49^{cd} \pm 0.56$	$13.27^{bc} \pm 0.98$
1:4	$14.78^{a} \pm 0.73$	$13.94^{ab} \pm 1.14$
1:5	$13.79^{b} \pm 0.43$	$11.68^{de} \pm 0.67$
1:6	$13.67^{b} \pm 0.85$	$11.61^{de} \pm 0.60$
1:7	$10.71^{e} \pm 0.74$	$11.58^{de} \pm 0.76$

a, b, c ... ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.13 ค่า OHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่อัตราส่วนต่างๆ

4.5.3 สมบัติด้านการเกิดอิมัลชัน

ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนจะพิจารณาจากค่า Emulsifying Activity Index (EAI) และค่า Emulsion Stability Index (ESI) เนื่องจากอิมัลซิไฟเออร์ที่ดีนอกจากจะช่วยให้อิมัลชันเกิดได้ดีแล้ว อิมัลชันที่เกิดขึ้นยังต้องมีความคงตัวด้วย (Hill, 1998) โดยเมื่อคำนวณหาค่า EAI ต่อกรัมโปรตีนที่สกัดได้ด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้ง พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อค่า EAI ของโปรตีนที่สกัดได้จากแป้งโม่เปียกและโม่แห้ง ได้แก่ วิธีการโม่ pH ในการสกัด pH ในการตกตะกอน และอิทธิพลร่วมของทั้งสามปัจจัย (ตารางที่ ฉ.11) โดยเมื่อ pH ในการสกัดสูงขึ้น ค่า EAI ของโปรตีนที่สกัดได้จากแป้งโม่แห้งมีค่าลดลง ขณะที่โปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกมีค่าเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.14 และรูปที่ 4.14) เมื่อ pH ในการตกตะกอนเท่ากับ 4.5 ค่า EAI ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งจะมีค่าสูงที่สุด ในขณะที่ pH ในการตกตะกอนเท่ากับ 3.5 ค่า EAI ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกจะมีค่าสูงที่สุด ซึ่งแนวโน้มของค่า EAI ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งมีความคล้ายคลึงกับค่า OHC และ WHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้ง และคล้ายคลึงกับผลการทดลองของ Sathe และ Salunkhe (1981) ที่พบว่า โปรตีนชนิดต่างๆ ที่สกัดจากถั่ว Great northern bean ที่มีความสามารถในการจับน้ำและน้ำมันสูง จะเกิดเป็นอิมัลชันได้ดีและจะสามารถอุ้มน้ำมันได้สูง และเมื่อเปรียบเทียบค่า EAI ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่แห้งและโม่เปียกกับ SPI ซึ่งมีค่า EAI เท่ากับ 398.18 ± 32.52 (cm^2/ g dry protein) จะเห็นได้ว่า โปรตีนที่สกัดได้สามารถเกิดเป็นอิมัลชันได้ดีกว่า SPI ซึ่งอาจเป็นเพราะโปรตีนที่สกัดได้ด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่แห้งและโม่เปียกมีค่า OHC สูงกว่า SPI เนื่องจากประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำอยู่สูงกว่า และยังอาจเป็นเพราะมีความยืดหยุ่นของโครง

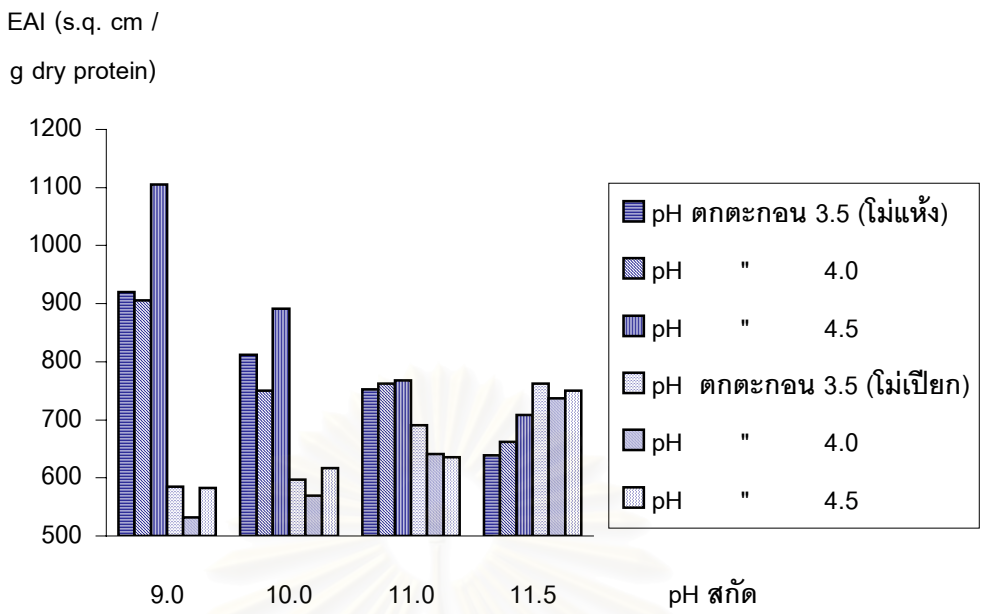
สร้างในการจัดเรียงตัวเมื่ออยู่ในอิมัลชันมากกว่า SPI โดยโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งน่าจะมีความยืดหยุ่นทางด้านโครงสร้างมากกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียก เนื่องจากมีค่า EAI สูงกว่า เพราะในอิมัลชันโปรตีนจะกระจายตัวไปที่ผิวระหว่างน้ำและน้ำมันโดยจะคลายตัวและหันส่วนที่ไม่มีขั้วซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำไปทางน้ำมัน หันส่วนที่มีขั้วมาทางน้ำ การคลายตัวของโปรตีนจะขึ้นกับความยืดหยุ่นของโปรตีนโดยโปรตีนที่มีความยืดหยุ่นสูงจะเกิดอิมัลชันได้ดี (Kinsella, 1979)

ตารางที่ 4.14 ค่า EAI ของโปรตีนที่สกัดได้ด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ

pH ตกตะกอน / pH สกัด	EAI (cm^2/ g dry protein)		
	3.5	4.0	4.5
โม่แห้ง			
9.0	$920.38^{b} \pm 61.90$	$905.97^{bc} \pm 23.90$	$1105.37^{a} \pm 3.25$
10.0	$811.92^{d} \pm 31.37$	$750.72^{ef} \pm 25.33$	$891.47^{c} \pm 31.57$
11.0	$752.46^{ef} \pm 21.17$	$761.92^{ef} \pm 27.47$	$768.04^{e} \pm 14.43$
11.5	$639.08^{hi} \pm 18.77$	$661.94^{h} \pm 5.78$	$707.81^{g} \pm 22.71$
โม่เปียก			
9.0	$584.96^{k} \pm 10.53$	$532.42^{l} \pm 6.67$	$583.20^{k} \pm 9.63$
10.0	$597.47^{jk} \pm 10.57$	$568.98^{k} \pm 7.09$	$616.54^{ij} \pm 8.17$
11.0	$690.36^{g} \pm 16.57$	$641.00^{hi} \pm 6.70$	$635.92^{hi} \pm 20.31$
11.5	$762.81^{ef} \pm 13.61$	$736.90^{f} \pm 11.05$	$750.29^{ef} \pm 14.54$

a, b, c … ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.14 ค่า EAI ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ

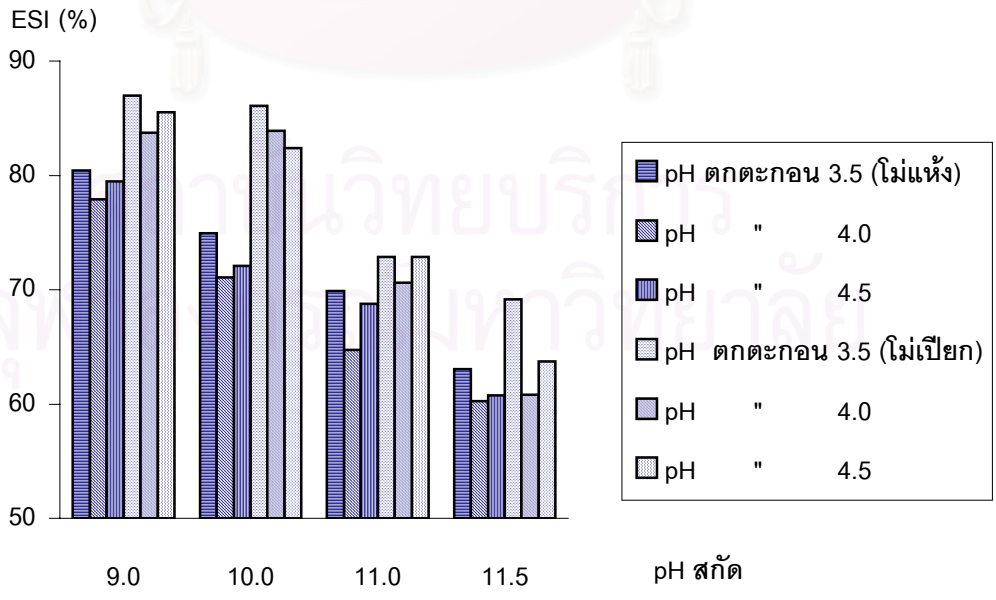
และเมื่อคำนวณค่า ESI ของโปรตีนที่สกัดได้ด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้ง พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อค่า ESI ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและแป้งโม่แห้ง ได้แก่ วิธีการโม่ pH ในการสกัด pH ในการตกตะกอน และอิทธิพลร่วมระหว่างวิธีการโม่และ pH ในการสกัด (ตารางที่ ฉ.12) โดยเมื่อ pH ในการสกัดเพิ่มขึ้นค่า ESI ของโปรตีนที่สกัดด้วยด่างจากทั้งแป้งโม่แห้งและโม่เปียกมีค่าลดลง (และตารางที่ 4.15 และรูปที่ 4.15) ซึ่งอาจเป็นเพราะเมื่อเพิ่ม pH ในการสกัดทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพมากขึ้น (Wu and Stringfellow, 1980) ที่ภาวะการสกัดเดียวกัน ค่า ESI ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งจะมีค่าน้อยกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) อาจเป็นเพราะความร้อนที่เกิดขึ้นขณะโม่ทำให้โปรตีนบางส่วนในแป้งโม่แห้งเกิดการเสียสภาพ ขณะที่แป้งโม่เปียกจะมีการเติมน้ำลงไปลดความร้อนที่เกิดจากแรงเสียดทานในขณะโม่ (Chen et al., 1999) และเมื่อเปรียบเทียบค่า ESI ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างกับ SPI ซึ่งมีค่า ESI เท่ากับ 78.32 ± 5.99 (%) พบว่า โปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งส่วนใหญ่มีค่า ESI ต่ำกว่า SPI ขณะที่โปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกส่วนใหญ่มีค่าใกล้เคียงกับ SPI อาจเป็นเพราะ SPI จะให้ฟิล์มโปรตีนซึ่งอยู่ระหว่างชั้นของน้ำและน้ำมัน (adsorbed layer) ที่แข็งแรง มีความเหนียวและยืดหยุ่นกว่าโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่าง เนื่องจากความคงตัวของอิมัลชันจะขึ้นกับความแข็งแรง ความเหนียว และความยืดหยุ่นของ adsorbed layer ที่อยู่ระหว่างชั้นของน้ำกับน้ำมัน (Hill, 1998) ซึ่งอิมัลซิไฟเออร์ที่ดีนอกจากมีค่า EAI สูงแล้ว ยังต้องมีค่า ESI สูงด้วย

ตารางที่ 4.15 ค่า ESI ของโปรตีนที่สกัดได้ด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ

pH ตกตะกอน / pH สกัด	ESI (%)		
	3.5[A]	4.0[B]	4.5[AB]
โม่แห้ง			
9.0	80.42[b] ± 2.28	77.88[b] ± 2.58	80.17[b] ± 2.22
10.0	74.94[c] ± 2.51	71.08[c] ± 2.09	72.06[c] ± 2.16
11.0	69.86[d] ± 2.91	64.76[d] ± 3.00	68.78[d] ± 1.66
11.5	63.07[f] ± 1.66	60.24[f] ± 1.42	60.74[f] ± 2.31
โม่เปียก			
9.0	86.96[a] ± 3.63	83.71[a] ± 2.88	85.54[a] ± 3.13
10.0	86.08[a] ± 2.40	83.87[a] ± 2.73	82.40[a] ± 2.70
11.0	72.84[c] ± 2.08	70.63[c] ± 1.86	72.84[c] ± 3.09
11.5	69.16[e] ± 2.43	60.80[e] ± 1.68	63.74[e] ± 1.73

a, b, c…ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งหมายถึง ค่า ESI ของโปรตีนที่มีความแตกต่างกันในวิธีการโม่และ pH ในการสกัด มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

A และ B ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอนหมายถึง ค่า ESI ของโปรตีนที่ตกตะกอนที่ pH ต่างกันมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



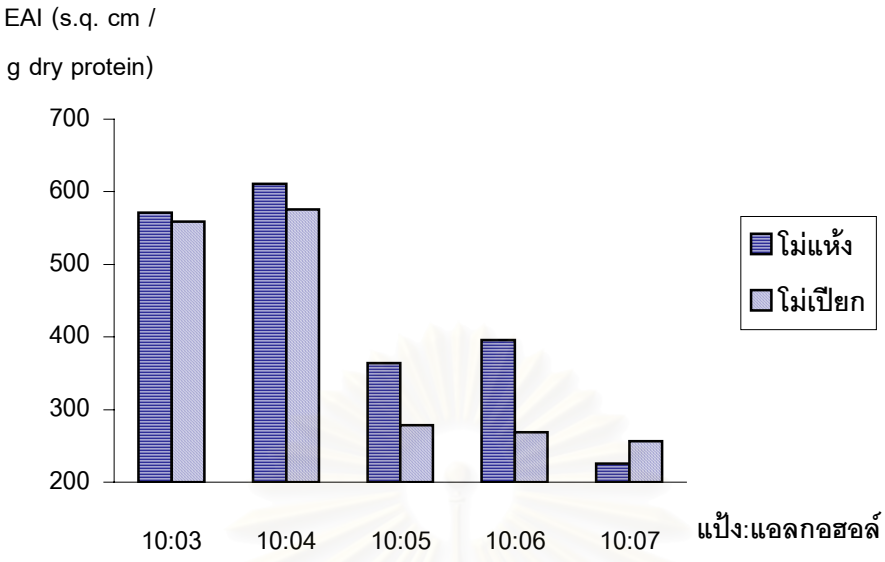
รูปที่ 4.15 ค่า ESI ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ

เมื่อคำนวณหาค่า EAI ต่อกรัมโปรตีนที่สกัดด้วยเอทานอล 95% จากแป้งโม่เปียกและโม่แห้ง พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อค่า EAI ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์จากแป้งโม่เปียกและโม่แห้ง ได้แก่ วิธีการโม่ อัตราส่วนของแป้งต่อแอลกอฮอล์ และอิทธิพลร่วมของทั้งสองปัจจัย (ตารางที่ ฉ.13) โดยโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งที่อัตราส่วนแป้งต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:4 จะมีค่า EAI สูงที่สุด ซึ่งที่อัตราส่วนนี้โปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งและโม่เปียกจะมีค่า EAI สูงกว่าโปรตีนที่สกัดที่อัตราส่วนอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.16 และรูปที่ 4.16) เช่นเดียวกับค่า WHC และ OHC และมีค่าค่อนข้างสูงเช่นเดียวกับโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่าง และผลที่ได้คล้ายคลึงกับผลการทดลองของ Sathe และ Salunkhe (1981) ที่พบว่า โปรตีนที่มีค่า WHC และ OHC สูง จะเกิดอิมัลชันได้ดี และเมื่อเปรียบเทียบค่า EAI ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์จากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งกับโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งและ SPI พบว่า ค่า EAI ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ส่วนใหญ่มีค่าต่ำกว่าโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างและ SPI ถึงแม้ว่าโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์จะประกอบด้วยกรดอะมิโนประเภทไม่ชอบน้ำโดยรวมสูงกว่าโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่าง (ตารางที่ 4.8) และ SPI แต่โปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์อาจมีความยืดหยุ่นในด้านโครงสร้างของโปรตีนในการจัดเรียงตัวเมื่ออยู่ในอิมัลชันน้อยกว่าโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างและ SPI (Kinsella, 1979)

ตารางที่ 4.16 ค่า EAI ของโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนต่างๆ

อัตราส่วนของ	EAI (cm^2/g dry protein)	
แป้ง : แอลกอฮอล์ (w/w)	แป้งโม่แห้ง	แป้งโม่เปียก
1:3	$571.60^{ab} \pm 24.38$	$558.53^{b} \pm 65.82$
1:4	$610.92^{a} \pm 26.10$	$575.52^{ab} \pm 71.33$
1:5	$363.92^{c} \pm 18.01$	$278.79^{d} \pm 38.67$
1:6	$396.04^{c} \pm 11.99$	$268.63^{de} \pm 26.80$
1:7	$225.14^{e} \pm 12.98$	$256.80^{de} \pm 31.18$

a, b, c ... ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



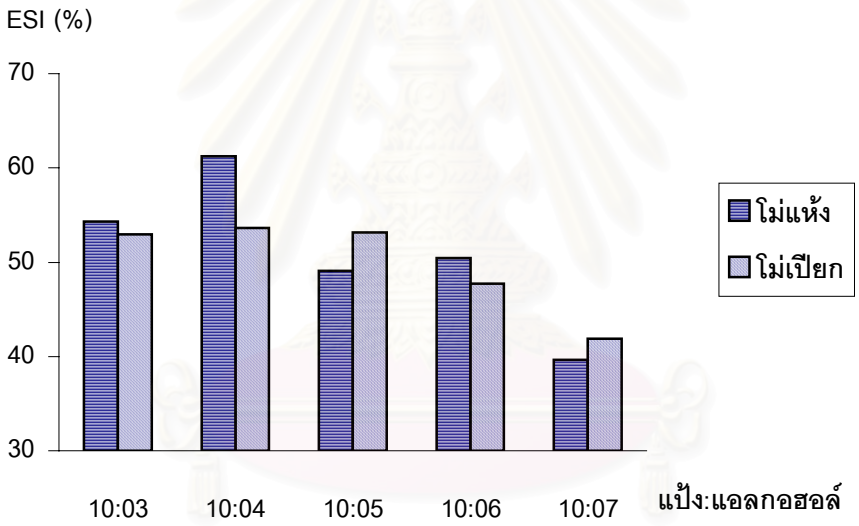
รูปที่ 4.16 ค่า EAI ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่อัตราส่วนต่างๆ

และเมื่อคำนวณค่า ESI ต่อกรัมโปรตีนที่สกัดด้วยเอทานอล 95% จากแป้งโม่แห้งและโม่เปียก พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อค่า ESI ของโปรตีน ได้แก่ การโม่ อัตราส่วนของแป้งต่อแอลกอฮอล์ และอิทธิพลร่วมของทั้งสองปัจจัย (ตารางที่ ฉ.14) โดยค่า ESI ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์จากแป้งโม่แห้งที่อัตราส่วนของแป้งต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:4 มีค่าสูงที่สุด ($p \leq 0.05$) และที่อัตราส่วนนี้ โปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งจะมีค่า ESI สูงกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งที่อัตราส่วนอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งแนวโน้มของค่า ESI ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์จากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งมีความคล้ายคลึงกับค่า EAI ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์จากแป้งโม่เปียกและโม่แห้ง (ตารางที่ 4.17 และรูปที่ 4.17) และเมื่อเปรียบเทียบค่า ESI ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์กับค่า ESI ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างและ SPI พบว่า โปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์จากแป้งโม่แห้งและโม่เปียกมีค่า ESI ต่ำกว่าโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างและ SPI อาจเป็นเพราะอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดโปรตีนสูงถึง 65 °C อาจทำให้โปรตีนที่สกัดได้บางส่วนเกิดการเสียสภาพ และยังอาจเป็นเพราะ adsorbed layer ที่เกิดจากโปรตีนที่สกัดแอลกอฮอล์มีความเหนียวและยืดหยุ่นน้อยกว่า โปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างและ SPI ซึ่งคงตัวของอิมัลชันจะขึ้นกับความแข็งแรง ความเหนียว และความยืดหยุ่นของ adsorbed layer ที่อยู่ระหว่างชั้นของน้ำกับน้ำมัน (Hill, 1998)

ตารางที่ 4.17 ค่า ESI ของโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนต่างๆ

อัตราส่วนของ แป้ง : แอลกอฮอล์ (w/w)	ESI (%)	
	แป้งโม่แห้ง	แป้งโม่เปียก
1:3	$54.30^{b} \pm 0.38$	$52.94^{b} \pm 1.26$
1:4	$61.26^{a} \pm 1.40$	$53.63^{b} \pm 0.66$
1:5	$49.10^{d} \pm 0.70$	$53.15^{b} \pm 1.40$
1:6	$50.45^{c} \pm 1.40$	$47.75^{e} \pm 0.70$
1:7	$39.64^{g} \pm 1.40$	$41.89^{f} \pm 1.21$

a, b, c … ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.17 ค่า ESI ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่อัตราส่วนต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

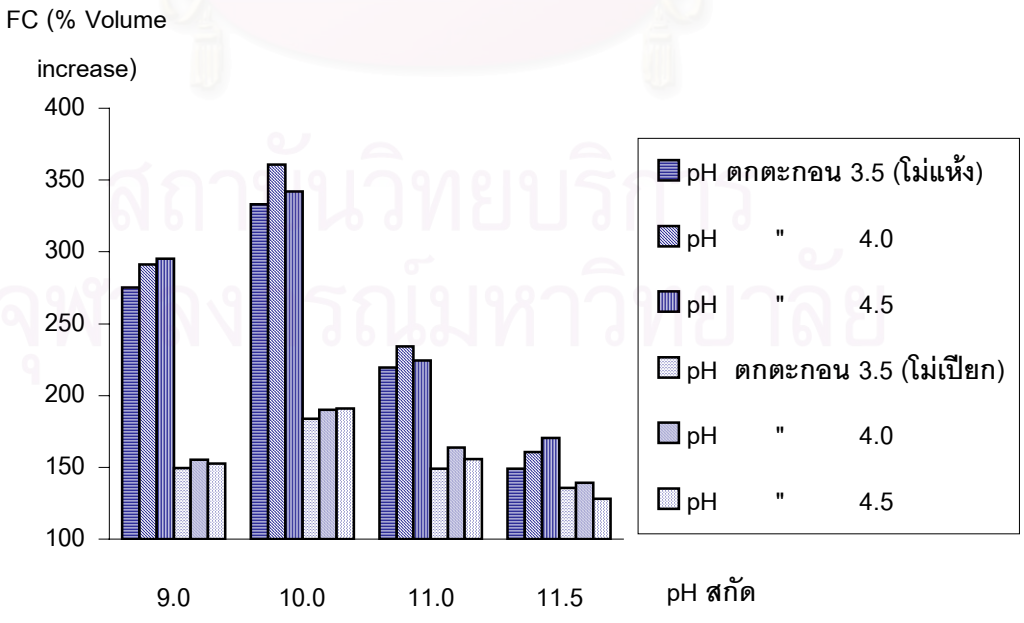
4.5.4 สมบัติด้านการเกิดฟอง

ความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนจะพิจารณาจากค่า Foaming Capacity (FC) และ Foaming Stability (FS) เนื่องจากโปรตีนที่มีความสามารถในการเกิดฟองที่ดี นอกจากให้ปริมาณฟองที่สูงแล้ว ฟองที่เกิดขึ้นต้องมีความคงตัวด้วย (Hill, 1998) เมื่อคำนวณค่า FC ต่อกรัมโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้ง พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อค่า FC ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้ง ได้แก่ วิธีการโม่ pH ในการสกัด pH ในการตกตะกอน และอิทธิพลร่วมของทั้งสามปัจจัย (ตารางที่ ฉ.15) โดยเมื่อ pH ในการสกัดโปรตีนเท่ากับ 10.0 โปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้ง จะมีค่า FC สูงกว่าโปรตีนที่สกัดที่ภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โปรตีนสกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งและตกตะกอน ที่ pH 4.0 ส่วนใหญ่ จะมีค่า FC สูงกว่าโปรตีนที่ตกตะกอนที่ pH อื่น (ตารางที่ 4.18 และรูปที่ 4.18) ที่ภาวะการสกัดเดียวกัน พบว่า โปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งจะมีค่า FC สูงกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียก อาจเป็นเพราะโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งประกอบไปด้วยโปรตีนขนาดเล็กมากกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียก ซึ่งโปรตีนที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ไปที่ผิวหน้าของสารละลายได้เร็วกว่าจึงเกิดฟองได้ดีกว่าโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า และเมื่อเปรียบเทียบค่า FC ของโปรตีนที่สกัดได้ด้วยสารละลายด่างกับค่า FC ของ SPI ซึ่งมีค่าเท่ากับ 241.06 ± 2.02 (% volume increase) พบว่า โปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกมีค่า FC ต่ำกว่า SPI ขณะที่โปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งที่ pH 9 และ 10 มีค่า FC สูงกว่า SPI ส่วนโปรตีนที่สกัดที่ pH 11 มีค่า FC ใกล้เคียงกับ SPI และโปรตีนที่สกัดที่ pH 11.5 มีค่า FC ต่ำกว่า SPI ซึ่งอาจเป็นเพราะโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งมีการจับกันของหมู่ที่ไม่ชอบน้ำของกรดอะมิโนในโปรตีนที่อยู่ที่ผิวหน้าของสารละลายสูงกว่าและมีความยืดหยุ่นทางด้านโครงสร้างมากกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและ SPI ทำให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ที่ผิวระหว่างชั้นน้ำและอากาศได้ดีกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและ SPI เนื่องจากการเกิดฟองจะขึ้นกับขนาดของสายเปปไทด์หรือโปรตีน ความยืดหยุ่นในการจัดเรียงโครงสร้างของโปรตีน และการจับกันของหมู่ที่ไม่ชอบน้ำของกรดอะมิโนในโปรตีนที่อยู่ที่ผิวหน้าของสารละลาย (Wilde and Clark, 1996) ส่วนโปรตีนที่สกัดด้วยเอทานอล 95% จากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งพบว่า ไม่มีสมบัติในการเกิดฟอง

ตารางที่ 4.18 ค่า FC ของโปรตีนที่สกัดได้ด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ

pH ตกตะกอน / pH สกัด	FC (% volume increase)		
	3.5	4.0	4.5
โม่แห้ง			
9.0	$275.04^{d} \pm 11.7$	$291.04^{c} \pm 18.94$	$295.15^{c} \pm 14.81$
10.0	$333.10^{b} \pm 12.76$	$360.92^{a} \pm 8.52$	$342.07^{b} \pm 18.36$
11.0	$219.36^{f} \pm 5.86$	$234.31^{e} \pm 6.82$	$224.26^{ef} \pm 7.68$
11.5	$149.16^{ijk} \pm 8.72$	$160.83^{hij} \pm 6.68$	$170.45^{h} \pm 7.62$
โม่เปียก			
9.0	$149.65^{ijk} \pm 7.59$	$155.10^{ij} \pm 7.66$	$152.68^{ij} \pm 7.57$
10.0	$183.79^{g} \pm 6.53$	$189.85^{g} \pm 6.42$	$190.89^{g} \pm 6.44$
11.0	$149.10^{ijk} \pm 3.63$	$163.58^{hi} \pm 4.37$	$155.80^{ij} \pm 6.00$
11.5	$133.55^{l} \pm 3.26$	$139.13^{kl} \pm 3.09$	$128.26^{l} \pm 3.15$

a, b, c … ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.18 ค่า FC ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ

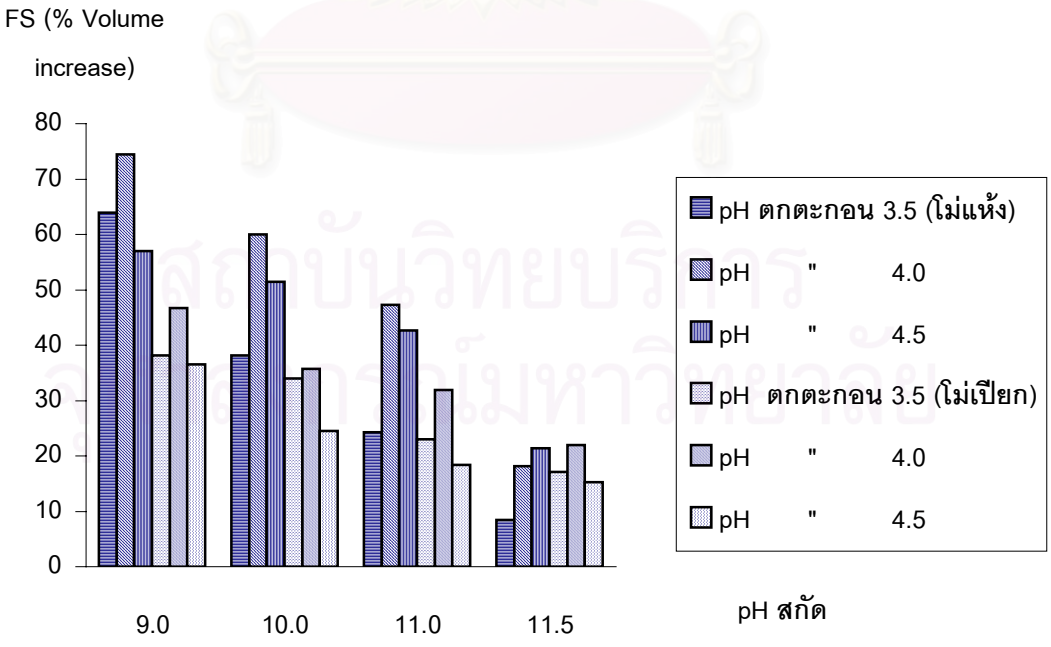
และเมื่อคำนวณค่า FS ต่อกรัมของโปรตีนที่สกัดได้ด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่แห้งและโม่เปียก พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อค่า FS ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งและแป้งโม่เปียก ได้แก่ วิธีการโม่ pH ในการสกัด pH ในการตกตะกอน และอิทธิพลร่วมของทั้งสามปัจจัย (ตารางที่ ฉ.16) โดยเมื่อ pH ในการสกัดเพิ่มขึ้นโปรตีนที่สกัดได้จากแป้งโม่แห้งและโม่เปียกจะมีค่า FS ลดลง และเมื่อ pH การตกตะกอนเท่ากับ 4.0 พบว่า ค่า FS ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งสูงกว่าโปรตีนที่ตกตะกอนที่ pH อื่น ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.19 และรูปที่ 4.19) อาจเป็นเพราะที่ pH 4.0 เป็นค่า pI ของโปรตีนที่สกัดด้วยด่างจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้ง ซึ่งฟองจะมีความเสถียรมากที่สุดเพราะผลรวมของประจุในโมเลกุลโปรตีนเท่ากับศูนย์ จึงเกิดแรงผลักกับโมเลกุลข้างเคียงน้อยที่สุด (Buckingham, 1970; Waniska and Kinsella, 1979; Kim and Kinsella, 1985; LeMeste et al., 1990) ค่า FS ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งส่วนใหญ่จะมีค่าสูงกว่าค่า FS ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียก และเมื่อเปรียบเทียบค่า FS ของโปรตีนที่สกัดได้กับค่า FS ของ SPI ซึ่งมีค่าเท่ากับ 63.18 ± 7.13 (% volume increase) จะเห็นได้ว่า โปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่เปียกในทุกภาวะการสกัด และโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งเกือบทุกภาวะการสกัดมีค่า FS ต่ำกว่า SPI ซึ่งอาจเป็นเพราะฟองที่เกิดจาก SPI มีความเหนียวและยืดหยุ่นกว่าฟองที่เกิดจากโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งและโม่เปียก เนื่องจากความคงตัวของฟองจะเกิดจากความแข็งแรงของโปรตีนที่เกิดเป็น adsorbed layer ระหว่างชั้นของน้ำและอากาศ (Wilde and Clark, 1996)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.19 ค่า FS ของโปรตีนที่สกัดได้ด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ

pH ตกตะกอน / pH สกัด	FS (% volume increase)		
	3.5	4.0	4.5
โม่แห้ง			
9.0	$63.91^{b} \pm 4.51$	$74.47^{a} \pm 2.82$	$57.01^{c} \pm 6.84$
10.0	$38.15^{fg} \pm 4.35$	$59.99^{bc} \pm 3.07$	$51.46^{d} \pm 8.34$
11.0	$24.26^{i} \pm 3.10$	$47.30^{de} \pm 2.56$	$42.68^{ef} \pm 1.51$
11.5	$8.44^{m} \pm 3.34$	$18.11^{jkl} \pm 4.01$	$21.42^{ijk} \pm 3.86$
โม่เปียก			
9.0	$38.12^{fg} \pm 2.93$	$46.70^{de} \pm 5.55$	$36.49^{gh} \pm 3.21$
10.0	$34.04^{gh} \pm 1.19$	$35.69^{gh} \pm 2.28$	$24.53^{i} \pm 1.66$
11.0	$22.95^{ij} \pm 4.52$	$31.94^{h} \pm 2.30$	$18.35^{jkl} \pm 6.17$
11.5	$17.16^{kl} \pm 2.86$	$21.98^{ijk} \pm 4.31$	$15.27^{l} \pm 2.39$

a, b, c ... ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.19 ค่า FS ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ภาวะต่างๆ

4.6 การใช้โปรตีนในผลิตภัณฑ์อาหาร

การนำโปรตีนที่สกัดได้มาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารจะพิจารณาจากค่าของสมบัติเชิงหน้าที่และค่า %yield ของโปรตีนที่สกัดได้ เมื่อพิจารณาสมบัติเชิงหน้าที่ในด้านต่างๆ พบว่า โปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างและแอลกอฮอล์จากแป้งโม่เปียกและโม่แห้ง มีค่า WHC, OHC, EAI และ ESI สูง แต่มีค่า FC และ FS ต่ำ โดยโปรตีนที่สกัดด้วยเอทานอล 95% จากแป้งโม่แห้งที่อัตราส่วนแป้งต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:4 (ALC) และโปรตีนที่สกัดด้วยด่างจากแป้งโม่แห้งที่ pH 11.5 และตกตะกอนที่ pH 4.5 (BASE) จะมีสมบัติเชิงหน้าที่ด้านการจับน้ำ การจับน้ำมัน ด้านการเกิดอิมัลชัน และค่า% yield สูงโปรตีนที่สกัดที่ภาวะอื่น จึงเลือกโปรตีนที่สกัดที่ภาวะดังกล่าวมาใช้ในเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เนื้อสัมผัสต้องมีความเหนียว ความยืดหยุ่น ไม่นิ่มและสมบัติในด้านการจับน้ำและจับไขมันที่ดี (Min et al., 1994) จากการเติมโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง (SPI) ALC และ BASE ปริมาณ 3% ของส่วนผสมเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์ซึ่งใช้วิธีการนึ่งให้สุกแทนการชุบเกล็ดขนมปัง แป้ง และนำไปทอด เนื่องจากผลของแป้ง เกล็ดขนมปัง กลิ่นของน้ำมันที่ใช้ทอด และการทอดอาจมีผลต่อการประเมินคุณภาพ และประเมินทางประสาทสัมผัสด้านลักษณะเนื้อสัมผัสและความชอบโดยรวมโดยใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน 20 คน พบว่า ผู้ทดสอบสามารถบอกความแตกต่างของเนื้อสัมผัสของเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์ที่เติม ALC BASE และ SPI จากเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์ที่เป็นตัวอย่างควบคุม (R) ได้มากกว่า 15 คน (ตารางที่ 4.20) จึงถือได้ว่าตัวอย่างที่ทดสอบมีความแตกต่างกัน (Meilgaard, Civille and Carr, 2000) โดยปกติการเติม SPI, ALC และ BASE จะช่วยจับน้ำและน้ำมันที่เติมลงในฟิชฟิงเกอร์ จึงทำให้เนื้อสัมผัสที่ได้แตกต่างจาก R

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.20 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสในด้านความแตกต่างของเนื้อสัมผัสของเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์

ฟิชฟิงเกอร์	ผู้ทดสอบ (คน)							
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		ครั้งที่ 4	
	ต่าง	ไม่ต่าง	ต่าง	ไม่ต่าง	ต่าง	ไม่ต่าง	ต่าง	ไม่ต่าง
SPI	15	5	15	5	9	11	16	4
ALC	19	1	18	2	19	1	19	1
BASE	17	3	18	2	19	1	17	3

สำหรับความชอบโดยรวม พบว่า ตัวอย่างที่ทดสอบได้คะแนนความชอบโดยรวมแตกต่างกัน (ตารางที่ ฉ.17) โดยผู้ทดสอบชอบเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์ที่เป็นตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่เติม SPI มากที่สุด รองลงมา คือ ตัวอย่างที่เติม ALC และ BASE ตามลำดับ (ตารางที่ 4.21) เนื่องจากในการทดสอบความชอบ ผู้ทดสอบนอกจากจะพิจารณาเนื้อสัมผัสของตัวอย่างแล้ว ยังคำนึงถึงกลิ่นรส รสชาติ และลักษณะปรากฏ เช่น สี ด้วย ซึ่งตัวอย่างที่เติม ALC มีกลิ่นของแอลกอฮอล์ และตัวอย่างที่เติม BASE มีสีคล้ำ จึงทำให้ตัวอย่างทั้งสองได้คะแนนความชอบโดยรวมต่ำ

ตารางที่ 4.21 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสในด้านความชอบโดยรวมของเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์

ฟิชฟิงเกอร์	คะแนนความชอบโดยรวม
R	6.957[a]
SPI	6.911[a]
ALC	5.580[b]
BASE	3.987[c]

a, b, c … ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของเนื้อในของฟิชเฟอร์ทั้ง 4 ตัวอย่าง ด้วยเครื่อง Texture analyzer โดยใช้โปรแกรม Texture Profile Analysis (TPA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าที่ได้ (ตารางที่ ฉ. 18-20) พบว่า ตัวอย่างที่เติม ALC จะมีความแข็ง (hardness) ความยืดหยุ่น (springiness) และการเกาะตัวกัน (cohesiveness) สูงที่สุด รองลงมา คือ ตัวอย่างที่เติม SPI

และ BASE ซึ่งมีค่าความแข็งและความยืดหยุ่นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดย R จะมีความแข็งและความยืดหยุ่นน้อยที่สุด (ตารางที่ 4.22) ส่วนการเกาะตัวกัน พบว่า ตัวอย่างที่เติม ALC และ BASE จะมีค่าการเกาะตัวกันสูงที่สุด รองลงมา คือ ตัวอย่างที่เติม SPI และ R ตามลำดับ ($p \leq 0.05$) ซึ่งการเติม SPI, ALC และ BASE จะช่วยปรับปรุงเนื้อสัมผัสของเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์ให้ดีขึ้นโดยเพิ่มการจับน้ำและน้ำมัน ทำให้ฟิชฟิงเกอร์ที่ผลิตได้ไม่นิ่มเละ และมีคุณภาพดีขึ้น ซึ่งผลที่ได้มีความคล้ายคลึงกับผลการทดลองของ Gomez-Guillen และคณะ (1996) ที่เติมโปรตีนประเภท nonmuscle proteins เช่น ไข่ขาว โปรตีนจากถั่วเหลือง เคซีน และกลูเตน ลงในเนื้อปลาซาร์ดีนบดคุณภาพสูงและคุณภาพต่ำและพบว่า การเติมโปรตีนที่เป็น nonmuscle proteins ลงไปในเนื้อปลาบดคุณภาพสูง จะรบกวนการเกิดเจล แต่การเติมโปรตีนเหล่านี้ในเนื้อปลาซาร์ดีนบดคุณภาพต่ำจะช่วยปรับปรุงคุณภาพของเจลให้ดีขึ้น และเกือบทุกตัวอย่างของเนื้อปลาซาร์ดีนบดคุณภาพสูงและคุณภาพต่ำที่เติมกลูเตนจะมีค่าความยืดหยุ่น การเกาะตัวกัน และปริมาณความชื้นสูงกว่าตัวอย่างที่มีการเติมโปรตีนชนิดอื่น

ตารางที่ 4.22 ค่าความแข็ง ความยืดหยุ่นและการเกาะตัวกันของเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์ทั้ง 4 สูตร

ฟิชฟิงเกอร์	ลักษณะเนื้อสัมผัส		
	ความแข็ง (g)	ความยืดหยุ่น	การเกาะตัวกัน
R	760.056^{c}	0.674^{c}	0.365^{b}
SPI	2,671.569^{b}	0.752^{b}	0.382^{ab}
ALC	7,164.950^{a}	0.806^{a}	0.410^{a}
BASE	2,526.596^{b}	0.745^{b}	0.402^{a}

a, b, c … ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

แป้งที่ได้จากการโม่แห้งและผ่านการสกัดไขมันจะมีปริมาณความชื้น เถ้า ไขมัน เส้นใย และโปรตีนต่ำกว่าแป้งที่ได้จากการโม่เปียกและผ่านการสกัดไขมัน

ในการสกัดโปรตีนด้วยสารละลายด่าง เมื่อเพิ่ม pH ในการสกัดให้สูงขึ้น จะทำให้สามารถสกัดโปรตีนออกมาได้มากขึ้น โดยที่ pH 11.5 จะสามารถสกัดโปรตีนออกมาได้มากที่สุด และค่า pI ของโปรตีนจากข้าวฟ่างพันธุ์ KU 439 มีค่าประมาณ 4 โดยมีค่า %yield ของโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งเท่ากับ 3.29 และ 3.40% ตามลำดับ และมีค่า % protein recovery เท่ากับ 38.03 และ 53.18% ตามลำดับ ส่วนการสกัดโปรตีนด้วยเอทานอล 95% ที่อัตราส่วนของแป้งต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:4 จะให้ค่า % yield ของโปรตีนเท่ากับ 1.78 และ 1.38% ตามลำดับ และมีค่า % protein recovery เท่ากับ 20.60 และ 21.55 % ตามลำดับ

โปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างเป็นโปรตีนประเภทกลูเตลิน โดยโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งจะมีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 15-66 kDa และประกอบด้วยโมเลกุลหลัก คือ 20, 23, 37, 53 และ 66 kDa ส่วนโปรตีนที่สกัดด้วยเอทานอล 95% จะเป็นโปรตีนประเภทคาเฟอริน โดยโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้งจะประกอบด้วยโมเลกุลขนาด 17, 23 และ 54 kDa ส่วนโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกจะประกอบด้วยโมเลกุลขนาด 23, 36 และ 54 kDa โดยโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบหลักในคาเฟอรินที่สกัดได้จากแป้งโม่แห้งและโม่เปียกจะมีขนาดเท่ากับ 23 kDa

โปรตีนในแป้งโม่เปียกจะประกอบด้วยกรดอะมิโนประเภทชอบน้ำน้อยกว่าโปรตีนในแป้งโม่แห้ง โปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกด้วยสารละลายด่างและแอลกอฮอล์จะประกอบด้วยกรดอะมิโนประเภทชอบน้ำสูงกว่าโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่แห้ง และโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งด้วยแอลกอฮอล์จะประกอบด้วยกรดอะมิโนประเภทไม่ชอบน้ำสูงกว่าโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่าง ซึ่งโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำเป็นอยู่สูงกว่าโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์

โปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่แห้งที่ pH 11.5 และตกตะกอนที่ pH 4.5 จะมีค่าสมบัติเชิงหน้าที่ และค่า %yield สูงกว่าโปรตีนที่สกัดที่ภาวะอื่น คือ มีค่า WHC, OHC, EAI และ ESI เท่ากับ 8.49 (g water / g dry protein), 16.60 (g oil / g dry protein), 707.81 (cm^2 /g dry protein) และ 60.74 % ตามลำดับ และโปรตีนที่สกัดจากแป้งโม่เปียกที่ pH 11.5 และตกตะกอนที่ pH 3.5 จะให้ค่า WHC, OHC, EAI และ ESI เท่ากับ 5.35 (g water / g dry protein), 13.14 (g oil / g dry protein), 762.81 (cm^2 /g dry protein) และ 69.16% ตามลำดับ จึงเหมาะ

ที่จะใช้เป็นตัวจับน้ำ จับไขมัน หรือสารอิมัลซิไฟเออร์ในผลิตภัณฑ์อาหาร ขณะที่โปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่ pH 10.0 และตกตะกอนที่ pH 4.0 มีค่า FC และ FS เท่ากับ 360.92 และ 59.99 (% volume increase) จึงเหมาะที่จะใช้เป็นสารที่ช่วยให้เกิดฟอง ส่วนโปรตีนที่สกัดด้วยเอทานอล 95% จากแป้งโม่แห้งและโม่เปียกที่อัตราส่วนแป้งต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:4 จะให้ค่า WHC เท่ากับ 10.16 และ 10.86 (g water /g dry protein) ตามลำดับ ค่า OHC เท่ากับ 14.78 และ 13.94 (g oil / g dry protein) ตามลำดับ ค่า EAI เท่ากับ 610.92 และ 575.52 (cm^2 /g dry protein) ตามลำดับ และมีค่า ESI เท่ากับ 61.26 และ 53.63 % ตามลำดับ จึงเหมาะที่จะใช้เป็นตัวจับน้ำ จับน้ำมันในอาหารในผลิตภัณฑ์อาหาร แต่โปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ไม่มีสมบัติในการเกิดฟอง

การเติมโปรตีนที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ลงในเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์จะทำให้เนื้อสัมผัสของตัวอย่างมีความแข็ง ความยืดหยุ่น และการเกาะตัวกันมากกว่าการใช้โปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองและโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่าง และจะได้รับการยอมรับมากกว่าตัวอย่างที่เติมโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่าง อย่างไรก็ตามเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์ที่เติมโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์และสารละลายด่างก็ยังได้รับการยอมรับต่ำกว่าตัวอย่างที่เติมโปรตีนที่สกัดจากถั่วเหลืองและตัวอย่างควบคุม

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากค่า % yield ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างและแอลกอฮอล์ยังมีค่าต่ำกว่าปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในแป้งโม่เปียกและโม่แห้งที่ผ่านการสกัดไขมันซึ่งใช้ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบ โดยโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งมี % protein recovery เท่ากับ 53.18 และ 38.03 % ตามลำดับ และโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์จากแป้งโม่เปียกและโม่แห้งมี % protein recovery เท่ากับ 20.60 และ 21.55 % ตามลำดับ ดังนั้น งานวิจัยที่น่าจะศึกษาต่อไป คือ การเพิ่มค่า % yield ของโปรตีนที่สกัดได้ให้สูงขึ้น โดยอาจเพิ่มเวลาที่ใช้ในการสกัดด้วยสารละลายด่าง การสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70% แทนเอทานอลความเข้มข้น 95%

เนื้อในของฟิชฟิงเกอร์ที่เติมโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์มีค่าความแข็ง ความยืดหยุ่นและการเกาะตัวกันสูงกว่าเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์ที่เติม SPI และเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์ที่เติมโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างมีค่าทั้งสามใกล้เคียงกับเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์ที่เติม SPI แต่เนื้อในของฟิชฟิงเกอร์ที่เติมโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์และสารละลายด่างมีคะแนนความชอบโดยรวมต่ำกว่าเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์ที่เติม SPI ซึ่งงานวิจัยที่น่าจะศึกษาต่อไปอาจศึกษาถึงการควบคุมการเปลี่ยนสีของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่างและการกำจัดกลิ่นออกจากโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย :

เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. 2540. เอกสารวิชาการปลูกพืชไร่. กรุงเทพ: โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว.

วิจัยข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ, ศูนย์. 2538. คำแนะนำเรื่องพันธุ์ข้าวฟ่าง. นครราชสีมา: เฉลิมชัยการพิมพ์ ปากช่อง.

ภาษาอังกฤษ :

Ahmed, Z. S., Abd El-Moniem, G. M. and Yassen, A. A. E. 1996. Comparative studies on protein fraction and amino acid composition from sorghum and pearl millet. Nahrung. 40(6): 305-309.

Ahmedna, M., Prinyawiwatkul, W. and Rao, R.M. 1999. Solubilized wheat protein isolate: functional properties and potential food application. J. Agric Food Chem. 47(4): 1340-1345.

A.O.A.C.1995. Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C.,16th ed.

Barbut, S.1996. Determining water and fat holding. In G. M. Hall.(ed.), Method of Testing Protein Functionality, pp. 189-225. London: Blackie Academic & Profession.

Beckwith, A. C. and Jones, R. W. 1972. Physical chemical characterization of grain sorghum prolamine. J. Agric Food Chem. 20(2): 259-261.

Buckingham, J. H. 1970. Effect of pH, concentration and temperature on the strength of cytoplasmic protein foams. J. Sci Food Agric. 21: 441.

Buffo, R. A., Weller, C. L. and Gennadios, A. 1997. Films from laboratory-extracted sorghum kafirin. Cereal Chem. 74(4): 473-475.

Bull, H. B. and Breese, K. 1968. Protein hydration. 1. Binding sites. Arch, Biochem. Biophys. 128: 488-496. Cited in Whitaker, J. R. and Tannenbaum, S. R. Food Protein. Westport Connecticut: The AVI Publishing Company.

Chen, J. J., Lu, S. and Lii, C. Y. 1999. Effects of milling on the physicochemical characteristics of waxy rice in Taiwan. Cereal Chem.76(5): 796-799.

Chibber, B. A. K., Mertz, E. D. and Axtell, J. D. 1978. Effect of dehulling on tannin content,protein distribution and quality of high and low tannin sorghum. J. Agric Food Chem. 26: 679-683.

Cohen, S. A. and Michaud, D. P. 1993. Synthesis of fluorescent derivatizing reagent, 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acid via high performance liquid chromatography. J. Anal Biochem. 211(2): 279-287.

Cuq, B.,Gontard,N. and Guilbert, S. 1998. Protein as agricultural polymers for packaging production. Cereal Chem. 75(1): 1-9.

Damodaran, S. 1996. Amino acids, peptides, and proteins. In O. R. Fennema (ed.), Food Chemistry. 3rd ed., pp. 321-430. New York: Marcel Dekker.

DeMan, J. M. 1976. Principles of Food Chemistry. Westport Connecticut: The AVI Publishing Company.

Evans, D. J., Schussler, L. and Taylor, L. R. N. 1987. Isolation of reduced-soluble-protein from sorghum starchy endosperm. J . Cereal Sci. 5: 61

Gennadios, A. and Weller, C. L. 1990. Edible films and coatings from wheat and corn proteins. Food Technol. 44(10): 63-69.

Gomez-Guillen, M. C.,Borderias, A. J. and Montero, P. 1996. Rheological properties of gels made from high-and low-quality sardine (*Sardina pilchardus)* mince added nonmuscle proteins. J . Agric Food Chem. 44: 746-750.

Grunden, L. P., Vadehra, D. V. and Baker, R. C. 1974. Effects of proteolytic enzymes on the functionality of egg chicken egg albumin. J. Food Sci. 39(4): 841-843. cited in G. M. Hall. 1996. Method of Testing Protein Functionality. London: Blackie Academic & Profession.

Henrickson, R. L. 1978. Meat, Poultry, and Seafood Technology. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall.

Hill, S. E. 1996. Emulsions. In G. M. Hall.(ed.), Method of Testing Protein Functionality, pp. 153-185. London: Blackie Academic & Profession.

Hill, S. E. 1998. Emulsions and Foams. In S. E. Hill, D.A. Ledward and L. R. Mitchell (eds.), Functional Properties of Food Macromolecules.2nd ed., pp. 303-334. Gaitherburg Maryland: Aspen Publishers. pp. 153-185. London: Blackie Academic & Profession.

Hubbard, J. E., Hall, H. H. and Earle, F. R. 1950. Composition of the component parts of the sorshum kernel. Cereal Chem. 27: 415. cited in Kent, N. L. 1983. Technology of Cereal. 3rd ed. Oxford: Permagon Press.

Idouraine, A., Yensen, S. B. and Weber, C. W. 1991. Terapy bean flour, albumin and globulin fractions functional properties compared with soy protein isolate. J. Food Sci. 56(5): 1316-1318.

Ivey, F. J., Webb, N. B. and Jones, V. A. 1970. The effect of disperse phase droplet size and interfacial film thickness on the emulsifying capacity and stability of meat emulsions. Food Technol. 24: 1279-1281. Cited in G. M. Hall .1996. Method of Testing Protein Functionality. London: Blackie Academic & Profession.

Jones, R. W. and Beckwith, A. C. 1970. Proximate compositions and proteins of three grain sorghum hybrids and their dry-mill fractions. J. Agric Food Chem. 18(1): 33-36.

Kent, N. L. 1983. Technology of Cereals. 3rd ed. Oxford: Pergamon Press.

Kim, S. H. and Kinsella, J. E. 1985. Surface activity of food proteins: relationships between surface pressure development, viscoelasticity of interfacial films and foam stability of bovine serum albumin. J. Food Sci. 50: 1526-1530.

Kinsella, J. E. 1979. Functional properties of soy protein. J. Am. Oil Chemists'Soc. 56: 242-258.

Kneifel, W., Paquin, P., Albert, T. and Richard, J. P. 1991. Water-holding capacity of proteins with special regard to milk proteins and methodological aspects-a review. J. Dairy Sci. 74: 2027-41. cited in G. M. Hall . Method of Testing Protein Functionality. London: Blackie Academic & Profession. 1996.

Krull, L. H. and Wall, J. S. 1969. Relationship of amino acid composition and wheat protein properties. Bakers'Dig. 43(4): 30-39. Cited in J. M. Deman. 1976. Principles of Food Chemistry. Westport Connecticut: The AVI Publishing Company.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

LeMeste, H, M., Colas, B., Simatos, D., Closs, B., Courthaudon, J. I. and Lorient, D. 1990. Contribute of protein flexibility to the foaming properties of casine. J. Food Sci. 55(5): 1445-1447.

Light, A.1974. Proteins Structure and Function. Englewood Cliffs, New Jersey:Prentice-Hall.

Lim, S., Lee, J., Shin, D. and Lim, H. S. 1999. Comparision of protein extraction solutions for rice starch isolation and effects of residual protein content on starch pasting properties. Starch/Starke. 51(4): 120-125.

Martin, J. H. 1970. History and Classification of Sorghum. In J. S. Wall and W. M. Ross (eds.), Sorghum Production and Utilization, pp. 1-20. Westport Connecticut: The AVI Publishing Company.

Mazhar, H., Chandrashekar, A. and Shetty, H. S. 1993. Isolation and immunochemical characterization of the alcohol extractable proteins (kafirins) of *Sorghum bicolor* (L.)Moench. J. Cereal Sci. 17: 83.

Meilgaard, M., Civille, G. V. and Carr, B. T. 2000. Sensory Evaluation Techniques. Florida: CRC Press.

Min , T. S. , Chang , N. M. , Kwang , L. H. , Brown , G. , Smith , J. , and McClare , J. 1994. Production of Batterd and Breaded Fish Products from Minced Fish and Surimi. Region Centre for Information Preparation and Dissemination, Department of Fisheries Malaysia. pp 31-36 .

Pearce, K. N. and Kinsella, J. E. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of turbidimetric technique. J. Agric Food Chem. 26(3): 716-723.

Raton, B. 1996. Sorghum proteins. In R. La'sztity.(ed.), The Chemistry of Cereal Proteins. 2nd ed., pp. 227-248. Florida: CRC Press.

Rayas, L. M., Hernandez, R. J. and Ng, P. K. W. 1997. Development and charaterization of biodegradable/edible wheat protein films. J. Food Sci. 62(1): 160.

Sathe, S. K., Desphande, S. S. and Salunkhe, D. K. 1982. Functional properties of winged bean proteins. J. Food Sci. 47: 503-509.

Sathe, S. K. and Salunkhe, D. K. 1981. Functional properties of the great northern bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein: Emulsion, foaming, viscosity, and gelation properties. J. Food Sci. 46: 71-74.

Shih, F. F. and Daigle, K. 1997. Use of enzymes for the separation of protein from rice flour. Cereal Chem. 74(4): 437-441.

Shull, J. M., Watterson, J. J., Kirleis, A. W. 1991. Proposed nomenclature of the alcohol soluble proteins (kafirins) of *Sorghum bicolor* L. Moench based on molecular weight, solubility and structure, J. Agric. Food Chem. 39: 83.

Steenson, D. F. and Sathe, S. K. 1995. Characterization and digestibility of Basmati rice *(Orayza sativa L. var Dehraduni)* storage proteins. Cereal Chem. 72(3): 275-280.

Townsend, A. and Nakai, S. 1983. Relationships between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins. J. Food Sci. 48: 588-594.

Vioque, R. S., Clemente, A., Vioque, J., Bautista, J. and Milla'n, F. 1999. Protein isolate from chickpea *(Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. Food Chem. 64: 237-243.

Virupaksha, T. K. and Sastry, L. V. S. 1968. Studies on the protein content and amino acid composition of some varieties of grain sorghum. J. Agric Food Chem.16(2): 199-203.

Wall, J. S. and Blessin, C. W. 1970. Composition of Sorghum Plant and Grain. In J. S. Wall and W. M. Ross(eds.), Sorghum Production and Utilization, pp. 118-166. Westport Connecticut: The AVI Publishing Company.

Waniska, R. D. and Kinsella, J. E. 1979. Foaming properties of protein: foaming. J. Food Sci. 41: 498.

Watson, S. A. 1970. Wet-milling process and products. In J. S. Wall and W. M. Ross (eds.), Sorghum Production and Utilization, pp. 118-166. Westport Connecticut: The AVI Publishing Company.

Watson, S. A. 1984. Corn and sorghum starches: Production. In R. L. Whistler, J. W. BeMiller and E. F. Paschall(eds.), Starch: Chemistry and Technology. 2nd ed., pp. 417-468. Orlando Florida: Academic Press.

Watterson, J. J., Shull, J. M. and Kirleis, A. W. 1993. Quantitation of α-, β-, and γ-kafirins in vitreous and opaque endosperm of *Sorghum bicolor*. Cereal Chem. 70(4): 452-457.

Were, L., Hettiarachchy, N. S. and Kalapathy, U. 1997. Modified soy proteins with improved foaming and water hydration properties. J. Food Sci. 62 (4): 821-823.

Wilde, P. J. and Clark, D. C. 1996. Foam formation and stability. In G. M. Hall.(ed.), Method of Testing Protein Functionality, pp. 110-154. London: Blackie Academic & Profession.

Wu, Y. V.1978. Protein concentrate from normal and high-lysine sorghums: Preparation, composition, and properties. J. Agric Food Chem. 26(2): 305-309.

Wu, Y. V. and Stringfellow, A. C. 1980. Protein isolate from alkaline extraction of air-classified high-protein soft wheat flour. J. Food Sci. 45: 1383-1386.

Xie, X. J. and Seib, P. A. 2000. Laboratory procedure to wet-milling 100 g of grain sorghum into six fractions. Cereal Chem. 77(3): 392-395.

Yang, P. and Seib, P. A. 1996. Wet milling of grain sorghum using a short steeping period. Cereal Chem. 73(6): 751-755.

Youssef, A. M. 1998. Extractability, fractional and nutritional value of low and high tannin sorghum proteins. Food Chem. 63(3): 325-329.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

วิธีการโม่แป้ง การวิเคราะห์ทางเคมี และการคำนวณ

ก.1 การโม่แป้งแบบแห้ง (Wu, 1978)

1. โม่เมล็ดข้าวฟ่างที่แห้งและสะอาดโดยใช้โม่หิน (Stone disk mill) ทำการโม่ 2 ครั้ง โดยครั้งแรกจะเป็นการโม่หยาบและครั้งที่สองจะเป็นการโม่ละเอียด
2. ร่อนแยกแป้งด้วยเครื่องเขย่า (รุ่น Retsch) และตะแกรงขนาด 45, 70 และ 100 mesh ตามลำดับ
3. อบแป้งที่ได้จาการร่อนแยกที่ 40 °C นาน 16 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง Tray dryer (ของ บริษัท เหยี่ยวเฮง จำกัด) เพื่อลดความชื้น
4. บรรจุใส่ถุงสุญญากาศ (PET / ALU / L-LDPE ของ บริษัท สตรองแพค จำกัด) และปิดผนึกด้วยเครื่องปิดผนึกแบบสุญญากาศ (Multivac)

ก. 2 การโม่แป้งแบบเปียก (Xie and Seib, 2000)

1. นำเมล็ดข้าวฟ่างที่แห้งและสะอาดประมาณ 1,000 g ใส่ในบีกเกอร์ เติมสารละลายโซเดียมไบซัลไฟต์ (A.R. เกรด,May & Baker, England) ความเข้มข้น 0.2 % (w/v) ปริมาตร 2 เท่าของน้ำหนักเมล็ดข้าวฟ่าง แช่ที่อุณหภูมิ 52°C นาน 48 ชั่วโมงในเครื่อง Water bath (Julabo รุ่น Shake Temp SW23)
2. รินสารละลายออกจากเมล็ดข้าวฟ่าง นำเมล็ดข้าวฟ่างล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆครั้งจนน้ำที่ใช้ล้างใส
3. โม่ข้าวฟ่าง 2 ครั้ง ในครั้งแรกจะเป็นการโม่หยาบโดยเติมน้ำขณะโม่ในอัตราส่วนข้าวฟ่าง : น้ำ เท่ากับ 1:4 และครั้งที่สองจะเป็นการโม่ละเอียดโดยนำน้ำแป้งข้าวฟ่างที่ผ่านการโม่ในครั้งแรกมาโม่ซ้ำ
4. เหวี่ยงแยกน้ำออกจากข้าวฟ่างที่ผ่านการโม่ที่ 3,500 rpm. ด้วยเครื่องเหวี่ยงแยก (Heraeus Christ รุ่น Varifuge K) นำข้าวฟ่างไปอบให้แห้งที่ 40°C นาน 16 ชั่วโมงด้วยเครื่อง Tray dryer
5. บดข้าวฟ่างที่ผ่านการโม่และอบแห้งแล้วให้อนุภาคแยกออกจากกันโดยใช้โม่หิน
6. ร่อนแยกแป้งด้วยเครื่องเขย่าและตะแกรงขนาด 45, 70 และ 100 mesh ตามลำดับ

7. อบแป้งที่ได้จากการร่อนแยกที่ 40°C นาน 16 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง Tray dryer
8. บรรจุใส่ถุงสุญญากาศ และปิดผนึกด้วยเครื่องปิดผนึกแบบสุญญากาศ

ก.3 การสกัดไขมันออกจากแป้ง (Were, Hettiarachchy and Kalapathy, 1997)

1. ชั่งแป้งประมาณ 200 กรัมใส่ในบีกเกอร์ เติมเฮกเซนลงไป ในอัตราส่วนแป้งต่อเฮกเซนเท่ากับ 1:5 (w/v) กวนผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวน (P SELECTA รุ่น AGIMATIC-N) ที่ 300 rpm. นาน 30 นาที ในตู้ดูดควัน
2. กรองเฮกเซนออกจากแป้งโดยใช้ปั๊ม (Eyela รุ่น Aspirator A-33) ผ่านกระดาษกรอง Whatman # 1
3. นำแป้งที่ได้อบที่ 50°C นาน 2 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง Tray dryer นำแป้งออกมาทิ้งให้เย็นจนมีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 15 นาที)
4. บรรจุใส่ถุงสุญญากาศและปิดผนึกด้วยเครื่องปิดผนึกแบบสุญญากาศ

ก.4 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (ดัดแปลงวิธีของ A.O.A.C. (1995) section 32.1.03)

1. อบภาชนะ (dish)ในตู้อบลมร้อน (WTB binder รุ่น ED) ที่อุณหภูมิ 105°C จนน้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นใน desiccator
2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 3 กรัม ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอนใส่ที่ภาชนะ โดยใช้เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (AND รุ่น HR – 200)
3. นำตัวอย่างเข้าตู้อบ ที่อุณหภูมิ 105°C จนน้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

การคำนวณ

$$\text{ความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{[\text{น้ำหนักก่อนอบแห้ง (g)} - \text{น้ำหนักหลังอบแห้ง (g)}]}{\text{น้ำหนักก่อนอบแห้ง (g)}} \times 100$$

ก.5 การวิเคราะห์เถ้า (ดัดแปลงวิธีของ A.O.A.C.(1995) section 32.1.05)

1. อบภาชนะ (crucible) ที่อุณหภูมิ 105°C จนน้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วจึงชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของ crucible
2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 3 กรัม ที่แห้งสนิทและทราบน้ำหนักที่แน่นอนใส่ที่ภาชนะ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. เอาไปเผาจนไม่มีควัน
4. นำตัวอย่างเผาต่อใน muffle furnace (Isotemp) ที่อุณหภูมิ 550°C จนได้เถ้าสีขาว
5. ทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

ปริมาณเถ้า (ร้อยละ) = $\frac{\text{ปริมาณเถ้า (g)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}} \times 100$

ก.6 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (ดัดแปลงวิธีของ A.O.A.C.(1995) section 32.1.13)

1. อบขวดสกัดไขมัน ที่อุณหภูมิ 105°C จนน้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นใน desiccator
2. ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของขวดไขมัน
3. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 3 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman # 1
4. ใส่ห่อตัวอย่างใน thimble กระดาษ แล้วนำ thimble กระดาษใส่ใน thimble ของชุดสกัดไขมัน (Gerhardt)
5. ต่อขวดสกัดไขมันที่แห้ง และทราบน้ำหนักที่แน่นอน
6. เติมปิโตรเลียม อีเธอร์ (A.R. เกรด, Scharlau, Spain) 250 ml. ลงด้านบนของชุดสกัดไขมันผ่าน thimble ลงมา
7. สกัดไขมันเป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง ควบคุมอุณหภูมิโดยปรับระดับเตาให้ความร้อนที่ระดับ 2
8. ระเหยปิโตรเลียม อีเธอร์ ออกจากขวดไขมัน โดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ (Eyela รุ่น SB-651) แล้วอบขวดที่อุณหภูมิ 105°C จนน้ำหนักคงที่
9. ทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

ไขมัน (ร้อยละ) = $\frac{\text{ปริมาณไขมันที่สกัดได้ (g)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}} \times 100$

ก.7 การวิเคราะห์ปริมาณเส้นใย

1. อบกระดาษกรอง Whatman # 42 และ crucible ที่อุณหภูมิ 105°C จนน้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นใน desiccator ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ผ่านการสกัดไขมันแล้ว ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 3 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 600 ml.
3. เติมสารละลายกรดซัลฟูริก (A.R. เกรด ของ Univar, Australia) ความเข้มข้น 1.25% (w/v) 200 ml. ต้มเดือดเพื่อย่อยตัวอย่างนาน 30 นาที
4. กรองผ่านผ้าขาวบางและล้างด้วยน้ำร้อนจนหมดฤทธิ์กรด
5. นำกากที่ได้มาย่อยต่อด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (A.R. เกรด, Univar, Australia) ความเข้มข้น 1.25% (w/v) 200 ml. ต้มเดือดนาน 30 นาที
6. กรองผ่านกระดาษกรองและล้างด้วยน้ำร้อนจนหมดฤทธิ์ด่าง แล้วล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95% ประมาณ 10 ml.
7. นำตัวอย่างที่ห่อด้วยกระดาษกรองไปอบที่อุณหภูมิ 105°C จนน้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
8. นำกากไปเผาที่อุณหภูมิ 550 °C จนได้น้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเส้นใย (ร้อยละ)} = \frac{[\text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (g)}]}{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา (g)}} \times 100$$

ก.8 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 2 กรัม ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman # 1 ใส่ลงลงในขวดย่อย
2. เติมตัวเร่งปฏิกริยา ซึ่งใช้ Selenium mixture reagent (A.R. เกรด, Merck, German) ประมาณ 5 กรัม
3. เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 ml.
4. ย่อยด้วยเครื่องย่อย (BUSHI รุ่น K-424) จนตัวอย่างมีสีเขียว จึงนำออกจากเครื่องย่อยทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง
5. นำตัวอย่างที่ย่อยได้มากลั่นด้วยเครื่องกลั่น (BUSHI รุ่น B-324) โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (commercial เกรด) ความเข้มข้น 35% (w/w) เป็นตัวเร่งปฏิกริยาจนตัวอย่างในหลอดมีสีน้ำตาลเข้ม
6. กลั่นตัวอย่างโดยเก็บสิ่งที่กลั่นได้ในสารละลายกรดบอริก (A.R. เกรด, Univar, Australia) ความเข้มข้น 4% (w/v) ปริมาตร 50 ml. ซึ่งเติมอินดิเคเตอร์ (เมทิลเรด

(A.R. เกรด, Fluka) และโบรโมครีซอลกรีน (A.R. เกรด, Fluka) อัตราส่วน 1:5 ละลายในเอทานอล 95% ความเข้มข้นร้อยละ 0.1) 2-3 หยด กลั่นจนมีปริมาตร 200 ml.

7. ไตเตรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (A.R. เกรด, Univar, Australia) ความเข้มข้น 0.1 N

การคำนวณ

ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ) = $\frac{1.4007 \times A \times B \times C}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$

โดย A คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ (ml.)

B คือ ความเข้มข้นที่แน่นอนของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ (N)

C คือ conversion factor สำหรับเปลี่ยนไนโตรเจนให้เป็นโปรตีน (ในการทดลองใช้ค่าเป็น 6.25)

ก.9 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต

การคำนวณ

ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ) = 100 – (ปริมาณความชื้น+เถ้า+ไขมัน+โปรตีน+เส้นใย)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

วิธีการสกัดโปรตีนและการคำนวณหาปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีน

ข. 1 การสกัดโปรตีนด้วยสารละลายด่าง (Wu, 1978)

1. ชั่งแป้งที่ผ่านการสกัดไขมันประมาณ 300 กรัมใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นลงไป 2 เท่าของน้ำหนักแป้ง ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องกวน ปรับให้น้ำแป้งมี pH เท่ากับ 9, 10, 11 และ 11.5 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.25 N วัด pH ของสารละลายโดยวัดด้วยเครื่องวัด pH (Horiba รุ่น F-21) ซึ่งผ่านการ calibration ด้วยสารละลายมาตรฐาน (pH standard solutions) (Horiba รุ่น 101-S) ที่ pH 7.0, 9.0 และ 4.0 สกัดนาน 30 นาที
2. เหวี่ยงแยกสารละลายโปรตีนด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกที่ 3,500 rpm. นาน 10 นาที
3. นำแป้งที่ผ่านการสกัดในครั้งแรกมาสกัดโปรตีนซ้ำอีกครั้ง โดยเติมน้ำลงไป 1 เท่าของน้ำหนักแป้งตอนเริ่มต้น กวนผสมให้เข้ากัน สกัดโดยวิธีเดียวกับการสกัดครั้งแรก
4. ตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 N โดยปรับให้มี pH เท่ากับ 3.5, 4.0 และ 4.5 เหวี่ยงแยกตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกที่ 3, 500 rpm. นาน 10 นาที
5. ล้างตะกอนโปรตีนด้วยน้ำกลั่น เหวี่ยงแยกน้ำที่ใช้ล้างออกที่ 3,500 rpm.นาน 10 นาที ล้างตะกอนโปรตีนซ้ำ 2 ครั้ง
6. ทำแห้งตะกอนโปรตีนโดยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Heto รุ่น Dry Winner) นำตะกอนโปรตีนที่แห้งแล้วเก็บใส่ถุงซิปล็อค (ตราไดมอนด์) โดยรีดถุงเพื่อไล่อากาศออกก่อนปิดผนึก แล้วเก็บถุงที่บรรจุโปรตีนในกล่องพลาสติกที่ปิดสนิทและแห้ง โดยเก็บใส่ในตู้เย็นในช่องแช่แข็ง

ข. 2 การสกัดโปรตีนด้วยแอลกอฮอล์ (Buffo, Weller and Gennadios, 1997)

1. ชั่งแป้งที่ผ่านการสกัดไขมันประมาณ 300 กรัมใส่ในบีกเกอร์ เติมเอทานอล 95% ลงไปแปรอัตราส่วนแป้งต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:3,1:4,1:5,1:6 และ1:7 (w/w) ใช้อลูมิเนียมฟอยล์ปิดปากบีกเกอร์ขณะสกัดโดยกวนผสมให้เข้ากัน สกัดนาน 30 นาที ที่ 65°C
2. กรองแยกสารละลายโปรตีนผ่านกระดาษกรอง Whatman #2 โดยใช้ปั๊ม (Eyela รุ่น

Aspirator A-33)

3. นำแป้งที่ผ่านการสกัดในครั้งแรกมาสกัดโปรตีนอีกครั้ง โดยวิธีเดียวกับการสกัดครั้งแรก
4. เติมน้ำลงไป 2 เท่าของน้ำหนักสารละลายโปรตีน ปิดปากภาชนะด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ และเก็บสารละลายที่อุณหภูมิ –4°C ในช่องแช่แข็งของตู้เย็น นาน 14 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มการตกตะกอนของโปรตีน
5. เหวี่ยงแยกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกความเร็วสูง (Thermo IEC รุ่น IEC Multi RF) ที่ 6,000 x g นาน 10 นาที
6. ล้างตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วยน้ำกลั่น เหวี่ยงแยกน้ำออกที่ 6,000 x g. นาน 10 นาที ล้างตะกอนโปรตีนซ้ำ 2 ครั้ง
7. นำตะกอนโปรตีนที่ได้ไปทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง นำตะกอนโปรตีนทำแห้งแล้วเก็บใส่ถุงซิปล็อค โดยรีดถุงเพื่อไล่อากาศออกก่อนปิดผนึก แล้วเก็บถุงที่บรรจุโปรตีนในกล่องพลาสติกที่ปิดสนิทและแห้ง โดยเก็บใส่ในตู้เย็นในช่องแช่แข็ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การหาน้ำหนักโมเลกุลและการวัดสมบัติเชิงหน้าที่ด้านต่างๆ

ค.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยการทำ Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS – PAGE) (Laemmli, 1970)

การเตรียม stocking solution

1. เตรียม Acrylamide solution โดยใช้ acrylamide (FW 71.08) 60 กรัม และ bisacrylamide (FW 154.17) 1.6 กรัม เติมน้ำปลอดไอออน 200 ml. เก็บสารละลายที่ได้ในตู้เย็น
2. เตรียม 4x Resolving gel buffer โดยใช้ Tris-Cl (FW 121.1) 36.3 กรัม เติมน้ำปลอดไอออน 150 ml. ปรับให้มี pH 8.8 ± 0.05 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 N เติมน้ำปลอดไอออนจนมีปริมาตรสุดท้าย 200 ml. เก็บสารละลายที่ได้ในตู้เย็น
3. เตรียม 4x Stacking gel buffer โดยใช้ Tris-Cl (FW 121.1) 3.0 กรัม เติมน้ำปลอดไอออน 40 ml. ปรับให้มี pH 6.8 ± 0.05 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 N เติมน้ำปลอดไอออนจนมีปริมาตรสุดท้าย 50 ml. เก็บสารละลายที่ได้ในตู้เย็น
4. เตรียม SDS ความเข้มข้น 10% โดยใช้ SDS (FW 288.38) 10 กรัม เติมน้ำปลอดไอออน 100 ml. เก็บสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิห้อง
5. เตรียมAmmonium persulphate ความเข้มข้น10%โดยใช้ ammonium persulphate (FW 228.2) 0.1 กรัม เติมน้ำปลอดไอออน 10 ml. ซึ่งสารละลายชนิดนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้
6. เตรียม 2x Treatment buffer โดยใช้ 4x Stacking gel buffer 2.5 ml., SDS ความเข้มข้น 10% 4.0 ml., กลีเซอรอล 1.0 ml., โบรโมฟีนอล บลู 2.0 มิลลิกรัม., dithiothreitol (DTT, FW 154.2) 0.31 กรัม และน้ำปลอดไอออน 10.0 ml. แบ่งใส่ centrifuge tube หลอดละ 0.5 ml. เก็บที่อุณหภูมิ –20 °C
7. เตรียม Tank buffer โดยใช้ Tris-Cl (FW 121.1) 30.28 กรัม ไกลซีน (FW 75.07) 144.13 กรัม SDS 10 กรัม เติมน้ำปลอดไอออน 10 ลิตร เก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้องได้นาน 1 เดือน

การเตรียม working solution

1. การเตรียม resolving gel solution แสดงดังตารางที่ ค.1

ตารางที่ ค.1 การเตรียม resolving gel solution เมื่อต้องการแผ่นเจลหนา 1 mm. จำนวน 2 แผ่น

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้ายของเจล				
	5%	7.5%	10%	12.5%	15%
Acrylamide solution	3.3 ml	5 ml	6.7 ml	8.3 ml	10 ml
4x Resolving gel buffer	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
SDS ความเข้มข้น 10%	0.3 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
น้ำปลอดไอออน	11.4 ml	9.7 ml	8 ml	5.4 ml	4.7 ml
Ammonium persulphate*	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED*	6.7 µl	6.7 µl	6.7 µl	6.7 µl	6.7 µl

* เติมแล้วควรหล่อเจลทันที

2. การเตรียม stacking gel solution แสดงดังตารางที่ ค.2

ตารางที่ ค.2 การเตรียม stacking gel solution เมื่อต้องการแผ่นเจลหนา 1 mm. จำนวน 2 แผ่น

สารเคมี	ปริมาณ
Acrylamide solution	0.88 ml
4x Stacking gel buffer	1.66 ml
SDS ความเข้มข้น 10%	66 µl
น้ำปลอดไอออน	4.06 ml
Ammonium persulphate*	33.4 µl
TEMED*	3.3 µl

* เติมแล้วควรหล่อเจลทันที

3. การเตรียมสารละลายสำหรับย้อมเจล

3.1 เตรียม fixing solution โดยใช้เมทานอล 500 ml. กรดอะซีติกความเข้มข้น 100% 100 ml. น้ำปลอดไอออน 400 ml.

3.2 เตรียม staining solution โดยใช้ comassie brilliant blue stain 2.50 กรัม เติม fixing solution 1 ลิตร

3.3 เตรียม destain solution โดยใช้เมทานอล 70 ml.กรดอะซีติกความเข้มข้น 100% 70 ml. น้ำปลอดไอออน 860 ml.

การเตรียมแผ่น acrylamide gel

1. ล้างกระจกสำหรับหล่อเจลด้วยน้ำสะอาด ตามด้วยน้ำปลอดไอออน และเอทานอล 95% ตามลำดับ
2. ประกบแผ่นกระจกแผ่นเต็มและแผ่นเว้าเข้าหากัน โดยใช้แผ่นพลาสติกสีขาวหนา 1 mm. (spacer) คั่นไว้ที่ขอบทั้ง 2 ข้าง โดยให้ขอบกระจกชนขอบของแผ่นพลาสติก
3. ประกอบแผ่นกระจกเข้ากับตัวเครื่อง (Hoefer รุ่น mini VE) โดยให้กระจกแผ่นเว้าหันเข้าด้านในของตัวเครื่อง
4. ใช้ไมโครปิเปตดูด resolving gel solution ที่ความเข้มข้น 12.5% หยอดลงในช่องระหว่างแผ่นกระจก โดยหยอดให้ชิดด้านข้างใดข้างหนึ่งเพื่อป้องกันไม่ให้มีฟองอากาศ ให้ระดับของสารละลายต่ำกว่าขอบบนของกระจกแผ่นเว้า 1.5-2 ซม.
5. หยอดน้ำปลอดไอออนหรือบิวทานอล 1 ml. ปิดทับผิวหน้าเจล ตั้งแท่นหล่อเจลทิ้งไว้บนพื้นเรียบประมาณ 3 ชั่วโมง เจลจะแข็ง
6. ใช้ไมโครปิเปตดูด stacking gel solution หยอดลงในช่องระหว่างแผ่นกระจก โดยหยอดให้ชิดด้านข้างใดข้างหนึ่งเพื่อป้องกันไม่ให้มีฟองอากาศ ให้ระดับของสารละลายสูงถึงขอบบนของกระจกแผ่นเว้า
7. เสียบหวีพลาสติก (comb) ลงในช่องระหว่างแผ่นกระจก เพื่อให้เกิดช่องสำหรับหยอดตัวอย่าง (well) ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้เจลทั้งสองชั้นแข็งตัวดี แล้วจึงดึงหวีพลาสติกออก จะได้แผ่นเจลที่พร้อมสำหรับใช้หาขนาดโมเลกุล

การเตรียมสารละลายโปรตีน

ชั่งตะกอนโปรตีนที่สกัดได้ประมาณ 0.0013-0.0015 กรัม ใส่ใน microcentrifuge tube เติม treatment buffer 200 μl. ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มที่น้ำเดือด นาน 3 นาที ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายมีอุณหภูมิห้อง หากสารละลายมีตะกอนควรนำไปเหวี่ยงแยกก่อนแล้วจึงนำส่วนใสมาใช้ โดยสารละลายโปรตีนที่ได้ควรมีปริมาณโปรตีน 8-10 ไมโครกรัมในสารละลาย 5 ไมโครลิตร

การเตรียม molecular weight marker

molecular weight marker ที่ใช้เป็นชนิด low molecular weight (Amersham biosciences) มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 14.4, 20.1, 30.0, 45.0, 66.0 และ 97.0 kDa เตรียมสารละลาย low molecular weight marker โดยละลายโปรตีนใน vial ด้วย sample buffer (ผสม treatment buffer กับน้ำปลอดไอออน ในอัตราส่วน 1:1) 200 μl. ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ microcentrifuge tube หลอดละ 25 μl. เก็บที่อุณหภูมิ 0 °C

วิธีการหาขนาดโมเลกุลของโปรตีน

1. ดูดสารละลาย low molecular-weight marker 10 μl. โดยใช้เข็มฉีดยา (HPLC Syringe) หยอดสารละลายลงใน well ล้างเข็มด้วยน้ำปลอดไอออน ดูดสารละลายโปรตีนที่เตรียมหยอดลงในแต่ละ well ปริมาณ 5 μl. ต่อ well โดยต้องล้างเข็มก่อนทุกครั้งที่ดูดตัวอย่างใหม่
2. ประกอบแท่นหล่อเจลที่เตรียมเข้ากับแทงค์ คลายส่วนฐานของแท่นออก เติมสารละลาย tank buffer ใส่ในช่องของแท่นหล่อเจลที่อยู่ด้านหลังแผ่นกระจกที่มีแผ่นเจลอยู่จนท่วมแผ่นเจล แล้วจึงเติมสารละลาย tank buffer ลงในแทงค์โดยให้อยู่ในระดับขีดบนและขีดล่างของตัวแทงค์ ปิดฝาแทงค์
3. ต่อชุดวิเคราะห์เข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า กำหนดให้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ เท่ากับ 300 V และกระแสไฟฟ้าเท่ากับ 25 mA กดปุ่ม start
4. รอจนตัวอย่างวิ่งลงมาตามแผ่นเจลจนสุดขอบล่างของแผ่นกระจก โดยมีระยะห่างจากขอบล่างประมาณ 2-3 mm. ปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้า นำแท่นหล่อเจลออกจากแทงค์ แกะแผ่นเจลออกจากกระจก โดยจับที่ขอบล่างของแผ่นเจล
5. นำแผ่นเจลมาแช่ใน fixing solution นานประมาณ 30 นาที นำแผ่นเจลมาแช่ต่อใน staining solution นานประมาณ 30 นาที โดยสารละลายทั้งสองชนิดต้องท่วมแผ่นเจล
6. นำแผ่นเจลมาแช่ใน destain solution ประมาณ 60 นาที โดยนำไปเขย่าช้าๆบนเครื่องเขย่า เท destain solution ทิ้ง แล้วเติม destain solution ใหม่ลงไป นำไปเขย่าต่อประมาณ 60 นาที จะเริ่มเห็นแถบโปรตีน เท destain solution ทิ้ง เปลี่ยนเป็นน้ำปลอดไอออนแทน นำไปเขย่าช้าๆบนเครื่องเขย่า ทิ้งข้ามคืน แล้วจึงเทน้ำปลอดไอออนทิ้ง เติมน้ำปลอดไอออนใหม่ลงไป นำไปวางบนเครื่องเขย่า ทิ้งข้ามคืน เปลี่ยนน้ำปลอดไอออนจนกว่าแผ่นเจลจะใส หรือเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

7. เก็บรักษาแผ่นเจลโดยการทำแห้ง โดยนำแผ่นเจลวางบนกระดาษแก้วชุบน้ำที่ปูบนกระจก ปิดทับด้วยกระดาษแก้วชุบน้ำอีกแผ่น รีดกระดาษแก้วให้แนบกับแผ่นเจลโดยไม่ให้มีฟองอากาศ ถ้ามีให้ฉีดน้ำปลอดไอออนแล้วรีดกระดาษแก้วเพื่อไล่ฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 48 ชั่วโมง จะได้แผ่นเจลที่แห้ง
8. วัดระยะทางที่สารละลายโปรตีน low molecular-weight marker และสีย้อมเคลื่อนที่เพื่อคำนวณหาค่า R_f

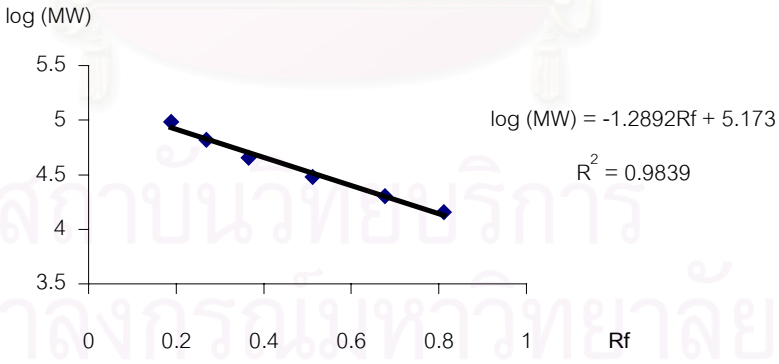
การคำนวณหาขนาดโมเลกุล

คำนวณหาค่า R_f ของสารละลายโปรตีน และ low molecular- weight marker

โดย $R_f = \frac{\text{ระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่สีย้อมเคลื่อนที่}}$

และสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง log (MW) และR_f ของ low molecular-weight marker ดังรูปที่ 1ค เมื่อแทนค่า R_f ของสารละลายโปรตีนลงในสมการ จะทราบค่า log (MW) คำนวณหาค่ามวลโมเลกุลของสารละลายโปรตีน

โดย มวลโมเลกุลของสารละลายโปรตีน $= 10^{\log (MW)}$



รูปที่ ค.1 ตัวอย่างกราฟของ low molecular- weight marker ในการหาขนาดโมเลกุลของสารละลายโปรตีน

ค.2 Water Holding Capacity (WHC) และ Oil Holding Capacity (OHC)

(Were, Hettiarachchy and Kalapathy,1997)

1. ชั่งหลอด Centrifuge ขนาด 15 ml. ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างตะกอนโปรตีนประมาณ 1 กรัมใส่ในหลอดโดยจดน้ำหนักที่แน่นอน
3. เติมน้ำปลอดไอออน 5 ml.
4. ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่อง Vortex mixer นาน 30 วินาที
5. เหวี่ยงแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงแยก (Heraeus รุ่น Medifuge) ที่ความเร็ว 2,000 x g. นาน 10 นาที
6. รินแยกส่วนของน้ำออก แล้วชั่งน้ำหนักหลอด

การคำนวณ

$$\text{WHC (g / g dry)} = \frac{\text{น้ำหนักเปียกหลังเหวี่ยงของตะกอนโปรตีน (g)}}{\text{น้ำหนักแห้งของตะกอนโปรตีน (g)}}$$

หมายเหตุ

การวัดค่า OHC ใช้วิธีการวัดและการคำนวณเช่นเดียวกับค่า WHC แต่เปลี่ยนจากน้ำปลอดไอออนเป็นน้ำมันถั่วเหลือง (ตรา อุง่น) แทน

ค.3 Emulsifying Activity (EA) และ Emulsion stability (ES) (Pearce and Kinsella, 1978)

การเตรียมสารละลายโปรตีน

1. เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อใช้เป็นตัวทำละลายโดยใช้สารละลายกรดซิตริก (A.R. เกรด, Univar, Australia) ความเข้มข้น 0.1 M และสารละลายโซเดียมฟอสเฟต (A.R. เกรด, Univar, Australia) ความเข้มข้น 0.2 M ผสมกันและปรับให้มี pH 8 โดย
2. ชั่งตะกอนโปรตีน 5 กรัม โดยจดน้ำหนักที่แน่นอน
3. ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 ml. เติมลงไป
4. กวนผสมนาน 1 ชั่วโมงโดยใช้เครื่องกวนและแท่งแม่เหล็ก

วิธีการหาค่า EA และ ES

1. เตรียมสารละลายอิมัลชันโดยใช้สารละลายโปรตีนความเข้มข้น 1% ปริมาตร 30 ml. และน้ำมันถั่วเหลืองปริมาตร 10 ml.

2. ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Hand homogenizer (Ystral รุ่น Gmbh) นาน 30 วินาที
3. นำอิมัลชันที่ได้เจือจางด้วยสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (A.R. เกรด, Univar, Australia) ความเข้มข้น 0.1% ในอัตราส่วน 1/1000
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 500 nm. (Jasco รุ่น SSE-343) ที่เวลา 0 และ 30 นาที

การคำนวณ

$$EAI\ (cm^2 / g) = (2T / \phi C)$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นของตะกอนโปรตีน (w/w)

T = Turbidity

ϕ = volume fraction ของน้ำมัน

$$C = \frac{\text{น้ำหนักตะกอนโปรตีน (g)}}{\text{ปริมาตรตัวทำละลาย (ml หรือ } cm^3)}$$

$$T = \frac{2.303 \times A}{l}$$

เมื่อ T = ค่า Turbidity

A = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)

l = ความกว้างของ cuvette (1 cm)

$$\phi = \frac{c - a - E(b - c)}{c - a + (b - c)\{(1 + E)D_O / D_S - E\}}$$

เมื่อ a = น้ำหนักบีกเกอร์ (g)

b = น้ำหนักบีกเกอร์และอิมัลชัน (g)

c = น้ำหนักบีกเกอร์และอิมัลชันหลังอบแห้ง (g)

D_O = ความหนาแน่นของน้ำมันถั่วเหลือง (g/cm^3)

D_S = ความหนาแน่นของสารละลายโปรตีน (g/cm^3)

E = ความเข้มข้นของโปรตีน (w/w)

$$E = \frac{\text{น้ำหนักตะกอนโปรตีน (g)}}{\text{น้ำหนักตัวทำละลาย (g)}}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$$\text{ESI (\%)} = \frac{\text{ค่า EAI ที่เวลา 0 นาที}}{\text{ค่า EAI ที่เวลาผ่านไป}} \times 100$$

หมายเหตุ

ค่า EA จะคำนวณในรูปของค่า EAI โดยวัดที่เวลา 0 นาที

ค่า ES จะจะคำนวณในรูปของค่า ESI โดยวัดที่เวลา 30 นาที

ค.4 Foaming Capacity (FC) และ Foaming Stability (FS) (Sathe and Salunkhe ,1981)

1. ชั่งตะกอนโปรตีนประมาณ 1 กรัม โดยจดน้ำหนักที่แน่นอน
2. เติมน้ำปลอดไอออนลงไป 100 ml. ตีผสมโดยใช้เครื่องตีไข่ (Airlux รุ่น HA-3127) นาน 5 นาที โดยใช้ความเร็วสูงสุด
3. เทใส่กระบอกตวงขนาด 200 ml. วัดปริมาตรของฟองที่เวลา 0 และ 30 นาที ตามลำดับ

การคำนวณ

$$\text{ปริมาตรที่เพิ่มขึ้น (\%)} = \frac{\text{(ปริมาตรหลังตี – ปริมาตรก่อนตี) (ml.)}}{\text{ปริมาตรก่อนตี (ml.)}} \times 100$$

หมายเหตุ

ค่า FC คือ ปริมาตรที่เพิ่มขึ้น (%) ที่เวลา 0 นาที โดยวัดหลังจากตีเสร็จทันที

ค่า FS คือ ปริมาตรที่เพิ่มขึ้น (%) โดยวัดที่เวลา 30 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

การผลิตเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์ (Fish finger)

เนื้อในของฟิชฟิงเกอร์ที่ใช้ในการทดลอง หมายถึง เนื้อปลาไส้ในของฟิชฟิงเกอร์ โดยเมื่อสับผสมเสร็จแล้ว จะทำให้สุกโดยการนึ่งแทนการนำไปชุบแป้ง ชุบเกล็ดขนมปังแล้วทอด เนื่องจากผลของแป้ง เกล็ดขนมปังและการทอดอาจมีผลต่อการทดสอบความชอบและเนื้อสัมผัส

การผลิตเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์ โดยดัดแปลงวิธีของ Min และคณะ (1994)

ส่วนผสม

เนื้อปลาทรายแดง	62.0%
เกลือ	1.8%
น้ำตาล	4.4%
แป้งข้าวโพด	4.4%
กระเทียม	1.3%
พริกไทย	1.3%
น้ำแข็ง	18.6%
น้ำมัน	6.2%

การเตรียมวัตถุดิบ

1. นำปลาทรายแดงมาล้างให้สะอาด ตัดหัว ควักไส้ แล้วแล่ปลาออกเป็น 2 ส่วน ตามด้านข้างลำตัว ขูดเอาแต่เนื้อปลา นำเนื้อปลาที่ได้เกลี่ยลงบนถาดที่ปูด้วยพลาสติกแช่ในช่องแช่แข็งของตู้เย็นจนมีอุณหภูมิ -1 ถึง -2 °C (ประมาณ 1 ชั่วโมง) เพื่อช่วยลดอุณหภูมิของเนื้อปลาที่นำมาสับผสม
2. ชั่งส่วนผสมแห้งต่างๆ ตามสูตร ผสมส่วนผสมต่างๆ ให้เข้ากันดี โดยชั่งเกลือแยกต่างหาก น้ำแข็งที่ชั่งแล้วให้นำไปเก็บในช่องแช่แข็ง
3. แช่โถ และใบมีดที่จะใช้ในการบดในน้ำผสมน้ำแข็ง และเตรียมถุงน้ำแข็งผสมน้ำเพื่อใช้ในการหล่อเย็นขณะบด

ขั้นตอนการผลิต

1. นำเนื้อปลาที่มีอุณหภูมิ -1 ถึง -2 °C (อย่าให้ต่ำกว่านี้เพราะจะแข็งและทำให้บดไม่ได้) ใส่ในโถที่เย็นให้ทั่ว โรยเกลือให้ทั่วเนื้อปลาเพื่อให้เกิดการสกัดโปรตีน สับผสมนาน 2-3 นาที
2. ควบคุมอุณหภูมิขณะสับผสมไม่ให้เกิน 10°C โดยใช้ถุงน้ำแข็งประคบข้างๆโถบด และถ้าอุณหภูมิของเนื้อปลาที่บดเริ่มสูงอาจเติมน้ำแข็งเพื่อช่วยลดอุณหภูมิ
3. เติมส่วนผสมแห้งที่ผสมเข้ากันดีแล้ว น้ำมัน และน้ำแข็ง สับผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใช้เวลาประมาณ 3 นาที จะได้เนื้อในของฟิชฟิงเกอร์
4. นำเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์ที่ได้เกลี่ยลงบนถาดที่รองด้วยพลาสติกให้มีความหนาประมาณ 3/4 นิ้ว ปิดทับผิวหน้าด้วยพลาสติกอีกครั้ง แช่แข็งจนเนื้อด้านในของเนื้อในของฟิชฟิงเกอร์มีอุณหภูมิประมาณ –4 ถึง –5 °C
5. ตัดให้มีขนาด 1.5 x 2.5 ซม. นึ่งประมาณ 15 นาที หรือจน fish finger สุก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

แบบทดสอบสมบัติทางประสาทสัมผัสของ Fish Finger

ชื่อ ..... วันที่ .....

โปรดพิจารณาความแตกต่างทางประสาทสัมผัสโดยรวมของ Fish Finger ทั้ง 3 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (control) โดยพิจารณาทีละตัวอย่างว่า **แต่ละตัวอย่างมีความแตกต่างจาก control หรือไม่** โดยทำเครื่องหมาย / ลงในช่อง พร้อมทั้งให้คะแนนความชอบโดยรวมของตัวอย่างทั้ง 4 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	แตกต่าง	**ไม่**แตกต่าง
....		

ไม่ชอบ ชอบปานกลาง ชอบมากที่สุด

ข้อเสนอแนะ / ความคิดเห็น .....

.....

.....

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ ฉ.1 ความแปรปรวนของค่าปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่าง

SOV	d.f.	M.S.	F
Milling (A)	1	12777.853	14968.032*
Extraction (B)	3	1942.554	2275.516*
Precipitaion (C)	2	188.296	220.571*
AB	3	161.440	189.111*
AC	2	20.131	23.581*
BC	6	0.551	0.646
ABC	6	8.542	10.006*
Error	120	0.854	
Total	143		

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฉ.2 ความแปรปรวนของค่าปริมาณโปรตีน (% yield) ที่สกัดด้วยสารละลายด่าง

SOV	d.f.	M.S.	F
Milling (A)	1	8.633	1773.983*
Extraction (B)	3	16.295	3348.252*
Precipitaion (C)	2	0.460	94.459*
AB	3	0633	130.073*
AC	2	0.082	16.770*
BC	6	0.008	1.713
ABC	6	0.035	7.117*
Error	120	0.005	
Total	143		

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ฉ.3 ความแปรปรวนของค่า % Protein recovery ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่าง

SOV	d.f.	M.S.	F
Milling (A)	1	9281.808	3570.149*
Extraction (B)	3	2878.700	1107.646*
Precipitaion (C)	2	91.181	35.072*
AB	3	25.259	9.715*
AC	2	2.900	1.116
BC	6	1.901	0.731
ABC	6	1.429	0.550
Error	120	2.600	
Total	143		

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฉ.4 ความแปรปรวนของค่าปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95%

SOV	d.f.	M.S.	F
Milling (A)	1	132.493	328.406*
Ethanol (B)	4	48.394	119.953*
A x B	4	1.462	3.623*
Error	50	0.403	
Total	59		

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ฉ.5 ความแปรปรวนของค่าปริมาณโปรตีน (% yield) ที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95%

SOV	d.f.	M.S.	F
Milling (A)	1	0.795	110.710*
Ethanol (B)	4	0.543	75.601*
A x B	4	0.055	7.649*
Error	50	0.007	
Total	59		

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฉ.6 ความแปรปรวนของค่า% Protein recovery ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95%

SOV	d.f.	M.S.	F
Milling (A)	1	59.597	45.100*
Ethanol (B)	4	93.407	70.686*
A x B	4	5.199	3.935*
Error	50	1.321	
Total	59		

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ฉ.7 ความแปรปรวนของค่า WHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่าง

SOV	d.f.	M.S.	F
Milling (A)	1	356.288	3252.580*
Extraction (B)	3	15.080	137.663*
Precipitaion (C)	2	18.863	172.197*
AB	3	10.756	98.192*
AC	2	10.294	93.977*
BC	6	0.140	1.275
ABC	6	0.082	0.751
Error	120	0.110	
Total	143		

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฉ.8 ความแปรปรวนของค่า WHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95%

SOV	d.f.	M.S.	F
Milling (A)	1	11.658	40.560*
Ethanol (B)	4	4.640	16.143*
A x B	4	2.269	7.894*
Error	50	0.287	
Total	59		

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ฉ.9 ความแปรปรวนของค่า OHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่าง

SOV	d.f.	M.S.	F
Milling (A)	1	832.924	1943.981*
Extraction (B)	3	12.942	30.206*
Precipitaion (C)	2	115.298	269.097*
AB	3	36.115	84.290*
AC	2	48.099	112.260*
BC	6	8.178	19.086*
ABC	6	11.600	27.074*
Error	120	0.428	
Total	143		

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฉ.10 ความแปรปรวนของค่า OHC ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95%

SOV	d.f.	M.S.	F
Milling (A)	1	6.812	11.483*
Ethanol (B)	4	11.698	19.718*
A x B	4	10.290	17.346*
Error	50	0.593	
Total	59		

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ฉ.11 ความแปรปรวนของค่า EAI ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่าง

SOV	d.f.	M.S.	F
Milling (A)	1	976367.18	1829.634*
Extraction (B)	3	36898.243	69.144*
Precipitaion (C)	2	47265.264	88.571*
AB	3	382402.600	716.592*
AC	2	31636.819	59.285*
BC	6	11520.705	21.589*
ABC	6	4514.492	8.460*
Error	120	533.641	
Total	143		

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฉ.12 ความแปรปรวนของค่า ESI ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่าง

SOV	d.f.	M.S.	F
Milling (A)	1	1389.815	232.477*
Extraction (B)	3	2733.580	457.192*
Precipitaion (C)	2	173.586	29.032*
AB	3	119.658	20.013*
AC	2	2.985	0.499
BC	6	12.721	2.128
ABC	6	10.736	1.796
Error	120	5.979	
Total	143		

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ฉ.13 ความแปรปรวนของค่า EAI ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95%

SOV	d.f.	M.S.	F
Milling (A)	1	31563.702	21.740*
Ethanol (B)	4	299222.45	206.097*
A x B	4	12541.769	8.638*
Error	50	1451.850	
Total	59		

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฉ.14 ความแปรปรวนของค่า ESI ของโปรตีนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95%

SOV	d.f.	M.S.	F
Milling (A)	1	17.409	14.032*
Ethanol (B)	4	465.152	374.914*
A x B	4	62.332	50.240*
Error	50	1.241	
Total	59		

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ฉ.15 ความแปรปรวนของค่า FC ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่าง

SOV	d.f.	M.S.	F
Milling (A)	1	338897.65	4056.469*
Extraction (B)	3	91187.208	1092.282*
Precipitaion (C)	2	2014.054	24.125*
AB	3	32238.165	386.163*
AC	2	430.718	5.159*
BC	6	94.729	1.135
ABC	6	271.329	3.250*
Error	120	83.483	
Total	143		

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฉ.16 ความแปรปรวนของค่า FS ของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายด่าง

SOV	d.f.	M.S.	F
Milling (A)	1	6724.286	414.968*
Extraction (B)	3	8179.528	505.884*
Precipitaion (C)	2	1639.431	101.172*
AB	3	1183.865	73.058*
AC	2	620.998	38.323*
BC	6	128.982	7.960*
ABC	6	155.271	9.582*
Error	120	16.204	
Total	143		

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ฉ.17 ความแปรปรวนของการทดสอบทางประสาทสัมผัสในด้านความชอบโดยรวมของฟิชฟิงเกอร์

SOV	d.f.	M.S.	F
Treatment	3	157.181	27.457*
Error	316	5.725	
Total	319		

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฉ.18 ความแปรปรวนของค่าความแข็งของฟิชฟิงเกอร์

SOV	d.f.	M.S.	F
Treatment	3	149000000	232.000*
Error	76	643125.84	
Total	79		

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฉ.19 ความแปรปรวนของค่าความยืดหยุ่นของฟิชฟิงเกอร์

SOV	d.f.	M.S.	F
Treatment	3	0.058	9.673*
Error	76	0.006	
Total	79		

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ฉ.20 ความแปรปรวนของค่าการเกาะตัวกันของฟิชฟิงเกอร์

SOV	d.f.	M.S.	F
Treatment	3	0.008	4.356*
Error	76	0.002	
Total	79		

*มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวเกษมศรี พงษ์เสรี เกิดเมื่อวันที่ 22 ธันวาคม พ.ศ. 2520 ที่จังหวัดนครสวรรค์ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในพ.ศ.2541 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2542

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย