การสกัดโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากข้าวเจ้า

นางสาวกันยารัตน์ เรียวกลาง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2907-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EXTRACTION OF SOLUBLE PROTEINS FROM RICE

Miss Kanyarat Riewklang

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 974-17-2907-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสกัดโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากข้าวเจ้า
โดย	นางสาวกันยารัตน์ เรียวกลาง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม (ถ้ามี)	อาจารย์ ดร. เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยา เลาหสงคราม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม (ถ้ามี)
(อาจารย์ ดร. เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กันยารัตน์ เรียวกลาง: การสกัดโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากข้าวเจ้า (EXTRACTION OF SOLUBLE PROTEINS FROM RICE) อ. ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร, อ. ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์ ดร. เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์, 115 หน้า. ISBN 974-17-2907-3.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาภาวะการสกัดโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (albumin) จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันโดยใช้เอนไซม์ โดยเลือกชนิดเอนไซม์จากโครงสร้างของวัตถุดิบ ในปลายข้าวใช้เอนไซม์ α-amylase และ protease ในรำข้าวและรำสกัดไขมันใช้เอนไซม์ α-amylase cellulase mixed enzymes (arabanase cellulase hemicellulase β-glucanase และ xylanase และ protease) พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากปลายข้าว คือ แป้งจากปลายข้าวไปทำให้สุกที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ย่อยด้วยเอนไซม์ α-amylase เข้มข้น 0.15 %v/w อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที ให้โปรตีน 5.73 มิลลิกรัมต่อปลายข้าว 1 กรัม ส่วนในรำข้าวและรำสกัดไขมันได้ภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้รำข้าวและรำสกัดไขมันที่ไม่ต้องทำให้สุกแล้วย่อยด้วย mixed enzymes เข้มข้น 0.10 %v/w อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที สำหรับรำข้าว และ 60 นาที สำหรับรำสกัดไขมัน ให้โปรตีน 60.90 มิลลิกรัมต่อรำข้าว 1 กรัม และ 31.70 มิลลิกรัมต่อรำสกัดไขมัน 1 กรัม ซึ่งคิดเป็น % recovery เท่ากับ 98.90 และ 71.88 % ตามลำดับ เลือกภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัด albumin จากวัตถุดิบทั้ง 3 ชนิด จากนั้นวิเคราะห์หาขนาดโมเลกุลที่ทำให้เกิดการแพ้ คุณค่าทางโภชนาการ และสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนพบว่า albumin ที่สกัดได้จากวัตถุดิบทั้ง 3 ชนิด ไม่พบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลขนาดเท่ากับ 16 kDa ซึ่งมีรายงานว่าเป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดอาการแพ้ โปรตีนจากรำข้าวที่ย่อยด้วย mixed enzymes มีองค์ประกอบกรดอะมิโนใกล้เคียงกับเคซีนและโปรตีนจากไข่ โปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันมี limiting amino acid คือ lysine methionine และ phenylalanine ตามลำดับ โปรตีนจากรำข้าวที่ย่อยด้วย mixed enzymes มีค่า Protein Efficiency Ratio สูงที่สุด คือ 2.14 (C-PER) และ 2.07 (DC-PER) โปรตีนจากรำข้าวมีสมบัติการเกิดโฟมดีที่สุด คือ สารละลายโปรตีนเข้มข้น 0.20 % ให้ปริมาตรของฟองเท่ากับ 18.00 มิลลิลิตรจากปริมาตรสารละลายทั้งหมด 50 มิลลิลิตร สมบัติการเกิดอิมัลชันของโปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมันมีค่าไม่แตกต่างกัน (0.55 และ 0.58 ตามลำดับ) ในขณะที่โปรตีนจากปลายข้าวมีค่า 0.36

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา…เทคโนโลยีทางอาหาร… ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา…เทคโนโลยีทางอาหาร… ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา…2545… ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4272210623 MAJAOR: FOOD TECHNOLOGY

KEY WORD: rice, soluble proteins extraction, enzymatic treatment

KANYARAT RIEWKLANG: EXTRACTION OF SOLUBLE PROTEINS FROM RICE.

THESIS ADVISOR: ASST. PROF. SUMATE TANTRATIAN. Ph.D., THESIS

COADVISOR: KIATTISAK DUANGMAL. Ph.D. 115 pp. ISBN 974-17-2907-3.

This research was aimed to study the conditions for extraction of soluble proteins from broken rice, rice bran and defatted rice bran by using enzymatic treatment. The selection of enzyme for each treatment was based on the structure of raw materials. The α-amylase and protease were chosen for the extraction of soluble proteins from broken rice. Whilst α-amylase, cellulase, mixed enzymes (arabanase, cellulase, hemicellulase, β-glucanase and xylanase), and protease were used for the extraction of soluble proteins from rice bran and defatted rice bran. It was found that the optimum condition for the extraction of soluble proteins from broken rice was obtained by using broken rice flour treated at 95 degree celcius for 30 minutes coupled with the addition of α-amylase (0.15% v/w), pH 6.5, incubating at 70 degree celcius for 120 minutes, resulting in 5.73 mg proteins/g broken rice in supernatants. The optimum conditions for extraction of soluble proteins from rice bran and defatted rice bran were obtained by digesting each raw material with mixed enzymes (0.10% v/w), pH 3.8, incubating at 50 degree celcius for 120 minutes for rice bran and for 60 minutes for defatted rice bran.The extracted soluble proteins obtained from rice bran and defatted rice bran was 60.90 and 31.70 mg proteins/g sample, respectively. The soluble proteins from broken rice, rice bran, and defatted rice bran were investigated for allergenic related protein, nutritional properties, and functional properties.The major allergenic protein reported by many researchs was the 16 kDa protein. The extract soluble proteins were analyzed by SDS-PAGE and gel filtration chromatography. There was no 16 kDa protein found. The nutritional quality of three extract proteins were compared with that of egg and casein. It was found that lysine, methionine, and phenylalanine were the limiting amino acids for protein from broken rice, rice bran and defatted rice bran, respectively. The extract protein from bran showed highest Protein Efficiency Ratio (PER) at 2.14 (C-PER) and 2.07 (DC-PER). The best foaming ability of protein solution among three extrated protein was found to be protein from rice bran. The rice bran soluble protein produced 18.00 ml. of foam from 50 ml. of (0.20% w/v) protein solution. The emulsion ability of soluble protein from rice bran and defatted rice bran were found to be the same, 0.55 and 0.58, respectively while that of the protein from broken rice was 0.36.

Depatment…Food Technology… Student's signature…….

Field of Study…Food Technology… Advisor's signature…….

Academic year…2002… Co-advisor's signature……...

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ ดร. เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ และให้ความช่วยเหลือทางด้านวิชาการตลอดระยะเวลาของการปฏิบัติงานวิจัยเป็นอย่างดี รวมทั้งการตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยา เลาหสงคราม ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุลที่ได้กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และได้เสนอแนวทางแก้ไขปรับปรุงให้วิทยานิพนธ์สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ประไพศรี ศิริจักรวาล สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้คำแนะนำด้านการวิเคราะห์คุณภาพของโปรตีน

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบพระคุณบริษัท ปทุมไรซมิลล์ แอนด์ แกรนารี จำกัดที่ให้ความอนุเคราะห์รำสกัดไขมัน ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานีที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่องโม่ ขอขอบพระคุณ บริษัท อีสต์ เอเซียติ๊ก จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์เอนไซม์ตลอดงานวิจัยรวมทั้งเอกสารบางส่วนสำหรับงานวิจัย และขอขอบพระคุณ บริษัท อายิโนะโมโต๊ะ จำกัด (ประเทศไทย) ที่ให้ความอนุเคราะห์วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนให้ และบริษัท สตรองแพ็ค จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ถุง PET/Al/linear/LDPE

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในด้านสารเคมี อุปกรณ์และครุภัณฑ์ต่าง ๆ ตลอดงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ และเพื่อน ๆ ทุกคนในภาคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ท้ายที่สุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาผู้เป็นที่รักและเคารพยิ่ง และญาติทุกท่านซึ่งให้การสนับสนุนในด้านทุนทรัพย์ ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจตลอดมาจนวิทยานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ฏ
สารบัญรูป ..... ด

บทที่

1 บทนำ 1
2 วารสารปริทัศน์ 3
2.1 ข้าว 3
2.2 เมล็ดข้าว 3
2.3 โปรตีนข้าว 5
2.4 คุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนข้าว 8
2.5 การสกัดโปรตีนจากข้าวเจ้า 8
2.5.1 การสกัดโปรตีนจากข้าวสาร 8
2.5.2 การสกัดโปรตีนจากปลายข้าวหรือข้าวหัก 11
2.5.3 การสกัดโปรตีนจากรำข้าว 12
2.5.4 การสกัดโปรตีนจากข้าวกล้อง 14
2.6 การศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ 15
2.7 การศึกษาคุณภาพของโปรตีน 16
2.7.1 วิธีประเมินทางเคมี 16
2.7.2 วิธีประเมินทางชีววิทยา 17
2.7.3 การประเมินโดยใช้เอนไซม์และการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 19
2.8 การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ 20
2.8.1 สมบัติการเกิดโฟม 20
2.8.2 สมบัติการเกิดอิมัลชัน 21
3 วิธีการทดลอง 23

หน้า

3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและปริทาณ albuminของปลายข้าว รำข้าว และรำสกัดไขมัน 27
3.2 ศึกษาผลของการให้ความร้อนของผลพลอยได้จากการสีข้าวต่อการสกัดโปรตีน 28
3.2.1 การเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลพลอยได้จากการสีข้าวก่อนย่อย ด้วยเอนไซม์ 28
3.2.2 การย่อยผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลพลอยได้จากการสีข้าวด้วยเอนไซม์ 28
3.2.2.1 การย่อยด้วย α-ฟmylase 28
3.2.2.2 การย่อยด้วย protease 28
3.2.2.3 การย่อยด้วย cellulase 28
3.2.2.4 การย่อยด้วย mixed enzymes (arabanase cellulose hemicellulase β- glucanase และ xylanase) 29
3.2.3 การแยกโปรตีนส่วนน้ำใส 29
3.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากปลายข้าวโดยใช้ α-mylase 29
3.3.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากปลายข้าวโดยใช้ α-amylase 29
3.3.2 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากปลายข้าวโดยใช้ α-mylase. 30
3.4 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมันโดยใช้
3.4.1 ศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่ใช้สกัดโปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมัน โดยใช้ mixed enzymes 30
3.4.2 ศึกษาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวและ รำสกัดไขมัน โดยใช้ mixed enzymes 30
3.4.3 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมัน โดยใช้ mixed enzymes 31
3.5 เลือกภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลายข้าวที่ใช้ α-amylase รำข้าวและรำสกัดไขมันที่ใช้ mixed enzymes โดยคำนวณค่าต่าง ๆ ..31
3.6 การศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้ 31
3.7 การศึกษาคุณค่าทางโภชนาการ 31
3.8 การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ 32

หน้า

4. ผลและวิจารณ์การทดลอง....33
4.1 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ....33
4.2 ศึกษาผลของการให้ความร้อนปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันต่อ ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้....34
4.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากปลายข้าวโดยใช้ α-amylase....40
4.3.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากปลายข้าวโดยใช้ α-amylase ความเข้มข้น 0.15 %v/w ย่อยปลายข้าวที่อุณหภูมิต่าง ๆ....40
4.3.2 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากปลายข้าวโดยใช้ α-amylase ย่อยปลายข้าว ที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส....42
4.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมัน....42
4.4.1 ศึกษาปริมาณเอนไซม์ mixed enzymes ที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมัน....42
4.4.2 ศึกษาอุณหภูมิและ pHที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมันโดยใช้ mixed enzymes ความเข้มข้น 0.10 %v/w ที่ภาวะการสกัดต่าง ๆ....43
4.4.3 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมันโดยใช้ mixed enzymes ความเข้มข้น 0.10 %v/w ที่ pH 3.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส....47
4.5 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลายข้าวที่ใช้ α-amylase รำข้าวและรำสกัดไขมันที่ใช้ mixed enzymes โดยพิจารณาปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส %albumin extracted %albumin recovery และต้นทุนในการผลิต....49
4.6 การศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้....52
4.6.1 ศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้ โดย SDS-PAGE....53
4.6.2 การวิเคราะห์หาขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วย gel filtration chromatography....53
4.7 การศึกษาคุณค่าทางโภชนาการ....55
4.7.1 องค์ประกอบของกรดอะมิโนและค่าคะแนนกรดอะมิโน....55
4.7.2 ค่า protein digestibility ค่า Protein Efficiency Ratio (PER) และค่า Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score (PDCAAS)....59

หน้า

4.8 การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่.....61
4.8.1 การศึกษาสมบัติการเกิดโฟม.....61
4.8.2 การศึกษาสมบัติการเกิดอิมัลชัน.....63
5 สรุปผลการทดลอง.....66
รายการอ้างอิง.....68
ภาคผนวก.....76
ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์ทางเคมี.....77
ภาคผนวก ข การหาขนาดโมเลกุลของโปรตีน.....85
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ.....95
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่.....105
ภาคผนวก จ การวิเคราะห์สมบัติด้านความหนืดของแป้ง.....106
ภาคผนวก ฉ การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....108
ภาคผนวก ช การทำงานของเอนไซม์ α-amylase ที่อุณหภูมิต่าง ๆ.....113
ภาคผนวก ซ ภาพอุปกรณ์ วัตถุดิบและโปรตีนที่สกัดได้.....114
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....115

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

2.1 ผลผลิตและมูลค่าของผลผลิตของข้าวรวม (นาปี/นาปรัง) ในประเทศไทย ตั้งแต่ปีเพาะปลูก 2530/2531-2541/42…… 4

2.2 ปริมาณและมูลค่าสินค้าขาออกของข้าว ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536-2542……..... 4

2.3 องค์ประกอบของส่วนต่างๆของข้าว……..... ……..6

2.4 ปริมาณกรดอะมิโนในเมล็ดธัญชาติ…… 9

4.1 องค์ประกอบทางเคมีของปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน……..... 33

4.2 ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส เมื่อใช้เอนไซม์ต่าง ๆ ย่อยปลายข้าวที่ทำให้สุก และไม่ได้ทำให้สุก…… 37

4.3 ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส เมื่อใช้เอนไซม์ต่าง ๆ ย่อยรำข้าวที่ทำให้สุก และไม่ได้ทำให้สุก…… 38

4.4 ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส เมื่อใช้เอนไซม์ต่าง ๆ ย่อยรำสกัดไขมันที่ทำให้สุก และไม่ได้ทำให้สุก…….. 39

4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อย่อยปลายข้าว ที่ผ่านการทำให้สุกแล้วด้วย α-amylase ที่อุณหภูมิต่าง ๆ…… ……40

4.6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อย่อยปลายข้าว ที่ผ่านการทำให้สุกแล้ว บ่มด้วย α-amylase 0.15 %v/w ที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่าง ๆ ……..... 42

4.7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อใช้ mixed enzymes ปริมาณเอนไซม์ต่าง ๆ ย่อยรำข้าวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 3.8 เป็นเวลา 60 นาที……..... 43

4.8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อใช้ mixed enzymes ปริมาณเอนไซม์ต่าง ๆ ย่อยรำสกัดไขมัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 3.8 เป็นเวลา 60 นาที……..... 44

4.9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อย่อย รำข้าวด้วย mixed enzymes ปริมาณ 0.10 %v/w ที่ภาวะการสกัดต่าง ๆ เป็นเวลา 60 นาที……..... 45

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง หน้า

4.10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อใช้ mixed enzymes ปริมาณ 0.10 %v/w ย่อยรำสกัดไขมันที่ภาวะการสกัดต่าง ๆ..... 46

4.11 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อใช้ mixed enzymes ปริมาณ 0.10 %v/w ย่อยรำข้าว ที่ pH 3.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่าง ๆ..... 47

4.12 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อใช้ mixed enzymes ปริมาณ 0.10 %v/w ย่อยรำสกัดไขมัน ที่ pH 3.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่าง ๆ..... 48

4.13 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส % protein recovery %albumin extracted และต้นทุนในการผลิตโปรตีนที่ละลายน้ำได้ 1 kg จากปลายข้าว รำข้าว และรำสกัดไขมันจากภาวะที่เหมาะสมที่สุด 51

4.14 องค์ประกอบของกรดอะมิโนของโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลายข้าว รำข้าว และรำสกัดไขมันที่ภาวะที่เหมาะสมที่สุด เคซีนและไข่ ..... .56

4.14 ค่าคะแนนกรดอะมิโนของโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันเมื่อเปรียบเทียบกับเคซีนและไข่..... 58

4.15 ค่า protein digestibility ค่า protein efficiency Ratio (PER) และค่า PDCAAS ของแสดงโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน 61

4.17 สมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนไข่ขาวและเคซีน..... 62

4.18 สมบัติการเกิดอิมัลชันของโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันเมื่อเปรียบเทียบกับ bovine serum albumin และเคซีน..... 64

สารบัญตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

ก. 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรของสารละลาย D-glucose ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....82

ก. 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรของสารละลาย bovine serum albumin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 84

ข 1 การเตรียมสารเคมีสำหรับทำ SDS-PAGE..... ...85

ข. 2 การเตรียม resolving gel solution เมื่อต้องการแผ่นเจลหนา 1 มิลลิเมตร จำนวน 2 แผ่น..... 87

ข. 3 การเตรียม stacking gel solution สำหรับเจลหนา 1 มิลลิเมตร จำนวน 2 แผ่น..... 88

ข. 4 การเตรียม fixing solution ปริมาณ 1 ลิตร.....88

ข. 5 การเตรียม staining solution ปริมาณ 1 ลิตร..... 88

ข. 6 การเตรียม destain solution ปริมาณ 1 ลิตร.....89

ค. 1 ค่า%FAO ของโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าว รำสกัดไขมันและเคซีน... 98

ค. 2 ค่า wt เมื่อปัดค่า %FAO/WHO ให้เป็นจำนวนเต็ม..... 99

ค. 3 ค่า X ของโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าว รำสกัดไขมันและเคซีน..... 100

ค. 4 ค่า discriminant ของโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน..... 101

ค. 5 ค่า discriminant ของโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน 101

ค. 6 ค่า discriminant ของโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน 103

ค. 7 ค่า PDCAAS ของแสดงโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน 104

ฉ.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีนในส่วนน้ำใส เมื่อให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส ก่อนการบ่มด้วย α-amylase และ protease 95 องศาเซลเซียส pH 6 เป็นเวลา 60 นาที..... 108

ฉ. 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสเมื่อให้และไม่ได้ให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส กับรำข้าวก่อนการบ่มด้วย α-amylase cellulase mixed enzymes และ protease ที่ภาวะการสกัดต่าง ๆ.....108

สารบัญตารางภาคผนวก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

ฉ. 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสเมื่อให้
และไม่ได้ให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส กับรำสกัดไขมันก่อนการบ่มด้วย
α-amylase cellulase mixed enzymes และ protease ที่ภาวะการสกัดต่าง ๆ 109

ฉ. 4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อย่อย
ปลายข้าวที่ผ่านการทำให้สุกแล้ว บ่มด้วย α-amylase 0.15 %v/w ที่ pH 6.5
อุณหภูมิ 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที.....109

ฉ.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อย่อย
ปลายข้าวที่ผ่านการทำให้สุกแล้ว บ่มด้วย α-amylase 0.15 %v/w ที่ pH 6.5
อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่าง ๆ.....109

ฉ. 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใส
และโปรตีนในตะกอนเมื่อใช้ mixed enzymes ปริมาณเอนไซม์
ต่าง ๆ ย่อยรำข้าวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 3.8 เป็นเวลา 60 นาที..... 110

ฉ. 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใส
และโปรตีนในตะกอนเมื่อใช้ mixed enzymes ปริมาณเอนไซม์
ต่าง ๆ ย่อยรำข้าวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 3.8 เป็นเวลา 60 นาที..... 110

ฉ.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใส
และโปรตีนในตะกอนเมื่อย่อยรำข้าวด้วย mixed enzymes ปริมาณ 0.10
%v/w ที่ภาวะการสกัดต่าง ๆ เป็นเวลา 60 นาที.....110

ฉ.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใส
และโปรตีนในตะกอนเมื่อย่อยรำสกัดไขมันด้วย mixed enzymes ปริมาณ 0.10
%v/w ที่ภาวะการสกัดต่าง ๆ เป็นเวลา 60 นาที.....111

สารบัญตารางภาคผนวก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

ฉ.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใส และโปรตีนในตะกอนเมื่อใช้ mixed enzymes ปริมาณ 0.10 %v/w ย่อยรำข้าว ที่ pH 3.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่าง ๆ…….. 111

ฉ.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใส และโปรตีนในตะกอนเมื่อใช้ mixed enzymes ปริมาณ 0.10 %v/w ย่อยรำสกัดไขมัน ที่ pH 3.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่าง ๆ…….. 111

ฉ. 12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ foaming capacity และ foaming stability ของโปรตีนที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันที่ภาวะที่เหมาะสม เปรียบเทียบกับโปรตีนไข่ขาวและเคซีน 112

ฉ. 13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ emulsifying capacity และ emulsion stability ของโปรตีนที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันที่ภาวะที่เหมาะสม เปรียบเทียบกับโปรตีนไข่ขาวและเคซีน 112

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

4.1 โครงสร้างของข้าว……..8
4.2 % albumin recovery และ % albumin extracted ของโปรตีนที่สกัดได้จาก .....
ปลายข้าว รำข้าว และรำสกัดไขมัน…….....48
4.3 SDS-PAGE pattern ของโปรตีนที่ละลายน้ำที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าวและ
รำสกัดไขมัน……51
4.4 ขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าวที่ใช้ mixed enzymes .....
ย่อย โดยใช้ gel filtration chromatography ด้วยคอลัมน์ sephacryl S-200 HR……..53
4.5 ขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้จากรำสกัดไขมันที่ใช้ mixed enzymes ย่อย
โดยใช้ gel filtration chromatography ด้วยคอลัมน์ sephacryl S-200 HR……...53

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาคผนวก

รูปภาคผนวกที่หน้า

1 ก กราฟมาตรฐานของสารละลาย D-glucose ความเข้มข้นต่าง ๆ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร..... 83

2 ก กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin ความเข้มข้นต่าง ๆ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร.....85

1 ข กราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน (low molecular weight calibration kit) ในการศึกษา SDS-PAGE 93

2 ข กราฟมาตรฐานของ protein marker (albumin ovalbumin alpha-chymotrypsinogen A และ ribonuclease A) โดยใช้ gel filtration chromatography.....95

1 จ Brabender viscoamylograph ของแป้งจากปลายข้าว.....106

1 ช อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ α-amylase ที่อุณหภูมิต่าง ๆ.....112

1 ซ เครื่อง electrophoresis รุ่น Hoefer mini VE.....113

2 ซ ปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน และโปรตีนที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน.....113

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 โครงสร้างของข้าว……..... ……..8

4.1 % albumin recovery และ % albumin extracted ของโปรตีนที่สกัดได้จาก ปลายข้าว รำข้าว และรำสกัดไขมัน 49

4.2 SDS-PAGE pattern ของโปรตีนที่ละลายน้ำที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าวและ รำสกัดไขมัน…… 52

4.3 ขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าวที่ใช้ mixed enzymes ย่อย โดยใช้ gel filtration chromatography ด้วยคอลัมน์ Sephacryl S-200 HR… ….54

4.4 ขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้จากรำสกัดไขมันที่ใช้ mixed enzymes ย่อย โดยใช้ gel filtration chromatography ด้วยคอลัมน์ Sephacryl S-200 HR…… 54

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาคผนวก

รูปภาคผนวกที่ หน้า

1 ก กราฟมาตรฐานของสารละลาย D-glucose ความเข้มข้นต่าง ๆ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร……...83

2 ก กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin ความเข้มข้นต่าง ๆ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร……84

1 ข กราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน (low molecular weight calibration kit) ในการศึกษา SDS-PAGE ……92

2 ข กราฟมาตรฐานของ protein marker (albumin ovalbumin alpha-chymotrypsinogen A และ ribonuclease A) โดยใช้ gel filtration chromatography…….....94

1 จ Brabender viscoamylograph ของแป้งจากปลายข้าว..... 107

1 ช อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ α-amylase ที่อุณหภูมิต่าง ๆ..... ... 113

1 ซ เครื่อง electrophoresis รุ่น Hoefer mini VE…….....114

2 ซ ปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน และโปรตีนที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน 114

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ข้าวเป็นอาหารหลักของประชากรเกือบทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยด้วย ในปี พ.ศ. 2540 ประเทศไทยผลิตข้าวได้ประมาณ 23,580,000 ตัน คิดเป็นมูลค่า 123,317 ล้านบาท (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, 2541) ส่วนใหญ่เป็นการผลิตเพื่อบริโภคภายในประเทศ ส่วนที่เหลือเป็นการส่งออกไปต่างประเทศ ในระหว่างการเก็บเกี่ยว การกะเทาะเปลือก และในแต่ละขั้นตอนของการขัดสีข้าวด้วยเครื่องจักรจะได้ข้าวสารที่ประกอบด้วย ข้าวเต็มเมล็ด ข้าวหักใหญ่ ส่วนผลพลอยได้จะเป็นแกลบ และรำข้าว เมล็ดข้าวหักหรือปลายข้าว รำข้าว ข้าวหักหรือปลายข้าวส่วนใหญ่มักจะนำไปใช้เป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมของอาหารสัตว์ ดังนั้น รำข้าว ปลายข้าว และผลพลอยได้อื่น ๆ จึงมีราคาถูก นอกจากข้าวจะเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตแล้วยังมีโปรตีนที่มีคุณค่าทางอาหารด้วย ปลายข้าวมีปริมาณโปรตีน 5.6-13.3 เปอร์เซ็นต์ และรำข้าวซึ่งมีปริมาณโปรตีน 12.1-17.2 เปอร์เซ็นต์ (Juliano, 1972) นอกจากนี้ผลพลอยได้จากกระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าว ได้แก่ รำสกัดไขมันมีปริมาณโปรตีน 15-20 เปอร์เซ็นต์ (Barber และ Barber, 1980) แม้ว่าปริมาณโปรตีนในข้าวจะต่ำ แต่โปรตีนในข้าวเป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ต่ำ (hypoallergenic proteins) ปริมาณ allergenic proteins ในเนื้อข้าว (endosperm) มีปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ทั้งหมด ในขณะที่รำข้าว (bran) มี allergenic proteins 0.2 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ทั้งหมด เนื่องจากรำข้าวมีสมบัติเป็น hypoallergen จึงเป็นแหล่งโปรตีนที่มีศักยภาพในการใช้เป็นองค์ประกอบในการผลิตสูตรอาหารสำหรับทารก (Landers และ Hamaker, 1994) นอกจากนี้ในการศึกษา hypocholesterolemic effect พบว่า โปรตีนข้าวมีผลในการลดคอเลสเตอรอลได้ (Morita และคณะ, 1996) โดยปกติแล้วโปรตีนในข้าวจะมีปริมาณ lysine ประมาณ 3-4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับธัญชาติชนิดอื่นและโปรตีน albumin เป็นส่วนที่พบ lysine มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนชนิดอื่นที่พบในข้าว (glutelin globulin และ prolamin) (Palmiano และคณะ, 1968) จึงทำให้โปรตีน albumin มีคุณค่าที่มีต่อร่างกาย (biological value) สูง (Lozsa และ Koller, 1954) โดยเฉพาะโปรตีนที่ละลายน้ำได้เป็นส่วนที่มี albumin มากกว่าโปรตีนส่วนที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้โปรตีนส่วนนี้เป็นส่วนที่น่าสนใจศึกษาการสกัดเนื่องจากในประเทศไทยยังไม่มีการคัดเลือกวัตถุดิบ การสกัดและใช้ประโยชน์จากโปรตีนของข้าว เช่น ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารสำหรับทารก ดังนั้น การศึกษาวัตถุดิบและการสกัดโปรตีนจากข้าวจึงเป็นข้อมูลที่สำคัญต่อระดับอุตสาหกรรมของประเทศและสามารถผลิตส่งออกไปยังต่างประเทศเป็นการเพิ่มมูลค่าแก่ข้าวอีกด้วย

การสกัดโปรตีนจากข้าวเจ้าสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การสกัดโปรตีนด้วยการใช้ด่าง การใช้ดีเทอร์เจ้นต์ และการใช้เอนไซม์ เป็นต้น แต่เนื่องจากการสกัดโปรตีนด้วยการใช้สารละลายด่างเข้มข้นในการสกัดโปรตีนทำให้เกิดสารพิษ (toxin) โดยการเกิด lysinoalanine ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการใช้ด่างในการสกัดโปรตีน กระเพาะอาหารไม่สามารถย่อยสลาย lysinoalanine ได้และลำไส้เล็กไม่สามารถดูดซึมกรดอะมิโนไปใช้ จนเป็นสารตกค้างก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้ (DeGroot และ Slump, 1969) นอกจากนี้ยังทำให้โปรตีนแปลงสภาพ (denature) ทำให้โปรตีนที่ได้มีสีน้ำตาลเข้มเนื่องจากเกิด Maillard reaction และทำให้โปรตีนที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ลดลงเนื่องจากสารละลายด่างเข้มข้นเพิ่มการสกัด nonprotein components ออกมาด้วย (Wang และคณะ, 1999) ส่วนการใช้ดีเทอร์เจ้นต์ในการสกัดก็เป็นอันตรายเนื่องจากมีสารตกค้างในโปรตีนที่สกัดได้ และยังสิ้นเปลืองเพราะต้องกำจัดดีเทอร์เจ้นต์ที่ตกค้างจึงไม่นิยมใช้โปรตีนที่สกัดด้วยดีเทอร์เจ้นต์ในผลิตภัณฑ์อาหาร

ในงานวิจัยนี้ต้องการเลือกวัตถุดิบและการใช้เอนไซม์สกัดโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากข้าวเจ้า โดยวัตถุดิบที่ใช้ศึกษา ได้แก่ ปลายข้าว รำข้าว และรำสกัดไขมัน และแปรชนิดเอนไซม์ที่ใช้สกัดโปรตีนที่ละลายน้ำได้ และแปรภาวะต่าง ๆ ที่ใช้สกัด ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง และเวลาในการสกัด ในการวิเคราะห์ผลจะคำนึงถึงประสิทธิภาพในการสกัดของโปรตีนที่ละลายน้ำที่สกัดได้ ตลอดจนศึกษาคุณค่าทางโภชนาการ รวมถึงขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ โดยเลือกวิธีที่ให้ albumin ในส่วนน้ำใสมากที่สุด มีค่า Protein Efficiency Ratio (PER) สูงและไม่มีโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 ข้าว (*Oryza sativa)* (จำรัส โปร่งศิริวัฒนา, 2534)

ข้าวใน genus *Oryza* มีหลาย species โดยแบ่งเป็นข้าวป่า (wild rice) 22 species และเป็นข้าวที่ปลูกทั่วไป (cultivated rice) 2 species คือ *Oryza glaberrima* ปลูกแถบแอฟริกาตะวันตกเป็นส่วนใหญ่ และ *Oryza sativa* ซึ่งมี 3 subspecies คือ subspecies *indica* ปลูกในแถบเอเชียเขตร้อน ปลูกมากในอินเดีย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ เวียดนาม อินโดนิเซียและไทย อายุการเก็บประมาณ 80-120 วัน เมล็ดมีลักษณะเรียวยาว subspecies *japonica* ขึ้นได้ดีในเขตอบอุ่น ปลูกจีน ญี่ปุ่นและเกาหลี เมล็ดมีลักษณะอ้วน ป้อม รวงแน่น และ subspecies *javanica* ปลูกมากในหมู่เกาะชวา มีปลูกบ้างเล็กน้อยในฟิลิปปินส์ อินเดียและศรีลังกา รวงยาว

ข้าวเป็นอาหารหลักของประชากรเกือบทั่วโลก ประเทศไทยผลิตข้าวได้เป็นอันดับต้นของโลก ในปี พ.ศ. 2540 ประเทศไทยผลิตข้าวได้ประมาณ 23,580,000 ตัน คิดเป็นมูลค่า 123,317 ล้านบาท (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, 2541) ส่วนใหญ่เป็นการผลิตเพื่อบริโภคภายในประเทศ ใช้เลี้ยงสัตว์ และเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น อุตสาหกรรมผลิตเส้นก๋วยเตี๋ยว บะหมี่ และแป้งข้าวเจ้า เป็นต้น ผลผลิตและมูลค่าของผลผลิตข้าวรวม (นาปี/นาปรัง) ในประเทศไทยตั้งแต่ปีเพาะปลูก 2530/2531 – 2539/2540 แสดงดังตารางที่ 2.1 ปริมาณและมูลค่าสินค้าขาออกของข้าว ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536 – 2540 แสดงดังตารางที่ 2.2

2.2 เมล็ดข้าว (rice grain) ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนหุ้มเมล็ดและเนื้อผล (จำรัส โปร่งศิริวัฒนา, 2534)

2.2.1 ส่วนหุ้มเมล็ดหรือส่วนหุ้มผล คือ แกลบ (hull หรือ husk) 18-28 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าวเปลือก hull ในข้าว *indica* หมายถึง lemma palea sterile lemma และ rachilla ส่วนหุ้มเมล็ดประกอบด้วยเปลือกใหญ่ (lemma) และเปลือกเล็ก (palea)

2.2.1.1 เปลือกใหญ่ (lemma) เปลือกใหญ่เป็นเปลือกหุ้มเนื้อผลที่มีขนาดใหญ่กว่าเปลือกเล็ก

2.2.1.2 เปลือกเล็ก (palea) เปลือกเล็กจะอยู่ใต้เปลือกใหญ่

2.2.2 เนื้อผล (caryopsis) คือ ข้าวกล้องซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ภายในของส่วนหุ้มเมล็ด ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน คือ เอ็มบริโอหรือเจิร์ม (embryo หรือ germ) หรือจมูกข้าวและ

ตารางที่ 2.1 ผลผลิตและมูลค่าของผลผลิตของข้าวรวม (นาปี/นาปรัง) ในประเทศไทย ตั้งแต่ปีเพาะปลูก 2530/2531-2541/42

ปีเพาะปลูก	ผลผลิต	มูลค่าของผลผลิต ตามราคาที่เกษตรกรขายได้ (ล้านบาท)
2530/31	18,428.0	70,874.1
2531/32	21,263.0	84,626.7
2532/33	20,601.0	74,761.0
2533/34	17,193.0	62,032.3
2534/35	20,400.0	77,683.2
2535/36	19,917.0	65,447.3
2536/37	18,447.0	68,752.0
2537/38	21,111.0	81,425.1
2538/39	22,016.0	104,884.2
2539/40	22,332.0	123,317.3
2540/41	23,580.0	164,164.0
2541/42	23,608.0	132,382.2

ที่มา: ศูนย์สารสนเทศการเกษตร (2541)

ตารางที่ 2.2 ปริมาณและมูลค่าสินค้าขาออกของข้าว ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2536-2542

ปี พ.ศ.	ปริมาณ (เมตริกตัน)	มูลค่า (1,000 บาท)
2536	4,987,464	32,946,591
2537	4,858,638	39,187,305
2538	6,197,988	48,626,763
2539	5,460,219	50,734,761
2540	5,567,360	65,088,050
2541	6,540,235	86,805,347
2542	6,838,793	73,810,416

ที่มา: ศูนย์สารสนเทศการเกษตร (2541)

เอนโดสเปิร์ม (endosperm) หรือเนื้อข้าวในแต่ละส่วนของข้าวกล้องมีสารอาหารเป็นองค์ประกอบแตกต่างกัน โดยโปรตีนมีปริมาณสูงบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดและจมูกข้าว ในการสีข้าวเปลือกให้เป็นข้าวสารนั้นส่วนของเนื้อเยื่อที่ห่อหุ้มเนื้อผลและจมูกข้าวจะถูกขัดออกมาเป็นผงละเอียด คือ รำข้าว (bran) ส่วนประกอบที่สำคัญของเนื้อผลหรือข้าวกล้อง มีดังนี้

2.2.2.1 **เยื่อชั้นนอกหรือเยื่อหุ้มผล (pericarp)** มี 1-2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าวกล้อง เยื่อชั้นนอกประกอบด้วย protein hemicellulose และ cellulose เป็นส่วนสำคัญ มี 3 ชั้นย่อย คือ epicarp เป็นเยื่อชั้นนอกสุดของ pericarp ที่อยู่ติดกับเปลือกหรือแกลบ mesocarp เป็นเยื่อชั้นกลางอยู่ถัดจาก epicarp เข้ามา และ endocarp เป็นเยื่อชั้นในของ pericarp อยู่ถัดจาก mesocarp เข้ามา

2.2.2.2 **เยื่อชั้นกลาง (testa, tegmen, seed coat)** เป็นเยื่อชั้นที่อยู่ถัดจากเยื่อชั้นนอกเข้ามา ภายในเซลล์ของเยื่อชั้นกลางนี้ จะมีไขมันอยู่เป็นส่วนใหญ่

2.2.2.3 **เยื่อชั้นใน (aleurone layer)** มี 4-6 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าวกล้อง เยื่อชั้นในเป็นเยื่อชั้นในสุดอยู่ถัดจากเยื่อชั้นกลางเข้ามา ภายในเซลล์ของชั้นนี้จะมีเม็ดโปรตีนอยู่มาก (protein rich aleurone grain) โดยมีชั้นไขมันบาง ๆ ห่อหุ้มอยู่ เยื่อชั้นในทำหน้าที่ห่อหุ้มเนื้อเยื่อ 2 ชนิด คือ

2.2.2.3.1 **เอ็มบริโอหรือเจิร์ม (embryo หรือ germ)** คือ จมูกข้าว มี 2-3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเนื้อผล มีปริมาณค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับธัญชาติอื่นจมูกข้าวจะอยู่ที่โคนเมล็ดด้านเปลือกใหญ่

2.2.2.3.2 **เอนโดสเปิร์ม (endosperm)** คือ เนื้อข้าวมีแป้งประมาณ 83 เปอร์เซ็นต์ของเนื้อผล ภายในเนื้อข้าวนี้จะมีเม็ดแป้งอัดแน่นโดยมี protein body แทรกอยู่ระหว่าง starch compound protein body จะอยู่หนาแน่นบริเวณรอบนอกของเนื้อข้าวมากกว่าบริเวณภายในของเนื้อข้าว องค์ประกอบของส่วนต่าง ๆ ของข้าว แสดงตารางที่ 2.3

2.3 โปรตีนข้าว (rice proteins)

กระบวนการสีข้าวทำให้ได้ข้าวสาร 40-55 เปอร์เซ็นต์ และผลพลอยได้ (by-product) อีก 3 ส่วนหลัก คือ แกลบ 20 เปอร์เซ็นต์ รำข้าว 10 เปอร์เซ็นต์ และข้าวหัก 10-22 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณโปรตีนในส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากการสีข้าวมีค่าดังนี้ ปริมาณโปรตีนในข้าวสารเท่ากับ 8 เปอร์เซ็นต์ ในแกลบเท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์ ในรำข้าวเท่ากับ 17 เปอร์เซ็นต์ และในข้าวหักเท่ากับ 8.5 เปอร์เซ็นต์ (Barber และ Barber,1980) โปรตีนในปลายข้าวอยู่ในรูป protein body (p.b.) จับกับ hemicellulose และ cellulose (c.w.) และอยู่บริเวณรอบเม็ดแป้ง (s.g.) (รูปที่ 4.1) โปรตีนจาก

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของส่วนต่าง ๆ ของข้าว

องค์ประกอบ (%)	ข้าวกล้อง	ข้าวสาร	รำข้าว	คัพภะ	รำละเอียด
โปรตีน	7.1-15.4	5.6-13.3	12.1-17.2	17.7-26.4	12.8-15.8
ไขมัน	0.6-4.0	0.2-2.7	14.6-21.7	15.2-24.7	8.8-15.3
เส้นใย	0.2-2.6	0.1-1.3	8.7-15.6	2.0-4.8	2.1-5.3
เถ้า	0.5-2.1	0.3-1.9	9.0-15.7	6.1-10.1	5.0-9.3
สตาร์ช	74.5-90.2	84.0-93.5	39.8-49.1	36.2-55.5	53.7-71.3

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Juliano (1972)

ข้าวชนิดต่าง ๆ มีความแตกต่างกันโดย Houston และคณะ (1968) พบว่าข้าวชนิด medium grain มี albumin สูงที่สุด รองลงมาคือ ข้าวชนิด long grain และข้าวชนิด short grain ตามลำดับ Padhye และ Salunkhe (1979) ศึกษาการสกัดโปรตีนข้าวเมล็ดยาวพันธุ์เทกซัสที่ขัดสีแล้ว (Texas long grain) พบว่าข้าวมีปริมาณโปรตีน 10.6 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง มีอัตราส่วนของ albumin : globulin : prolamin : glutelin เท่ากับ 8 : 9.5 : 12.5 : 70 นอกจากนี้ Cagampang และคณะ (1966) ศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนในข้าวพันธุ์ Chia-nan 8 Taichung (Native 1) และ BPI 76 โดยแยกส่วนโปรตีนของข้าวกล้อง ข้าวสาร รำข้าวและรำละเอียดของตัวอย่างข้าวทั้ง 3 พันธุ์ พบว่าโปรตีนในข้าวกล้องและข้าวสารเป็น glutelin แสดงว่า glutelin มีมากใน endosperm ส่วน albumin และ globulin พบมากในรำข้าวและรำละเอียด นอกจากนี้ albumin และ globulin ยังมีใน embryo และ aleurone layer (Juliano, 1972) จาก Osborne's classification (Osborne และ Mendel, 1914) สามารถแบ่งโปรตีนตามการละลายในตัวทำละลายได้เป็น 4 ส่วน ดังนี้

2.3.1 Glutelin

Glutelin เป็นโปรตีนที่ละลายได้ในสารละลายด่างอ่อน (NaOH 0.05 N) มีปริมาณประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนข้าวทั้งหมด (Osborne, 1924) glutelin ในเนื้อข้าวเป็น protein body ที่มีลักษณะเป็น crystalline (PB type II) มีปริมาณประมาณ 60-65 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมดที่พบในเนื้อข้าว (Juliano, 1992) ในเมล็ดข้าวแก่มี glutelin ที่มีขนาดโมเลกุล 38,000 25,000 16,000 Da ในอัตราส่วน 1:1:1 (Villareal และ Juliano, 1978) โดยโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 16,000 Da เป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้มากที่สุด (Matsuda และคณะ, 1988)

2.3.2 Prolamin

Prolamin ละลายได้ในสารละลายแอลกอฮอล์ (ethanol ความเข้มข้น 60 %v/v) มีประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปตีนข้าวทั้งหมด (Osborne, 1924) prolamin กระจายอยู่ทั่วทุกส่วนของข้าวกล้อง (Juliano,1972) prolamin ในเนื้อข้าวเป็น protein body มีลักษณะเป็น spherical (PB I) มีปริมาณประมาณ 20-25 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมดที่พบในเนื้อข้าว (Juliano,1992) prolamin มี 1 subunit ที่มีขนาดโมเลกุล 23,000 Da (Juliano และ Boulter, 1976)

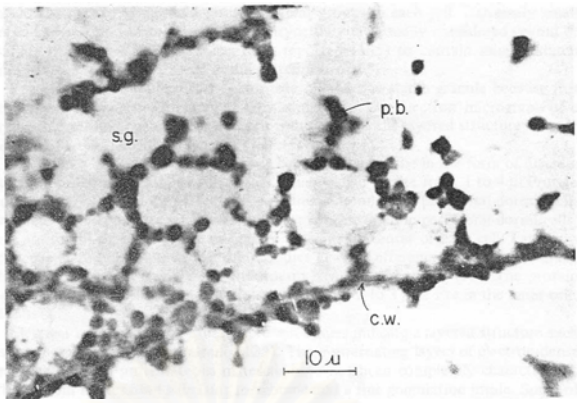
2.3.3 Albumin

Albumin ละลายได้ในน้ำเป็นโปรตีนที่มี biological value สูงที่สุด (Lozsa และ Koller, 1954) และเป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ต่ำ (Matsuda และคณะ, 1988) นอกจากนี้จากการศึกษาโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ด้วยวิธี western blot analysis ไม่พบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 16,000 Da ใน albumin ที่สกัดจากรำข้าว long grain (Landers และ Hamaker, 1994) albumin มีกรดอะมิโน lysine สูงแต่มี glutamic acid ต่ำ นอกจากนี้ albumin ยังมี uncharged polar amino acid ในปริมาณสูงแต่มีปริมาณ acidic amino acid ต่ำ (Padhye และ Salunkhe, 1979) ซึ่งมีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโดยถ้ามีสมดุลของ uncharged polar amino acid และ hydrophobic amino acid ในปริมาณเท่ากันทำให้สมบัติเชิงหน้าที่ ได้แก่ การเกิดโฟมและการเกิดอิมัลชันสูง ข้าวเมล็ดยาวพันธุ์เทกซัส (Texas long grain) ที่ผ่านการขัดสีแล้วมี albumin ที่มีขนาดโมเลกุล 135,000 43,700 31,600 20,300 15,300 และ 7,400 Da มี isoelectric point เท่ากับ 6.42 (Padhye และ Salunkhe, 1979) ในขณะที่ Pasha, Begum, และ Baset (1995) ศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนจากข้าวกล้องพันธุ์ *indica* พบว่า albumin มีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 12,000-240,000 Da

2.3.4 Globulin

Globulin ละลายได้ในสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 5 %w/v แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม คือ α-globulin ซึ่งมีขนาดโมเลกุลต่ำ คือ 18 kDa พบในเนื้อข้าว (Pasha, Begum, และ Baset , 1995) β-globulin ซึ่งพบในเนื้อข้าวเท่านั้น γ-globulin เป็นองค์ประกอบหลักใน bran และ germ เป็นโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 150 kDa (Morita และ Yoshida, 1968) และ δ-globulin มีขนาดโมเลกุลใหญ่มากโดยโปรตีนจะออกมาพร้อมกับ void volume ในการศึกษาขนาดโมเลกุลด้วย gel filtration chromatography ด้วย sephadex G-200

ปริมาณ albumin และ globulin รวมกันเท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนข้าวทั้งหมด



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของข้าว (Juliano, 1972)

c.w. คือ ผนังเซลล์

s.g. คือ เม็ดแป้ง

p.b. คือ protein body

2.4 คุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนข้าว

ปริมาณกรดอะมิโนในข้าวแสดงดังตารางที่ 2.4 เห็นได้ว่าโปรตีนข้าวมี lysine สูงเมื่อเปรียบเทียบกับธัญชาติชนิดอื่น ๆ (Palmiano และคณะ, 1968) คือ มี lysine ประมาณ 3-4 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด แต่ก็จัด lysine เป็น first limiting amino acid ของธัญชาติ

2.5 การสกัดโปรตีนจากข้าวเจ้า

การสกัดโปรตีนจากข้าวเจ้านั้นก็มีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การสกัดโปรตีนด้วยด่าง ดีเทอร์เจ้นต์ และการใช้เอนไซม์ในการสกัด เป็นต้น โดยการเลือกวิธีที่จะศึกษาการสกัดโปรตีนจากข้าวเจ้าจะพิจารณาจากการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ ความสะดวกในการสกัด การประหยัดพลังงาน ต้นทุน เวลาและเป็นวิธีที่มีสารพิษที่เกิดจากกระบวนการสกัดต่ำที่สุด เพื่อศึกษารายละเอียดในขั้นต่อไป

2.5.1 การสกัดโปรตีนจากข้าวสาร

การสกัดโปรตีนจากข้าวสารมีหลายวิธี โดยมีรายละเอียดดังนี้

2.5.1.1 การสกัดโปรตีนจากข้าวสารโดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดตามสมบัติการละลายในตัวทำละลาย

Cagampang และคณะ (1966) ศึกษาการสกัดโปรตีนจากข้าวสารจากข้าวพันธุ์ Chia-nan 8 Taichung 1 และ BPI-76 สกัด albumin globulin prolamin glutelin ด้วยน้ำกลั่น NaCl ความเข้มข้น 5 %w/v ethanol ความเข้มข้น 60 %v/v และ NaOH ความเข้มข้น

ตารางที่ 2.4 ปริมาณกรดอะมิโนในเมล็ดธัญชาติ (g amino acid/16 g N)

กรดอะมิโน	ข้าวสาลี	บาร์เลย์	โอต	ไรย์	ทริติเคลี	ข้าว	ข้าวโพด	ข้าวฟ่าง	ข้าวมิลเลต		
									เพริล	ฟอกซ์เทล	โปรโซ
อาร์จินีน	4.0	4.4	6.6	4.2	4.9	7.7	4.7	2.6	3.3	2.3	3.2
ซีสทีน+ซีสทิอีน	2.6	2.5	3.3	2.3	2.8	1.1	2.5	1.1	1.8	1.4	1.0
ฮีสทิดีน	2.2	2.1	2.2	2.1	2.5	2.3	2.8	2.1	2.3	1.2	2.1
ไอโซลิวซีน	3.8	3.8	4.2	3.6	4.1	3.9	4.0	3.8	4.3	6.1	4.1
ลิวซีน	6.7	6.9	7.2	6.0	6.7	8.0	12.5	13.6	13.1	10.5	12.2
ไลซีน	2.3	3.5	3.7	2.9	3.0	3.7	3.0	2.0	1.7	0.7	1.5
เมทิโอนีน	1.7	1.6	1.8	1.2	1.9	2.4	1.8	1.5	2.4	2.4	2.2
เฟนีลอะลานีน	4.8	5.1	4.9	4.5	4.8	5.2	5.1	4.9	5.6	4.2	5.5
ทริโอนีน	2.8	3.5	3.3	3.3	3.1	4.1	3.6	3.1	3.1	2.7	3.0
ทริปโทแฟน	1.5	1.4	1.6	1.2	1.6	1.4	0.8	1.0	1.4	2.0	0.8
ไทโรซีน	2.7	2.5	3.0	1.9	2.3	3.3	4.4	1.5	3.7	1.6	4.0
วาลีน	4.4	5.4	5.6	4.9	5.0	5.7	5.2	5.0	5.4	4.5	5.4
อะลานีน	3.3	4.1	4.6	3.7	3.6	6.0	7.7	9.5	11.3	-	-
กรดแอสพาติก	4.7	6.1	7.8	6.5	5.9	10.4	6.4	6.3	6.4	-	-
กรดกลูทาริก	33.1	24.5	21.0	27.5	30.9	20.4	18.8	21.7	22.2	-	-
ไกลซีน	3.7	4.2	4.8	3.6	3.9	5.0	3.9	3.1	2.3	-	-
โปรลีน	11.1	10.9	4.7	10.4	10.7	4.8	8.8	7.9	6.9	-	-
เซอรีน	5.0	4.2	4.8	4.3	4.6	5.2	4.9	4.3	6.9	-	-
โปรตีน	16.3	12.1	17.8	14.5	17.9	11.1	10.6	10.5	13.5	12.4	12.5

ที่มา: Lasztityt, 1996

0.4 %w/v อัตราส่วนเฉลี่ยของ albumin : globulin : prolamin : glutelin เท่ากับ 5:9:3:83 คือ มี albumin เท่ากับ 3.75 มิลลิกรัมต่อข้าวสาร 1 กรัม ในทำนองเดียวกันกับ Padhye และ Salunkhe (1979) ซึ่งศึกษาโปรตีนข้าวเมล็ดยาวพันธุ์เทกซัสที่ขัดสีแล้ว (Texas long grain) พบว่ามีอัตราส่วนของ albumin : globulin : prolamin : glutelin เท่ากับ 8 : 9.5 : 12.5 : 70 คือมีปริมาณ albumin เท่ากับ 8.48 มิลลิกรัมต่อข้าวสาร 1 กรัม การใช้สารเคมีในการสกัดโปรตีนไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากอาจเหลือสารเคมีตกค้างได้

2.5.1.2 การสกัดโปรตีนจากข้าวสารโดยใช้เอนไซม์ในการสกัด

Chang, Lee และ Brown (1986) ผลิต high-protein rice flour โดยใช้ข้าวสารพันธุ์ Tai-Nung No. 67 และ Taichung No. 3 (*Japonica)* ทำให้แป้งสุกที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม α-amylase (78 units/mg enzyme) (novozymes®) ปริมาณ 0.25 มิลลิกรัมต่อน้ำแป้ง 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ทำให้ได้ปริมาณ albumin เท่ากับ 0.721 มิลลิกรัมต่อข้าวสาร 1 กรัม นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอื่นที่ใช้เอนไซม์ amylase ย่อยแป้งข้าวโดย Morita และ Kiriyama (1993) ผลิต rice protein isolate โดยใช้แป้งข้าวพันธุ์ *japonica* เติม α-amylase ความเข้มข้น 0.6%v/w บ่มที่อุณหภูมิ 97 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้ปริมาณ albumin เท่ากับ 2.92 มิลลิกรัมต่อข้าวสาร 1 กรัม ในขณะที่ Shih และ Daigle (1997) ใช้ heat stable α-amylase (novozymes®) ความเข้มข้น 0.15 %v/w ย่อยแป้งข้าว (long grain) pH 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที แล้วตามด้วย hemicellulase (novozymes®) ที่ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้ปริมาณ albumin เท่ากับ 7.77 มิลลิกรัมต่อข้าวสาร 1 กรัม

นอกจากการใช้สารเคมี และเอนไซม์ในการสกัดโปรตีนจากข้าวสารแล้วยังมีวิธีทางกายภาพที่ใช้ในการสกัดโปรตีนออกมาจากโครงสร้างของข้าวสาร ดังเช่นงานวิจัยของ Kato และคณะ (2000) ศึกษาการใช้ high hydrostatic pressure ในการสกัดโปรตีนจากข้าวสารพันธุ์ *japonica* โดยให้ความดันที่ระดับ 300 MPa ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ได้ปริมาณ albumin เท่ากับ 0.2-0.5 มิลลิกรัมต่อข้าวสาร 1 กรัม กลไกที่โปรตีนถูกปลดปล่อยออกมา สันนิษฐานว่าเกิด partial destruction ของ endosperm cell เกิด permeation ของสารละลายเข้าไปใน endosperm cell ทำให้เกิด solubilization ของโปรตีนที่อยู่รอบนอกของ protein body และเกิด diffusion ของโปรตีนจาก endosperm cell สู่สารละลายรอบ ๆ

2.5.2 การสกัดโปรตีนจากปลายข้าวหรือข้าวหัก

ปลายข้าวหรือข้าวหักมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น การกำจัดคาร์โบไฮเดรตออกจะช่วยทำให้โปรตีนละลายออกมาได้ง่ายขึ้น โปรตีนในเนื้อเยื่อของปลายข้าวมีได้หลายรูปแบบ โดยโปรตีนที่อยู่รอบ embryonic axis มีรูปแบบชัดเจน ในขณะที่โปรตีนที่อยู่ภายใน embryonic axis กระจายอยู่ใน cytoplasm และ nuclei (Barber และ Barber, 1980) ดังนั้นการทำให้เยื่อชั้นนอกหรือเยื่อหุ้มผล (pericarp) แตกออกและลดขนาดอนุภาคของเนื้อเยื่อภายในทำให้การสกัดโปรตีนออกมาได้มากขึ้น (Betschart, Fong และ Saunders, 1977) วิธีการสกัดโปรตีนจากปลายข้าวหรือข้าวหักมีหลายวิธีแต่นิยมใช้เอนไซม์ในการสกัดเนื่องจากไม่มีสารเคมีตกค้าง ไม่เป็นอันตราย งานวิจัยที่ศึกษาการสกัดโปรตีนจากปลายข้าวหรือข้าวหัก มีดังนี้

งานวิจัยที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดโปรตีนจากปลายข้าว ได้แก่ Ju, Hettiarachchy และ Rath (2001) ซึ่งสกัดโปรตีนจากปลายข้าวเมล็ดยาว (long grain) (โปรตีน 8.75 เปอร์เซ็นต์) โดยใช้น้ำกลั่น NaCl ความเข้มข้น 5 %w/v NaOH ความเข้มข้น 0.02 M และ ethanol ความเข้มข้น 70 %v/v ในการสกัด albumin globulin glutelin และ prolamin ทำให้ได้ albumin globulin glutelin และ prolamin คิดเป็น 4.45 13.11 79.74 และ 2.46 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนข้าวที่สกัดได้ ได้ปริมาณ albumin เท่ากับ 3.89 มิลลิกรัมต่อปลายข้าว 1 กรัม

นอกจากนี้ยังมีการใช้เอนไซม์ในการสกัดโปรตีนจากปลายข้าวโดย Shih และคณะ (1999) ใช้ heat stable α-amylase (novozymes®) 120 KNU/g ความเข้มข้น 0.15 %v/w ย่อยปลายข้าว long grain (มีโปรตีน 8.1 เปอร์เซ็นต์) ที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ได้ปริมาณ albumin เท่ากับ 1.70 มิลลิกรัมต่อปลายข้าว 1 กรัม หลังจากนั้นใช้ cellulase (Solvay Enzymes®) ความเข้มข้น 0.2 % v/w บ่มที่ pH 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ย่อยตะกอนจากการย่อยด้วย α-amylase จะได้ปริมาณ albumin เท่ากับ 12.31 มิลลิกรัมต่อปลายข้าว 1 กรัม หรือใช้ hemicellulase (Solvay Enzymes®) ความเข้มข้น 0.5 %v/w ย่อยตะกอนจากการย่อยด้วย α- amylase โดยย่อยที่ pH 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้ปริมาณ albumin เท่ากับ 17.82 มิลลิกรัมต่อปลายข้าว 1 กรัม และเมื่อใช้เอนไซม์ α-amylase (novozymes®) ร่วมกับ cellulose (Solvay Enzymes®) และ hemicellulase (Solvay Enzymes®) พบว่าได้ปริมาณ albumin เท่ากับ 20.74 มิลลิกรัมต่อปลายข้าว 1 กรัม จากการสกัดด้วยเอนไซม์ข้างต้นจะเห็นได้ว่าการใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกันในการสกัดโปรตีนจากปลายข้าวทำให้ได้ปริมาณ albumin สูงกว่าการใช้เอนไซม์ชนิดเดียว

2.5.3 การสกัดโปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมัน

โครงสร้างของรำข้าวและรำสกัดไขมันมี cellulose hemicellulose ในรูปของ xylose และ arabinose ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ xylose ประกอบด้วย D-xylose (D-xylopyranosyl) โปรตีนในรำข้าวเรียงตัวอยู่รอบๆ phytate anion ทำให้เกิด insoluble protein-phytate complex (Wang และคณะ, 1999) โปรตีนในรำข้าวจะจับกับไขมันในขณะที่โปรตีนในรำสกัดไขมันจับกับไขมันลดลงเนื่องจากมีปริมาณไขมันลดลงจากการสกัดไขมันออกไปแล้ว ดังนั้นการทำให้เยื่อชั้นนอกหรือเยื่อหุ้มผล (pericarp) แตกออกและลดขนาดอนุภาคของเนื้อเยื่อภายในหรือการย่อยองค์ประกอบในรำข้าวออกจะทำให้สกัดโปรตีนออกมาได้มากขึ้น (Betschart, Fong และ Saunders, 1977) งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัดโปรตีนจากรำข้าวโดยใช้ตัวทำละลาย มีดังนี้

Cagampang และคณะ (1966) ศึกษาการสกัดโปรตีนจากรำหยาบ (bran) และ รำละเอียด (rice polish) จากข้าวพันธุ์ Chia-nan 8 Taichung 1 และ BPI-76 โดยสกัด albumin globulin prolamin glutelin ด้วยน้ำกลั่น NaCl ความเข้มข้น 5 %w/v ethanol ความเข้มข้น 60 %v/v และ NaOH ความเข้มข้น 0.4 %w/v ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้อัตราส่วนของ albumin : globulin : prolamin : glutelin เท่ากับ 37 : 36 : 5 : 22 (รำหยาบ) 30 : 14 : 5 : 51 (รำละเอียด) จะเห็นได้ว่ารำข้าวมี albumin และ globulin เป็นองค์ประกอบหลัก และเป็นไปในแนวโน้มเดียวกับ Lander และ Hamaker (1994) ซึ่งใช้น้ำกลั่นในการสกัด albumin จากรำข้าวที่สกัดน้ำมันออกแล้วได้ปริมาณ albumin เท่ากับ 54.23 มิลลิกรัมต่อรำข้าว 1 กรัม สอดคล้องกับ Hamada (1997) ซึ่งสกัดโปรตีนจาก ether-defatted rice bran โดยใช้น้ำกลั่น NaCl ความเข้มข้น 2 %w/v ethanol ความเข้มข้น 70% %v/v และ NaOH 0.1 M ในการสกัด albumin globulin prolamin และ glutelin ได้ albumin globulin prolamin และ glutelin เท่ากับ 34 15 6 11 และ 32 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนข้าวทั้งหมด ตามลำดับ คือ ได้ปริมาณ albumin เท่ากับ 55.76 มิลลิกรัมต่อรำสกัดไขมัน 1 กรัม และมีการศึกษาผลของการให้ความร้อนแก่รำข้าวที่มีต่อปริมาณโปรตีนที่ถูกสกัดออกมาโดยเปรียบเทียบกับรำข้าวที่ไม่ผ่านการ ให้ความร้อน โดย Gnanasambandam และ Hettiarachchy (1995) เปรียบเทียบการสกัดโปรตีนจากรำข้าวและรำข้าวที่ผ่านการให้ความร้อน นำรำข้าวทั้งสองไปสกัดน้ำมันออกและสกัดโปรตีนโดยการปรับ pH เป็น 9.5 เพื่อละลายโปรตีนและตกตะกอนโปรตีนที่ pH 4.5 พบว่าปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง 105-110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-45 นาที จะให้ปริมาณโปรตีนต่ำกว่ารำข้าวที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน ทั้งนี้เนื่องจากระหว่างการให้ความร้อนนั้นโปรตีนเกิดแปลงสภาพทำให้โปรตีนถูกสกัดออกมาได้ต่ำ สอดคล้องกับ Betschart, Fong

และ Saunders (1977) ซึ่งใช้น้ำกลั่น NaCl ความเข้มข้น 5 %w/v ethanol ความเข้มข้น 60 %v/v NaOH ความเข้มข้น 0.4 %w/v สกัดโปรตีน albumin globulin prolamin และ glutelin จากรำข้าว (Spanish rice bran) ที่ไม่ได้ให้ความร้อน (มีโปรตีน 15.4 เปอร์เซ็นต์) และรำข้าวที่ให้ความร้อน (มีโปรตีน 16.1 เปอร์เซ็นต์) รำข้าวที่ไม่ได้ผ่านการให้ความร้อนได้ albumin globulin prolamin และ glutelin เท่ากับ 40 : 21 : 3 : 36 คิดเป็น albumin เท่ากับ 61.60 มิลลิกรัมต่อรำข้าว 1 กรัม และรำข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนได้ albumin globulin prolamin และ glutelin เท่ากับ 26 : 14 : 5 : 56 คิดเป็น albumin เท่ากับ 41.86 มิลลิกรัมต่อรำข้าว 1 กรัม จะเห็นได้ว่าการสกัดโปรตีนจากรำข้าวที่ไม่ได้ผ่านการให้ความร้อนให้ปริมาณโปรตีนสูงกว่าการสกัดโปรตีนจากรำข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนทั้งนี้เนื่องจากรำข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนเป็นรำข้าวที่ผ่านการสกัดน้ำมันด้วย hexane และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105-110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-45 นาทีในการระเหยตัวทำละลายพร้อมกับการทำลายการทำงานของเอนไซม์ lipase ที่มีผลต่อคุณภาพของรำข้าว จึงทำให้โปรตีนเกิดแปลงสภาพ และละลายออกมาได้ต่ำกว่ารำข้าวที่ไม่ได้ผ่านการให้ความร้อน

นอกจากการใช้ตัวทำละลายในการสกัดโปรตีนแล้วยังมีการใช้เอนไซม์ในการสกัดโดยแบ่งตามชนิดของเอนไซม์ที่ใช้สกัด ดังนี้ การใช้ α-amylase ในการสกัดโดย Shih และคณะ (1999) ใช้ α-amylase (novozymes®) 120 KNU/g ความเข้มข้น 0.15 %v/w ย่อยรำข้าวที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ได้ปริมาณ albumin เท่ากับ 16.88 มิลลิกรัมต่อรำข้าว 1 กรัม การใช้เอนไซม์ cellulase ในการสกัดโดย Ansharullah, Hourigan และ Chesterman (1997) ใช้ cellulase (novozymes®) ย่อยรำข้าว ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 3.8 เวลา 5 ชั่วโมง ได้ปริมาณ albumin เท่ากับ 25.94 มิลลิกรัมต่อรำข้าว 1 กรัม Shih และคณะ (1999) ใช้ cellulase (Solvay Enzymes®) ความเข้มข้น 0.2 %v/w ย่อยรำข้าวที่ pH 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้ปริมาณ albumin เท่ากับ 44.35 มิลลิกรัมต่อรำข้าว 1 กรัม Tang และ Hettiarachchy (2002) ศึกษาการสกัดโปรตีนจากรำสกัดไขมันโดยใช้ cellulase (novozymes®) ได้ปริมาณ albumin เท่ากับ 11 ถึง 12 มิลลิกรัมต่อรำสกัดไขมัน 1 กรัม การใช้ hemicellulase ในการสกัดโดย Shih และคณะ (1999) ใช้ hemicellulase (Solvay Enzymes®) ความเข้มข้น 0.5 %v/w ย่อยรำข้าวที่ pH 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าได้ปริมาณ albumin เท่ากับ 57.46 มิลลิกรัมต่อรำข้าว 1 กรัม การใช้ mixed enzymes (arabanase cellulase hemicellulase β-glucanase และ xylanase) (novozymes®) ในการสกัด Ansharullah, Hourigan และ Chesterman (1997) สกัดโปรตีนจาก full-fat extruded rice bran (มี cellulose 27-33 เปอร์เซ็นต์ และ hemicellulose เช่น

xylose 36-42 เปอร์เซ็นต์) ใช้ mixed enzymes ย่อยรำข้าว พบว่าการใช้ mixed enzymes ย่อยรำข้าว ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 3.8 เวลา 5 ชั่วโมง ได้ปริมาณ albumin เท่ากับ 57.89 มิลลิกรัมต่อรำข้าว 1 กรัม และ Tang และ Hettiarachchy (2000) ใช้ mixed enzymes (arabanase cellulase hemicellulase β-glucanase และ xylanase) (novozymes®) ย่อยรำสกัดไขมันที่ผ่านการให้ความร้อนได้ปริมาณ albumin เท่ากับ 13-25 มิลลิกรัมต่อรำสกัดไขมัน 1 กรัม การใช้เอนไซม์ proteases ในการสกัดโดย Hamada (2000) ศึกษาการสกัดโปรตีนจากรำข้าว *indica* โดยย่อยรำข้าวด้วย exoprotease ผสมกับ endoprotease (novozymes®) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8 ได้ปริมาณ albumin เท่ากับ 46.05 มิลลิกรัมต่อรำข้าว 1 กรัม จากงานวิจัยข้างต้นจะเห็นได้ว่า มีการใช้เอนไซม์หลายชนิดในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวโดยมีวัตถุประสงค์ของการใช้เอนไซม์ข้างต้น คือ ย่อยองค์ประกอบของรำข้าวพวก cellulose hemicellulose starch และคาร์โบไฮเดรตอื่น ๆ ออกจากโปรตีน ทำให้โปรตีนละลายออกมาได้มากขึ้น การใช้เอนไซม์แต่ละชนิดให้ปริมาณ albumin ใกล้เคียงกัน แต่มีภาวะที่เหมาะสมแตกต่างกันโดยการใช้ α-amylase (novozymes®) ในการสกัดโปรตีนต้องบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมค่อนข้างสูง คือ 95 องศาเซลเซียส ในขณะที่เอนไซม์ชนิดอื่นมีอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส จะเห็นได้ว่าการใช้ α-amylase ในการสกัดโปรตีนมีข้อเสีย คือ สิ้นเปลืองพลังงานในการให้ความร้อน

2.5.4 การสกัดโปรตีนจากข้าวกล้อง

องค์ประกอบของข้าวกล้องนั้นคล้ายกับข้าวสาร คือ มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลัก การสกัดโปรตีนจากข้าวกล้องโดย Shih และ Daigle (2000) เตรียม rice protein isolate จาก brown rice protein concentrate เป็น by-product จากกระบวนการผลิต syrup ที่มีโปรตีน 49 เปอร์เซ็นต์ pH 6.5 เติม α-amylase (novozymes®) ให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ลดอุณหภูมิจนถึง 60-62 องศาเซลเซียส ปรับ pH 4 แล้วเติม glucoamylase (Solvay Enzymes®) 0.4 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้ปริมาณ albumin เท่ากับ 8.33 มิลลิกรัมต่อข้าวกล้อง 1 กรัม และใช้ cellulase (novozymes®) หรือ hemicellulase (Solvay Enzymes®) หรือ mixed enzymes ของ cellulase β-glucanase และ xylanase (Genencor®) ความเข้มข้น 1 %v/w ย่อยข้าวกล้องที่ pH 5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะได้ปริมาณ albumin เท่ากับ 103.88 79.38 และ 24.01 มิลลิกรัมต่อข้าวกล้อง 1 กรัม ตามลำดับ

2.6 การศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้

การศึกษาโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้มีหลายวิธี ได้แก่ Radioallergosorbent Test Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยใช้ serum ของมนุษย์หรือ serum ของกระต่ายในการทดสอบ (Engvall และ Perlmann, 1971) หรือใช้การศึกษาขนาดโมเลกุลร่วมกับการศึกษาทาง immunology โดยศึกษาขนาดโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE หรือใช้ gel filtration chromatography แล้วนำโปรตีนที่แยกได้ไปบ่มด้วย antiserum บน nitrocellulose sheet และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ด้วย ELISA (Towbin, Staehelin และ Gordon, 1979) ขนาดโมเลกุลของโปรตีนข้าวที่ทำให้เกิดการแพ้มีหลายขนาด เช่น 14 15.5 16 40 และ 50 kDa เป็นต้น จากการศึกษาของ Matsuda และคณะ (1988) ที่ใช้ ion-exchange chromatography แพ็คด้วยเรซินชนิด DEAE cellulose จะทำให้แยกได้ peak ที่มี homogeneity สูง 1 peak และนำโปรตีนส่วนนี้ไปศึกษา allergenic properties โดยใช้ ELISA โดยใช้ serum ของผู้ที่มีอาการแพ้โปรตีนจากข้าวและหาขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้จากข้าวสารพันธุ์ *Japonica* ด้วย SDS-PAGE ร่วมกับ gel filtration chromatography พบว่าโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 16 kDa ทำให้ผู้ป่วยที่มีอาการแพ้โปรตีนข้าวเกิดการแพ้โดยคิดเป็น ELISA value สูงถึง 8 เท่าหรือสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับคนที่ไม่มีอาการแพ้ และได้รายงานว่าพบ allergenic proteinsในรำข้าว และ เนื้อข้าวเท่ากับ 0.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นั่นคือโปรตีนที่มีในเนื้อข้าว (endosperm) พบโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้มากกว่าโปรตีนจากรำข้าว ซึ่งสันนิษฐานได้ว่าโปรตีนหลักที่พบในเนื้อข้าว (glutelin และ prolamin) เป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ได้สูงกว่าโปรตีนหลักที่พบในรำข้าว (albumin และ globulin) จากงานวิจัยของ Matsuda และคณะ (1991) ซึ่งไม่พบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ16 kDa ในส่วนของ albumin หรือ globulin แต่จะพบในโปรตีนส่วนอื่น เป็นไปในแนวโน้มเดียวกับ Landers และ Hamaker (1994) ซึ่งสกัดโปรตีนจากรำข้าว และไม่พบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล16 kDa ใน albumin หรือ globulin และมีโปรตีนขนาด 17.6 18.6 22.0 24.5 34.0 และ 60.7 kDa และยังพบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 40 และ 50 kDa ในทุกตัวอย่างที่เตรียมได้แต่เป็นโปรตีนที่ทำให้แพ้ต่ำ

โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 16 kDa เป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ได้สูงและไม่พบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 16 kDa ใน albumin ของโปรตีนข้าว ดังนั้น การศึกษาหาขนาดโมเลกุล 16 kDa ในโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ gel filtration chromatography จึงสามารถบ่งบอกถึงโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้สูงได้โดยไม่ต้องมีการศึกษาโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้โดยการศึกษาทาง immunology

2.7 การศึกษาคุณภาพของโปรตีน (Protein quality)

โปรตีนเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต โดยในด้านโภชนาการนั้นโปรตีนจะมีหน้าที่พื้นฐานในการเป็นแหล่งของกรดอะมิโนโดยขึ้นกับชนิดและปริมาณของกรอะมิโน และการที่ร่างกายนำกรดอะมิโนไปใช้ได้หลังจากการย่อย ดูดซึมและผ่านเมตาบอลิซึมต่าง ๆ โดยการดูดซึมและนำกรดอะมิโนไปใช้จะขึ้นอยู่กับแหล่งโปรตีน กระบวนการผลิตอาหาร interaction ระหว่างโปรตีนกับองค์ประกอบอื่นในอาหาร อายุและสุขภาพของผู้บริโภค วิธีการประเมินคุณภาพของโปรตีนมีด้วยกันหลายวิธี (Damodaran, 1996) ดังนี้

2.7.1 **วิธีประเมินทางเคมี** เป็นการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนในอาหาร อาหารโปรตีนชนิดใดมีปริมาณโปรตีนสูง และมีกรดอะมิโนจำเป็นอยู่ในสัดส่วนที่เหมาะสมเพียงพอแก่ความต้องการของร่างกาย แสดงว่าอาหารโปรตีนนั้นมีคุณภาพดี หลักการวิเคราะห์คือ วิเคราะห์หาส่วนประกอบของกรดอะมิโนของโปรตีนนั้น แล้วเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นในอาหารโปรตีนกับปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นในอาหารโปรตีนที่เป็นมาตรฐาน ค่าที่ได้เรียกว่าคะแนนกรดอะมิโน (amino acid score หรือ chemical score)

$$\text{คะแนนกรดอะมิโน} = \frac{\text{ปริมาณ (มก.) ของกรดอะมิโนจำเป็นในโปรตีนที่นำมาทดสอบ 1 กรัม}}{\text{ปริมาณ (มก.) ของกรดอะมิโนจำเป็นในโปรตีนที่เป็นมาตรฐาน 1 กรัม}}$$

หมายเหตุ อาจคิดเป็นเปอร์เซ็นต์โดยคูณด้วย 100

โปรตีนที่นำมาใช้เป็นมาตรฐาน หมายถึงโปรตีนที่เข้าไปในร่างกายแล้วร่างกายสามารถนำไปใช้ได้เกือบทั้งหมด ไม่ต้องบริโภคอาหารโปรตีนอย่างอื่นเสริมเข้าไป เช่น โปรตีนจากไข่และน้ำนม ส่วนกรดอะมิโนที่นิยมนำมาเปรียบเทียบ ได้แก่ lysine และ tryptophan เพราะเป็นกรดอะมิโนที่มักมีจำนวนจำกัดในอาหาร โปรตีนที่มีกรดอะมิโนจำเป็นครบถ้วนและมีปริมาณเหมาะสม เช่น โปรตีนจากไข่ จะมีคะแนนกรดอะมิโนเท่ากับ 100 แต่อย่างไรก็ตามวิธีทดสอบทางเคมีไม่ได้แสดงให้เห็นว่า เมื่อมนุษย์บริโภคอาหารโปรตีนนั้นเข้าไปแล้วสามารถย่อย ดูดซึม และนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงหรือไม่ (Damodaran, 1996) Prakash และ Ramanatham (1995) วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนรำข้าวเข้มข้นที่ผลิตจากรำข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนและด้วยกรดไฮโดรคลอริก พบว่ากรดอะมิโนจำเป็นที่พบมากในรำข้าวทั้งสอง คือ lysine และ methionine ซึ่งสอดคล้องกับ Gnanasambandam และ Hettiarachchy (1995) ซึ่งรายงานว่าโปรตีนเข้มข้นที่ผลิตจากรำข้าว ปรับ pH เป็น 9.5 และตกตะกอนโปรตีนที่ pH 4.5 มี lysine ในปริมาณสูง Padhye และ Salunkhe (1979) พบว่าโปรตีนที่สกัดได้จากข้าวสารพันธุ์ Texas long grain มี albumin globulin prolamin และ glutelin ซึ่งมีคะแนนกรดอะมิโนเท่ากับ 47.5 53.0

23.0 และ 46.7 ตามลำดับ มีกรดอะมิโนจำกัด (limiting amino acid) คือ leucine lysine sulfur-containing amino acid และ threonine ตามลำดับ มีค่าคะแนนกรดอะมิโนเท่ากับ 65.1 66.3 67.9 และ 78.9 ตามลำดับ ในขณะที่ Prakash และ Ramanatham (1995) รายงานว่าโปรตีนรำข้าวเข้มข้นมีกรดอะมิโนจำกัดคือ threonine และ isoleucine ซึ่งมีค่าคะแนนกรดอะมิโน เท่ากับ 61.5 และ 66.0 ตามลำดับ และมีกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงได้ง่ายเมื่อได้รับความร้อน ได้แก่ lysine และ phenylalanine

นอกจากการประเมินคุณภาพของโปรตีนด้วยการวิเคราะห์ค่าคะแนนกรดอะมิโนแล้วยังมีการวิเคราะห์ค่า protein digestibility corrected amino acid score (PDCAAS) เป็นวิธีที่ใช้ค่า digestibility ร่วมกับวิธีทางเคมี คือ การวิเคราะห์ค่า amino acid score และเป็นวิธีที่ FAO/WHO (1991) แนะนำให้ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารแทนการวิเคราะห์ค่า PER ได้ เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกในการวิเคราะห์ มีความแม่นยำและสามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็ว ใช้เวลาน้อยกว่า 48 ชั่วโมง จึงนำไปใช้ในงานที่เป็น routine ได้ นอกจากนี้ยังไม่ต้องมี pretreatment ก่อนการวิเคราะห์ สามารถใช้วิเคราะห์คุณภาพของอาหารโปรตีนได้หลากหลายแม้แต่โปรตีนที่มีคุณภาพต่ำได้และยังใช้ต้นทุนในการวิเคราะห์ต่ำ ค่า PDCAAS คำนวณได้จาก

PDCAAS = digestibility (%) x amino acid score ที่ต่ำที่สุด

วิธีการวิเคราะห์ค่า digestibility

1. ชั่งตัวอย่างให้มีไนเตรเจน 10 mg N ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แช่ไว้ 1 ชั่วโมง
3. equilibrate เคซีนและตัวอย่างโปรตีน และเอนไซม์ที่ใช้ให้มี pH 8 $\pm$ 0.03 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บเอนไซม์บนอ่างน้ำแข็ง
4 .equilibrate control ด้วยการเติมสารละลายเอนไซม์ A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 19 นาที
5. เติมสารละลายเอนไซม์ B ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัด pH ทันทีหลังจากบ่มด้วยสารละลายเอนไซม์ A เป็นเวลา 20 นาที (X)
6. คำนวณ % digestibility จากสูตร

$$\% \text{ digestibility} = 234.84 - 22.56(X)$$

2.7.2 **วิธีประเมินทางชีววิทยา** หลักการ คือ นำโปรตีนที่ต้องการทดสอบไปเลี้ยงสัตว์ทดลอง เช่น หนู แล้ววิเคราะห์ร่างกายของสัตว์ว่าได้ใช้โปรตีนไปอย่างไร ค่าที่นิยมวิเคราะห์

ได้แก่ protein efficiency ratio, digestibility ratio, biological value, net protein utilization

Protein efficiency ratio (PER) โดยใช้หนูทดลอง (A.O.A.C, 1990)

เป็นการวัดคุณภาพของโปรตีน โดยพิจารณาน้ำหนักตัวของสัตว์ที่เพิ่มขึ้น โดยมีหลักการว่า ถ้าอาหารโปรตีนใดที่สามารถทำให้ร่างกายเจริญเติบโตได้ดี น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ค่า PER ที่ได้ก็สูง แสดงว่าอาหารโปรตีนมีคุณค่าสูง

$$\text{PER} = \frac{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น(กรัม)}}{\text{น้ำหนักอาหารโปรตีนที่ได้รับ (กรัม)}}$$

Hansen และคณะ (1981) รายงานว่าโปรตีนข้าวมีค่า Protein Efficiency Ratio (PER) เท่ากับ 2.18 ซึ่งใกล้เคียงกับเนื้อวัวซึ่งมีค่า PER เท่ากับ 2.30 การที่โปรตีนข้าวมีค่า PER สูง อาจเนื่องจากมีสมดุลของกรดอะมิโนจำเป็นที่ดี ค่า PER ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับ Chang, Lee และ Brown (1986) ซึ่งศึกษาคุณภาพของแป้งข้าวโปรตีนสูงที่ผลิตจากแป้งสุกเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ย่อยด้วย ∝-amylase (novozymes®) 0.25 มิลลิกรัมต่อน้ำแป้ง 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาทีได้ค่า PER เท่ากับ 2.17 งานวิจัยที่ศึกษาคุณภาพของโปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าว ได้แก่ Connor, Saunders และ Kohler (1976) ศึกษาค่า PER ของโปรตีนเข้มข้นที่สกัดจากรำข้าว long grain โดยใช้อัตราส่วนของรำข้าวต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:5 ที่ pH 9 เป็นเวลา 15 นาที พบว่ามีค่า PER ของโปรตีนที่ตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส pH 6 และตกตะกอนด้วยกรดที่ pH 4 เท่ากับ 1.99 และ 2.19 ตามลำดับ และมีค่า PER สูงกว่ารำข้าว (1.59) ในทำนองเดียวกัน Prakash และ Ramanatham (1995) ศึกษาค่า PER ของโปรตีนรำข้าวเข้มข้นที่ผลิตจากรำข้าวที่ไม่ผ่านและผ่านการรักษาความคงตัว (stabilize) ด้วยกรดพบว่าโปรตีนมีค่า PER เท่ากับ 2.02 และ 2.19 ตามลำดับ

Digestibility ratio (Chang และ Satterlee, 1979) คือ ความสามารถในการย่อยได้ของโปรตีน โปรตีนในอาหารแต่ละชนิดมี digestibility ratio ต่างกัน

$$\text{Digestibility ratio} = \frac{\text{ปริมาณไนโตรเจนที่ถูกดูดซึม}}{\text{ปริมาณไนโตรเจนที่กินเข้าไป}}$$

Biological value (BV) (Eggum และ Juliano, 1973) พิจารณาจำนวนสารไนโตรเจนที่ร่างกายรับไว้ใช้เป็นประโยชน์หลังจากผ่านการย่อยแล้ว โดยคิดเป็นร้อยละของการดูดซึม ไนโตรเจนที่ร่างกายสะสมไว้ก็เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและเสริมสร้างส่วนที่สึกหรอ

$$\text{Biological value (BV)} = \frac{\text{ปริมาณไนโตรเจนที่ร่างกายสะสม}}{} \times 100$$

ปริมาณโปรตีนที่ร่างกายดูดซึม

Lozsa และ Koller (1954) ศึกษา biological value ของโปรตีนที่สกัดจากข้าว พบว่า albumin มีค่า biological value สูงที่สุด รองลงมา คือ globulin และ glutelin และ prolamin มีค่าต่ำที่สุด Morita และ Kiriyama (1993) ศึกษา digestibility และ biological value ของโปรตีนไอโซเลทจากข้าว *japonica* โดยใช้ α-amylase เข้มข้น 0.6% v/w ย่อยแป้งข้าวเจ้าที่อุณหภูมิ 97 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้ค่า digestibility และ biological value เท่ากับ 87.0 และ 51.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Net protein utilization (NPU) (Miller และ Bender, 1955) คือ ค่าโปรตีนสุทธิที่ร่างกายนำไปใช้ประโยชน์ ใช้หลักการเดียวกับการหาค่า BV แต่วิธีนี้จะคำนึงถึงการย่อยโปรตีนด้วย ถ้าโปรตีนชนิดใดย่อยง่ายจะดูดซึมนำไปใช้ประโยชน์ได้มาก แสดงว่าโปรตีนชนิดนั้นมีคุณภาพดี

NPU = BV x digestibility

2.7.3 การประเมินโดยใช้เอนไซม์และการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ การใช้เอนไซม์ในการประเมินคุณภาพของโปรตีนทำได้โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสย่อยโปรตีนตัวอย่าง เอนไซม์ที่ใช้ เช่น เปปซิน ทริปซิน ไคโมทริปซิน เป็นต้น ภายใต้ภาวะที่กำหนด

การหาค่า protein efficiency ratio ด้วย calculation method (A.O.A.C, 1990)

PER คำนวณจากองค์ประกอบของกรดอะมิโนจำเป็นของตัวอย่าง (DC-PER) หรือจากทั้งองค์ประกอบของกรดอะมิโนจำเป็นและ enzymatic digestibility ของโปรตีน (C-PER) การใช้ทั้ง C-PER และ DC-PER ทำให้การประเมินคุณภาพของโปรตีนมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น ถึงแม้ Rat bioassay จะเป็นวิธีมาตรฐานในการหาคุณภาพของโปรตีนก็ตาม แต่ C-PER และ DC-PER ก็เป็นทางเลือกใน routine quality control ในอาหารและองค์ประกอบของอาหาร การใช้ assay ทั้งสองแนะนำไว้ในการประเมินคุณภาพอาหารโปรตีน เพื่อใช้ใน internal check เมื่อประเมินคุณภาพโปรตีนจากทั้งสองวิธีและได้ค่าแตกต่างกัน อาจเกิดจาก

1) single-cell protein หรือ protein ที่มีผนังเซลล์ที่แข็งแรงล้อมรอบ (เช่น ยีสต์ หรือรำข้าวสาลี) ซึ่งจะทำให้ DC-PER มีค่ามากเกินที่ควรเป็น

2) โปรตีนที่ถูกย่อยบางส่วนหรือทั้งหมด (เช่น liquid protein supplement) ซึ่งทำให้ C-PER มีค่าต่ำกว่าที่ควรเป็น

3) โปรตีนที่มี trypsin inhibitor (เช่น heat-treated soy protein) ซึ่งจะทำให้ DC-PER มีค่ามากเกินที่ควรเป็น

ส่วนการประเมินคุณภาพของโปรตีนโดยใช้จุลินทรีย์ ในกลุ่มแบคทีเรีย เช่น *Streptococcus zymogenes* (Ford, 1960) *Streptococcus faecalis* (Halevy และ Grossowicz, 1953) *Leuconostoc mesenteroides* (Horn และคณะ, 1954) และ *Clostridium perfringens* (Solberg และคณะ, 1979) กลุ่มอะมีบา คือ *Tetrahymena pyriformis* เป็นอะมีบาที่มีรูปแบบการใช้กรดอะมิโนคล้ายคลึงกับมนุษย์และหนูมาก (Evancho และคณะ, 1977) การประเมินคุณภาพของโปรตีนโดยใช้จุลินทรีย์มีข้อเสีย คือ จุลินทรีย์จะได้รับผลกระทบจากองค์ประกอบอื่นในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น เครื่องเทศ preservative และไขมัน เป็นต้น ผลการประเมินจึงไม่แม่นยำเท่าที่ควร นอกจากนี้ยังใช้เวลาในการประเมินคุณภาพของโปรตีนนานอีกด้วย

2.8 การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่

เป็นสมบัติทางเคมีกายภาพของโปรตีนที่มีผลต่อระบบของอาหารในระหว่างการเตรียม กระบวนการผลิต การเก็บรักษา การบริโภค คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสรวมถึงคุณค่าทางโภชนาการ (Kinsella, 1976)

2.8.1 สมบัติการเกิดโฟม

สมบัติการเกิดโฟมของโปรตีน หมายถึง ความสามารถของโปรตีนที่ทำให้เกิดพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับของเหลว และรักษาความคงตัวให้กับฟิลม์ไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากแรงกระทำจากภายนอก ผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องการสมบัติการเกิดฟอง ได้แก่ ไอศกรีม เค้ก และเมอแรงจ์ เป็นต้น สมบัติการเกิดโฟมจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับโครงสร้าง surface hydrophobicity ประจุ และ pI ของโปรตีน เช่น globular protein จะเพิ่ม foaming stability ในขณะที่ flexible protein จะช่วยให้เกิด interfacial อย่างรวดเร็วทำให้ foaming activity สูง (Damodaran,1996) นอกจากโครงสร้างของโปรตีนจะมีผลต่อสมบัติการเกิดโฟมแล้วองค์ประกอบทางเคมีอื่นก็มีผลต่อสมบัติการเกิดโฟมได้ เช่น ไขมัน โดยไขมันจะไปลดความคงตัวของโปรตีนที่อยู่ที่ผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับน้ำ (Zayas, 1997) สัมพันธ์กับ Bryant และคณะ (1988) ซึ่งรายงานว่าแป้งจากเมล็ดโอครามีปริมาณโปรตีนและไขมันเท่ากับ 39.15 และ 29.07 เปอร์เซ็นต์ มีค่า foaming capacity เท่ากับ 12 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่โปรตีนเข้มข้นจากเมล็ดโอครามีปริมาณโปรตีนและไขมันเท่ากับ 69.08 และ 0.88 เปอร์เซ็นต์ มีค่า foaming capacity สูงขึ้นเป็น 57 เปอร์เซ็นต์ สารประเภทฟอสโฟลิปิด เช่น เลซิทิน ก็สามารถเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนได้ด้วย hydrophobic interaction (Karel, 1973) จึงทำให้ส่วนที่เป็น hydrophobic side chain ของ

โปรตีนลดลง Poole และคณะ (1986) รายงานว่าเลซิทินจะไปขัดขวางการเกิดฟิลม์ที่ผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับน้ำ ทำให้สมบัติการเกิดโฟมต่ำโดยเป็นไปในแนวโน้มเดียวกับ Bera และ Mukherjee (1989) ซึ่งรายงานว่า โปรตีนรำข้าวเข้มข้นที่ผลิตจากรำข้าวสดมีค่า foaming capacity เท่ากับ 30.54 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรของโฟมต่อปริมาตรทั้งหมด ส่วนโปรตีนรำข้าวเข้มข้นที่ผลิตจากรำสกัดไขมันมีค่า foaming capacity สูงขึ้นเป็น 60.00 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรของโฟมต่อปริมาตรทั้งหมด เห็นได้ว่าโปรตีนรำข้าวเข้มข้นจากรำข้าวสดมีค่า foaming capacity ต่ำกว่าโปรตีนเข้มข้นที่ผลิตจากรำสกัดไขมันในห้องปฏิบัติการเนื่องจากโปรตีนรำข้าวเข้มข้นที่ผลิตจากรำข้าวสดมีปริมาณไขมันสูงกว่ารำสกัดไขมันจึงทำให้สมบัติการเกิดโฟมลดลง เพราะไขมันมีค่า surface active มากกว่าโปรตีน โดยไขมันจะถูกดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับของเหลวได้ดีกว่าโปรตีนจากรำข้าวสด (Damodaran, 1996) การกำจัดองค์ประกอบอื่นออกจากโปรตีนช่วยทำให้สมบัติการเกิดโฟมสูงโดย Wang และคณะ (1999) พบว่าโปรตีนไอโซเลทจากรำข้าวที่ย่อยด้วย phytase และ xylanase ทำให้ได้ foaming activity สูงใกล้เคียงกับโปรตีนไข่ขาวทั้งนี้เนื่องจาก phytase และ xylanase ย่อย phytate และองค์ประกอบในเซลล์ของรำข้าวออก ทำให้โปรตีนที่ละลายออกมามีลักษณะเป็น flexible random-coiled มากขึ้น ช่วยเพิ่ม foaming activity (Halling, 1981; Damodaran, 1990) แต่อย่างไรก็ตามโปรตีนไอโซเลทจากรำข้าวที่ได้ก็มี foaming stability ต่ำกว่าโปรตีนไข่ขาวเนื่องจากไม่มีฟิลม์ที่เหนียวและยืดหยุ่นพอที่จะห่อหุ้มอากาศได้ จึงเกิด collapse ได้ง่าย (Halling, 1981; Damodaran, 1990)

2.8.2 **สมบัติการเกิดอิมัลชัน**

อิมัลชัน หมายถึง ระบบของเหลว 2 ชนิดที่ไม่ละลายซึ่งกันและกัน โดยมีของเหลวชนิดหนึ่งเกิดเป็นเม็ดหยดกลมกระจายอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง ระบบของอิมัลชันแบ่งตามลักษณะการกระจายตัว ถ้าระบบเป็นหยดน้ำมันกระจายอยู่ในน้ำ เรียกว่า อิมัลชันระบบน้ำมันในน้ำ (oil-in-water, O/W) และถ้าระบบเป็นหยดน้ำกระจายอยู่ในน้ำมัน เรียกว่า อิมัลชันระบบน้ำในน้ำมัน (water-in-oil, W/O) ถ้าโปรตีนทำหน้าที่เป็นอีมัลซิฟายเออร์ จะจัดอยู่ในกลุ่มของ biopolymer ซึ่งมีการจัดเรียงส่วน hydrophobic ของโมเลกุลโปรตีนที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมัน (McClement, 1999) ผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องการสมบัติการเกิดอิมัลชัน ได้แก่ ซอส เค้ก มายองเนส นม มาการีน เป็นต้น Bera และ Mukherjee (1989) รายงานว่าโปรตีนรำข้าวเข้มข้นที่ผลิตจากรำข้าวสดมีค่า emulsion capacity สูงกว่าโปรตีนรำข้าวเข้มข้นที่ผลิตจากรำสกัดไขมันในห้องปฏิบัติการ โดยมีค่าเป็น 150.10 และ 72.95 มิลลิลิตรของน้ำมันที่เกิดอิมัลชันต่อโปรตีน 1 กรัม อาจเนื่องจากโปรตีนรำข้าวเข้มข้นที่ผลิตจากรำข้าวสดนั้นมีปริมาณไขมันสูงกว่ารำสกัดไขมัน

ซึ่งจะมีผลทำให้ค่า HLB (hydrophile-lipophile balance) มีค่าเหมาะสมต่อการเกิดอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำมากกว่า Wang และคณะ (1999) พบว่าโปรตีนไอโซเลทจากรำข้าวที่ย่อยด้วย phytase และ xylanase ทำให้ได้ emulsifying properties ต่ำกว่า bovine serum albumin ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนไอโซเลทจากรำข้าวมี surface hydrophobicity ต่ำ (Chaplin และ Andrew, 1989; Petrucceli และ Anon, 1995; Halling, 1981) Hamada (2000) เปรียบเทียบสมบัติการเกิดอิมัลชันของโปรตีนเข้มข้นที่สกัดจากรำสกัดไขมันด้วยเอนไซม์ endoprotease และ endoprotease ผสม exoprotease (novozymes®) โดยโปรตีนรำข้าวเข้มข้นที่สกัดจากทั้ง endoprotease (novozymes®) และ endoprotease ผสม exoprotease (novozymes®) และ bovine serum albumin มีค่า emulsion activity ไม่แตกต่างกัน bovine serum albumin มีค่า emulsion stability สูงกว่าทั้งโปรตีนรำข้าวเข้มข้นที่สกัดจาก endoprotease และendoprotease ผสม exoprotease ทั้งนี้เนื่องจากเกิด deamidation ทำให้หมู่ amide ถูกกำจัดออก และเกิด proteolysis ทำให้โปรตีนมีขนาดเล็กลง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

วัตถุดิบ

ปลายข้าว (*Oryza sativa L.*) พันธุ์ปทุมธานี 1 บดลดขนาดโดยใช้ stone mill ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 100 เมช

รำข้าว พันธุ์ปทุมธานี 1 ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 80 เมช

รำสกัดไขมันได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ปทุมไรซมิลล์ แอนด์ แกรนารี จำกัด (มหาชน) ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 80 เมช

ปลายข้าว รำข้าว และรำสกัดไขมันที่ผ่านการร่อนแยกขนาดแล้วจะนำไปบรรจุใน PET/Al/linear-LDPE ใส่กล่องพลาสติกปิดสนิทและนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

วัสดุและสารเคมี

วัสดุ

Crucible

ถ้วยอะลูมิเนียม

กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42

กระดาษลิตมัส

Dialysis tube MWCO 12,000-14,000 Da

คิวเวต

เอนไซม์

heat stable α-Amylase Type S ผลิตจากการดัดแปลงพันธุกรรมของ *Bacillus licheniformis* (host) และรับรหัสพันธุกรรมในการผลิตเอนไซม์จาก *Bacillus stearothermophilus* (donor) มี activity เท่ากับ 120 KNU/g (Kilo Novo Units/g)

Cellulase ผลิตจาก *Trichoderma reesei* มี activity เท่ากับ 1,500 NCU/g (Novo Cellulase Units/g)

Mixed enzymes (arabanase, cellulose, hemicellulase, β-glucanase และ xylanase) ผลิตจาก *Aspergillus aculeatus* มี β-glucanase เป็นองค์ประกอบหลัก โดยมี activity เท่ากับ 100 FBG/g (Fungal-Beta-Glucanase/g)

Protease ผลิตจาก *Aspergillus oryzae* เป็น endoprotease ผสมกับ exoprotease มี activity เท่ากับ 1,000 LAPU/g (Leucine Aminopeptidase Units/g)

เอนไซม์ทุกชนิดเป็นของบริษัท novozymes® ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท อีสต์เอเชียติ๊ก จำกัด

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมี

Boric acid	A.R. grade
Folin-ciocalteu phenol	A.R. grade
Sodium hydroxide	A.R. grade
Hydrochloric acid	A.R. grade
Sulfuric acid	A.R. grade
Methylene blue	A.R. grade
Methyl red	A.R. grade
Phenolphthalein	A.R. grade
Ethanol	A.R. grade
Petroleum ether	A.R. grade
Selenium mixture	A.R. grade
Calcium chloride	A.R. grade

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมบัฟเฟอร์

Disodium hydrogen phosphate	A.R. grade
Dihydrogen sodium phosphate	A.R. grade
Sodium acetate	A.R. grade
Acetic acid	A.R. grade

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Peterson (1983)

Sodium hydroxide	A.R. grade
Copper sulphate	A.R. grade
Sodium potassium tartrate	A.R. grade
Sodium carbonate	A.R. grade

Folin ciocalteau phenol	A.R. grade
Bovine serum albumin	A.R. grade

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Miller (Miller, 1959)

3,5-Dinitrosalicylic acid	A.R. grade
Sodium hydroxide	A.R. grade
Glucose	A.R. grade

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธี sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis

Acrylamide	A.R. grade
Tris-(hydroxymethyl-aminomethane)	A.R. grade
Glycine	A.R. grade
Hydrochloric acid	A.R. grade
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylenediamine)	A.R. grade
N,N'-Methylenebisacrylamide	A.R. grade
Ammonium persulphate	A.R. grade
2-Mercaptoethanol	A.R. grade
Sodium dodecyl sulphate	A.R. grade
Acetic acid	A.R. grade
Methanol	A.R. grade
Bromophenol blue	A.R. grade
Coomassie brilliant blue	A.R. grade
Glycerol	A.R. grade

Low molecular weight marker ประกอบด้วย

Phosphorylase b มีขนาดโมเลกุล 97,000 Da

Albumin มีขนาดโมเลกุล 66,000 Da

Ovalbumin มีขนาดโมเลกุล 45,000 Da

Carbonic anhydrase มีขนาดโมเลกุล 30,000 Da

Trypsin inhibitor มีขนาดโมเลกุล 20,100 Da

∝-Lactalbumin มีขนาดโมเลกุล 14,400 Da

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธี gel filtration chromatography

Sephacryl S-200 HR

Blue dextran

Sodium chloride A. R. grade

Low molecular weight gel filtration kit ประกอบด้วย

Ribonuclease A มีมวลโมเลกุล 13,700 Da

Chymotrypsinogen A มีมวลโมเลกุล 25,000 Da

Ovalbumin มีมวลโมเลกุล 43,000 Da

Albumin มีมวลโมเลกุล 67,000 Da

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพของโปรตีน

Casein

Trypsin (14,600 unit/mg solid)

∝-Chymotrypsin type II (51 unit/mg solid)

Peptidase (102 unit/g solid)

Bacterial protease type XIV (5.7 unit/mg solid)

sodium hydroxide A.R. grade

Hydrochloric acid A.R. grade

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่

Egg white

Casein

Sodium dodecyl sulphate A.R. grade

น้ำมันถั่วเหลือง

ครุภัณฑ์

ครุภัณฑ์ที่ใช้วิเคราะห์ทางเคมี ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลรีดิวซ์

เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง ชนิด Sartorius รุ่น B410

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ชนิด Sartorius รุ่น 1518

ตู้อบ (WTB Binder)

เตาเผา (Isotemp, FT01/138)

เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) (Minishaker)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

spectrophotometer (Spectronic 20 Genesys)

เครื่องหมุนเหวี่ยง (Medifuge Heraeus Christ)

เครื่องหมุนเหวี่ยง (Thermo IEC Multi-RF)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Julabo SW 23)

เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็ก (Agimatic-N)

ชุดวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (Kjeldatherm and Vapodest I, Gerhardt, KT 85)

ชุดวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (Soxlet Apparatus, Gerhardt)

ครุภัณฑ์ที่ใช้วิเคราะห์หาขนาดโมเลกุลของโปรตีน

ชุด Minigel electrophoresis ยี่ห้อ Hoefer รุ่น mini VE เป็นเครื่องที่ใช้หล่อแผ่นเจลขนาดกว้าง 8 เซนติเมตร ยาว 9 เซนติเมตร สามารถหล่อเจลพร้อมกันได้ 2 แผ่น มีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างได้ทั้งหมด 10 ช่องต่อเจล 1 แผ่น

Power supply 220 V

คอลัมน์แก้วขนาด 1.6 x 100 ซม.

Spectrophotometer (UV-Visible recording spectrophotometer UV-240)

ครุภัณฑ์ที่ใช้วิเคราะห์คุณภาพและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

pH meter CG 840

Hand homogenizer D-7801

Spectrophotometer (UV/VIS spectrophotometer V-530 JASCO)

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 **การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของปลายข้าว รำข้าว และรำสกัดไขมัน (proximate composition)** ได้แก่ โปรตีน ความชื้น ไขมัน เถ้า เส้นใย และคาร์โบไฮเดรต (A.O.A.C, 1990) **และวิเคราะห์ปริมาณ albumin ใน ปลายข้าว รำข้าว และรำสกัดไขมัน** วิธีวิเคราะห์ปริมาณ albumin ดัดแปลงจากวิธีของ Ju, Hettiarachchy และ Rath (2001) โดยใช้อัตราส่วนของวัตถุดิบต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1 : 4 กวนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงที่ 3,000 x g เป็นเวลา 30 นาที วิเคราะห์ปริมาณ albumin ในส่วนน้ำใสด้วยวิธีของ Peterson (1983)

3.2 ศึกษาผลของการให้ความร้อนของผลพลอยได้จากการสีข้าวต่อการสกัดโปรตีน

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลพลอยได้จากการสีข้าวก่อนย่อยด้วยเอนไซม์

นำผลิตภัณฑ์ข้าว (ปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน) 5 กรัม เติมสารละลาย phosphate buffer 0.2 M ที่มี pH เหมาะสำหรับเอนไซม์ที่จะใช้ในขั้นต่อไป ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลาย phosphate buffer 0.2 M pH 6.5 เพิ่มอีก 50 มิลลิลิตร แล้วทำให้เย็นลงโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง

สำหรับตัวอย่างที่ไม่ต้องการให้ความร้อน ทำลักษณะเดียวกันยกเว้นการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส

3.2.2 การย่อยผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลพลอยได้จากการสีข้าวด้วยเอนไซม์

3.2.2.1 การย่อยด้วย α-amylase

เตรียมปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันตามข้อ 3.2.1 โดยใช้สารละลาย phosphate buffer 0.2 M pH 6.5 และทำการย่อยโดยดัดแปลงวิธีของ Shih และคณะ (1999) โดยเติมสารละลาย phosphate buffer 0.2 M pH 6.5 เพิ่มอีก 50 มิลลิลิตร เติม $CaCl_2$ ความเข้มข้น 2 %w/v ปริมาตร 0.31 มิลลิลิตร เติม α-amylase ความเข้มข้น 0.15 %v/w และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง

3.2.2.2 การย่อยด้วย protease

เตรียมปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันตามข้อ 3.2.1 โดยใช้สารละลาย phosphate buffer 0.2 M pH 6.0 และทำการย่อยโดยดัดแปลงวิธีของ Hamada (2000) โดยเติมสารละลาย phosphate buffer 0.2 M pH 6.0 เพิ่มอีก 50 มิลลิลิตร และใช้ protease ปริมาณ 30 LAPU/g (Leucine Aminopeptidase Unit/g) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

3.2.2.3 การย่อยด้วย cellulase

เตรียมรำข้าวและรำสกัดไขมันตามข้อ 3.2.1 โดยใช้สารละลาย phosphate buffer 0.2 M pH 5.0 ทำการย่อยโดยดัดแปลงวิธีของ Shih และคณะ (1999) โดยเติมสารละลาย phosphate buffer 0.2 M pH 6.5 เพิ่มอีก 50 มิลลิลิตร เติม $CaCl_2$ ความเข้มข้น 2 %w/v ปริมาตร 0.31 มิลลิลิตร เติม α-amylase ความเข้มข้น 0.10 %v/w และบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.2.2.4 การย่อยด้วย mixed enzymes (arabanase cellulase hemicellulase β-glucanase และ xylanase)

เตรียมปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันตามข้อ 3.2.1 โดยใช้สารละลาย acetate buffer 0.2 M pH 3.8 ทำการย่อยโดยดัดแปลงวิธีของ Ansharullah, Hourigan และ Chesterman (1997) โดยเติมสารละลาย acetate buffer 0.2 M pH 3.8 เติม mixed enzymes ความเข้มข้น 0.10 %v/w และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตรลงในสารละลายและปรับ pH เป็น 7.0 บ่มเป็นเวลา 60 นาที

3.2.3 การแยกโปรตีนส่วนน้ำใส

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 3.2.2 มาเหวี่ยงแยกที่ 9,000 x g เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Peterson (1983) เลือกภาวะที่ให้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสสูงที่สุด เก็บส่วนน้ำใสสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 6 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1992)

เลือกชนิดเอนไซม์ในการสกัดโปรตีนจากปลายข้าวเพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อไป ดังรายละเอียดต่อไปนี้

3.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากปลายข้าวโดยใช้ α-amylase

3.3.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากปลายข้าวโดยใช้ α-amylase

นำวิธีสกัดโปรตีนจากปลายข้าวโดยใช้ α-amylase ที่ทำให้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสสูงที่สุดจากข้อ 3.2 และแปรอุณหภูมิเท่ากับ 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส เลือกอุณหภูมิที่ให้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสสูงที่สุด

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 4 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1992)

3.3.2 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากปลายข้าวโดยใช้ α-amylase

การสกัดโปรตีนทำโดยใช้อุณหภูมิที่ได้เลือกในข้อ 3.3.1 และแปรเวลาเท่ากับ 0 30 60 120 180 240 และ 300 นาที แยกส่วนน้ำใสวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Peterson (1983) และน้ำตาลรีดิวซ์ (Miller, 1959) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตะกอนโดยใช้ Kjeldahl method เลือกเวลาที่ให้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสสูงที่สุด

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1992)

3.4 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมันโดยใช้ mixed enzymes

3.4.1 ศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่ใช้สกัดโปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมันโดยใช้ mixed enzymes

วิธีการสกัดโปรตีนดัดแปลงจากวิธีของ Ansharullah, Hourigan และ Chesterman (1997) ใช้รำข้าวและรำสกัดไขมันดิบและมีขั้นตอนการศึกษาเช่นเดียวกับข้อ 3.2 และแปรปริมาณเอนไซม์ 0 0.05 0.10 2.00 6.00 8.00 8.70 9.40 และ 10.00 %v/w เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 แล้วนำไปเขย่าใน horizontal shaking water bath ที่ความเร็วรอบ 190 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที แยกส่วนน้ำใสวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Peterson (1983) และน้ำตาลรีดิวซ์ (Miller, 1959) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตะกอนโดยใช้ Kjeldahl method เลือกภาวะที่ให้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสสูงที่สุด

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 2 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1992)

3.4.2 ศึกษาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมันโดยใช้ mixed enzymes

การสกัดโปรตีนทำโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ที่ได้เลือกในข้อ 3.4.1 และมีขั้นตอนการศึกษาเช่นเดียวกับ 3.2 โดยแปร pH เท่ากับ 3.8 4.6 และ 5.4 แปรอุณหภูมิเท่ากับ 30 40 และ 50 องศาเซลเซียส แยกส่วนน้ำใสวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Peterson (1983) และน้ำตาลรีดิวซ์ (Miller, 1959) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตะกอนโดยใช้ Kjeldahl method เลือกภาวะที่ให้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสสูงที่สุด

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design ขนาด 3 x 3 ทดลอง 2 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1992)

3.4.3 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมันโดยใช้ mixed enzymes

การสกัดโปรตีนทำโดยใช้อุณหภูมิและ pH ที่ได้เลือกในข้อ 3.4.2 และและมีขั้นตอนการศึกษาเช่นเดียวกับ 3.2 โดยแปรเวลาเท่ากับ 0 30 60 120 180 240 และ 300 นาที แยกส่วนน้ำใสวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Peterson (1983) และน้ำตาลรีดิวซ์ (Miller, 1959) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตะกอนโดยใช้ Kjeldahl method เลือกภาวะที่ให้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสสูงที่สุด

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1992)

3.5 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลายข้าวที่ใช้ α-amylase รำข้าวและรำสกัดไขมันที่ใช้ mixed enzymes

เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำจากผลพลอยได้จากข้าวหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ โดยพิจารณาปริมาณโปรตีน ปริมาณ albumin เมื่อเทียบกับ albumin ในผลพลอยได้จากการสีข้าวตามวิธีของ Ju, Hettiarachchy และ Rath (2001) และต้นทุนในการผลิต

3.6 การศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้

หาขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันโดยใช้ Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้ resolving gel solution ความเข้มข้น 12.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณโปรตีนต่อ well 8 ไมโครกรัม ใช้กระแสไฟฟ้า 20 มิลลิแอมแปร์ และยืนยันโดย gel filtration chromatography โดยใช้ flow rate 20 ml./hr.

3.7 การศึกษาคุณค่าทางโภชนาการ

หาองค์ประกอบกรดอะมิโนด้วยวิธี AccQ. Tag และคำนวณค่าคะแนนกรดอะมิโนของโปรตีนที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน ค่า Protein Efficiency Ratio (PER) ของโปรตีนที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันด้วยวิธีของ A.O.A.C. (1990) และค่า Protein Digestibility Corrected Amino Acid Scoring (PDCAAS) ตามวิธีของ FAO/WHO (1991)

3.8 การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่

ศึกษาสมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันดัดแปลงจากวิธีของ Kato และคณะ (1989) โดยใช้ hand homogenizer D-7801 ที่ความเร็วรอบเบอร์ 5 เป็นเวลา 30 วินาที และ สมบัติการเกิดอีมัลชันของโปรตีนที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน ดัดแปลงจากวิธีของ Pearce และ Kinsella (1978) โดยใช้ hand homogenizer D-7801 ในการวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบสมบัติทั้งสองลักษณะกับสมบัติของไข่และเคซีน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์การทดลอง

4.1 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของปลายข้าว รำข้าวจากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และรำสกัดไขมันเป็นรำข้าวที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกแล้วซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ปทุมไรซมิลล์ แอนด์ แกรนารี จำกัด (มหาชน) ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง) *

องค์ประกอบ	โปรตีน (N x 5.95) (%)	ความชื้น (%)	ไขมัน (%)	เถ้า (%)	เส้นใย (%)	แป้ง ** (%)
ปลายข้าว	7.96 ± 0.75	8.36 ± 0.02	0.50 ± 0.04	0.63 ± 0.06	0.76 ± 0.67	81.78 ± 0.42
รำข้าว	14.32 ± 1.14	9.45 ± 0.04	24.46 ± 2.42	10.75 ± 1.21	33.68 ± 0.22	7.34 ± 0.86
รำสกัดไขมัน	16.98 ± 0.07	9.67 ± 0.05	2.85 ± 0.32	9.65 ± 0.59	34.91 ± 0.75	25.94 ± 3.18

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

** คำนวณจากผลต่างของ 100 กับปริมาณองค์ประกอบอื่น

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน พบว่า ปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันมีปริมาณโปรตีน ความชื้น ไขมัน เถ้า เส้นใยและแป้ง ดังแสดงในตารางที่ 4.1 เห็นได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีของปลายข้าวมีปริมาณใกล้เคียงกับ Juliano (1972) ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ความชื้น ไขมัน เถ้า เส้นใยและแป้งได้เท่ากับ 5.6-13.3 6.0-9.0 0.2-2.7 0.1-1.3 0.3-1.9 และ 84.0-93.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนองค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวและรำสกัดไขมันมีปริมาณใกล้เคียงกับ Barber และ Barber (1980) ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ความชื้น ไขมัน เถ้า เส้นใยและแป้งในรำข้าวได้เท่ากับ 12-16 8-12 16-22 7-10 8-12 และ 28-49 เปอร์เซ็นต์ และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ความชื้น ไขมัน เถ้า เส้นใยและแป้งในรำสกัดไขมันได้เท่ากับ 15-20 6-9 5-1.5 9-12 10-15 และ 42.5-59.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รำสกัดไขมันเป็นรำข้าวที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกแล้ว รำสกัดไขมันจึงมีปริมาณไขมันต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับรำข้าวโดยมีปริมาณไขมันลดลงจากรำข้าวประมาณ 88.35 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นจากรำข้าวประมาณ 15.67 เปอร์เซ็นต์ (จากปริมาณโปรตีน

14.32 เปอร์เซ็นต์ เป็น 16.98 เปอร์เซ็นต์) เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากรำข้าวที่ใช้ศึกษาเป็นข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 แต่รำสกัดไขมันที่ได้รับความอนุเคราะห์มานั้นเป็นข้าวที่มีข้าวจากหลายพันธุ์ผสมกันอยู่ นอกจากนี้โปรตีนในรำสกัดไขมันเองจะมี side chain ที่มีหมู่ hydrophobic ซึ่งไม่ละลายน้ำแต่จะละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ ทำให้สามารถจับกับไขมันในรูปของ lipoprotein ซึ่งละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (Damodaran, 1996) ดังนั้นในการสกัดน้ำมันรำข้าวของบริษัท ปทุมไรซมิลล์ แอนด์ แกรนารี จำกัด (มหาชน) ซึ่งใช้ n-hexane (ตัวทำละลายอินทรีย์) เป็นตัวทำละลายในการสกัดเอาน้ำมันออกมานั้นจะทำให้ lipoprotein ละลายออกไปกับน้ำมันด้วย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Prakash และ Ramanatham (1995) ที่รายงานว่ารำข้าวและรำสกัดไขมันที่ได้จากข้าวพันธุ์ Gowri Sanna มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 13.5 และ 17.0 ตามลำดับ และมีปริมาณไขมัน 19.9 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้รำข้าวและรำสกัดไขมันยังมีเส้นใยสูงกว่าปลายข้าวทั้งนี้เนื่องจากรำข้าวและรำสกัดไขมันมี cellulose และ hemicellulose ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ซึ่งประกอบด้วย pericarp seed coat และ aleurone layer โดยจะถูกขัดสีออกมาระหว่างกระบวนการสีข้าว ในทางตรงกันข้ามปลายข้าวก็จะมีแป้งเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูงกว่ารำข้าวและรำสกัดไขมันเนื่องจากปลายข้าวจะมีเนื้อข้าวเป็นองค์ประกอบหลัก (Juliano, 1972) และเมื่อพิจารณารำข้าวและรำสกัดไขมันจะเห็นได้ว่ารำสกัดไขมันมีปริมาณแป้งสูงขึ้นจากรำข้าวประมาณ 71.71 เปอร์เซ็นต์ (จากปริมาณแป้ง 7.34 เปอร์เซ็นต์เป็น 25.95 เปอร์เซ็นต์) ทั้งนี้อาจเนื่องจากรำข้าวที่ใช้ในงานวิจัยผ่านการขัดสีเพียง 1 ครั้ง ในขณะที่รำสกัดไขมันเป็นรำข้าวที่ได้จากการขัดสีในกระบวนการขัดสีขั้นท้ายจากบริษัท ปทุมไรซมิลล์ แอนด์ แกรนารี จำกัด (มหาชน) แล้ว จึงทำให้มีส่วนของ (endosperm) ถูกขัดปนออกมากับรำข้าวด้วยสอดคล้องกับ McCall (1953) และ Pascual และ Primo (1955) ซึ่งรายงานว่า commercial bran จะมีแป้งปนอยู่เนื่องจากมีเนื้อข้าวปนมากับรำข้าวด้วยซึ่งมีปริมาณแป้งตั้งแต่ 10-55 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง ปริมาณแป้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการขัดสีข้าวเพิ่มขึ้น

4.2 ศึกษาผลของการให้ความร้อนปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้

จากองค์ประกอบทางเคมีของปลายข้าว (ตารางที่ 4.1) เห็นได้ว่าปลายข้าวมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 7.96 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบสูงถึง 81.78 เปอร์เซ็นต์ จากองค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวและรำสกัดไขมัน (ตารางที่ 4.1) เห็นได้ว่ารำข้าวมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 14.32 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณแป้งเท่ากับ 7.34 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณเส้นใยเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 33.68 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่รำสกัดไขมันมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 16.98

เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณแป้งเท่ากับ 7.34 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณเส้นใยเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 34.91 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณไขมันลดลง 92.46 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับ Juliano (1985) ที่รายงานว่ามี non-starch polysaccharide หลัก คือ cellulose 27-33 เปอร์เซ็นต์ และ hemicellulose 36-42 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ในชั้นของ aleurone pericarp และ seed coat Leonzio (1966) พบว่า Italian bran ที่กำจัดจมูกข้าวออกแล้วบางส่วนมี cellulose 9.64-12.80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมี xylose และ arabinose เป็นองค์ประกอบหลัก (Matsuo และ Namba, 1958) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนในรำข้าวยังจับกับ xylan และ phytate (Cheryan, 1980) ใน commercial bran มีแป้งปนอยู่เนื่องจากมี endosperm ปนมากับรำข้าวด้วย (McCall, 1953; Pascual และ Primo, 1955) ซึ่งมีปริมาณแป้งตั้งแต่ 10-55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง ปริมาณแป้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการขัดสีข้าวเพิ่มขึ้น แต่รำข้าวที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีการขัดสีเพียง 1 ครั้งจึงมีปริมาณแป้งปนมากับรำข้าวต่ำ การศึกษาการสกัดโปรตีนจากธัญชาติโดยเฉพาะธัญชาติที่มีปริมาณน้ำมันสูงจะมีการเตรียมวัตถุดิบโดยการสกัดน้ำมันออกก่อนการสกัดโปรตีนเนื่องจากไขมันจะจับกับโปรตีน ดังนั้นการสกัดน้ำมันออกจากวัตถุดิบอาจจะช่วยเพิ่มการสกัดโปรตีนออกมาเพิ่มขึ้น ดังเช่นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัดโปรตีนจากรำข้าว Gnanasambandam และ Hettiarachchy (1995) และ Prakash และ Ramanatham (1994) ซึ่งสกัดน้ำมันออกจากรำข้าวโดยใช้ n-hexane ก่อนการสกัดโปรตีน จากตารางที่ 4.1 รำข้าวมีปริมาณไขมันเท่ากับ 24.46 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสกัดน้ำมันออกตามวิธีของบริษัท ปทุมไรซมิลล์ แอนด์ แกรนารี จำกัด (มหาชน) จะเหลือปริมาณไขมันเท่ากับ 2.85 เปอร์เซ็นต์ คือ มีปริมาณไขมันลดลง 88.35 เปอร์เซ็นต์

การเลือกใช้เอนไซม์ในการสกัดโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลายข้าวจึงมีสมมติฐานที่สำคัญอยู่ 2 ประการ คือ การใช้เอนไซม์ในการย่อยองค์ประกอบอื่นที่มีในปลายข้าวออกจากโปรตีนเพื่อให้โปรตีนละลายออกมาได้ง่ายขึ้น และ การใช้เอนไซม์ในการสกัดเอาโปรตีนออกมาจากโครงสร้างของปลายข้าวช่วยให้สกัดโปรตีนออกมาเพิ่มขึ้น โดยในการศึกษาการใช้เอนไซม์ในการย่อยองค์ประกอบอื่นที่มีในปลายข้าวออกจากโปรตีนเพื่อให้โปรตีนละลายออกมาจะเลือกใช้เอนไซม์ α-amylase โดยเลือกใช้เอนไซม์ α-amylase ของบริษัท novozymes® และมีปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ การเตรียมวัตถุดิบ (การให้ความร้อนกับปลายข้าวที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับการไม่ได้ให้ความร้อนกับปลายข้าวที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และเวลา การใช้เอนไซม์ในการย่อยเอาโปรตีนออกมาจากโครงสร้างของปลายข้าวจะเลือกใช้เอนไซม์ protease โดยเลือกใช้เอนไซม์ protease ของบริษัท novozymes® เอนไซม์ที่ใช้ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท อีสต์เอเชียติ๊ก จำกัด และมีปัจจัยที่

ศึกษา ได้แก่ การเตรียมวัตถุดิบ (การให้ความร้อนกับปลายข้าวที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับการไม่ได้ให้ความร้อนกับปลายข้าวที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส) ปริมาณเอนไซม์ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และเวลา

การใช้เอนไซม์ในการสกัดเอาโปรตีนออกมาจากโครงสร้างของรำข้าวและรำสกัดไขมันช่วยให้สกัดโปรตีนออกมาเพิ่มขึ้น โดยในการศึกษาการใช้เอนไซม์ในการย่อยองค์ประกอบอื่นที่มีในรำข้าวและรำสกัดไขมันออกจากโปรตีนเพื่อให้โปรตีนละลายออกมาจะเลือกใช้เอนไซม์ α-amylase เช่นเดียวกับการสกัดโปรตีนจากปลายข้าว cellulase ซึ่งเป็น cellulase ของบริษัท novozymes® และ mixed enzymes (arabanase, cellulase, hemicellulase, β-glucanase และ xylanase) ซึ่งเป็น mixed enzymes ของบริษัท novozymes® มีปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ การเตรียมวัตถุดิบ ปริมาณเอนไซม์ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และเวลา การใช้เอนไซม์ในการย่อยเอาโปรตีนออกมาจากโครงสร้างของรำข้าวและรำสกัดไขมันจะเลือกใช้เอนไซม์ protease ภาวะที่ศึกษาเช่นเดียวกับการสกัดโปรตีนจากปลายข้าว

จากผลการวิเคราะห์อุณหภูมิโดยใช้ Brabender Viscoamylograph พบว่าอุณหภูมิที่ทำให้แป้งในปลายข้าวเกิด gelatinization คือ 95 องศาเซลเซียส (ภาคผนวก จ.)

ศึกษาผลของ heat treatment ของปลายข้าวต่อการสกัดโปรตีนโดยให้ความร้อนกับปลายข้าวแล้วที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส pH 6 เป็นเวลา 30 นาที แล้วใช้ α-amylase ความเข้มข้น 0.15 %v/w ตามวิธีของ Shih และคณะ (1997) ย่อยปลายข้าวโดยบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และใช้ protease ปริมาณ 30 LAPU/g เลือกปริมาณเอนไซม์นี้ในการศึกษาเนื่องจากเป็นปริมาณที่อยู่ระหว่างปริมาณที่แนะนำไว้ (Anon,1991) ซึ่งระบุปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการย่อยซับสเตรตไว้เท่ากับ 10-50 LAPU/g (Leucine Aminopeptidase Unit/g) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 6 เป็นเวลา 60 นาที ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส แสดงดังตารางที่ 4.2 จากการวิเคราะห์ทางสถิติ จะเห็นได้ว่าการให้ความร้อนกับปลายข้าวก่อนการใช้เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดย่อย ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสสูงกว่าการไม่ได้ให้ความร้อนกับปลายข้าว (ตารางที่ 4.2) ทั้งนี้เนื่องจากการให้ความร้อนกับปลายข้าวทำให้แป้งส่วนผลึก (crystal) เปลี่ยนเป็น อสัณฐาน (amorphous) เพิ่มขึ้น (Juliano, 1972) จึงทำให้เอนไซม์สามารถเข้าถึงซับสเตรต (แป้ง) ได้มากขึ้นและย่อยซับสเตรตได้มากขึ้น ผลที่ได้สอดคล้องกับ Shih และคณะ (1997) ซึ่งเตรียมแป้งที่มีความเข้มข้น 20 %w/v และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ไปพร้อมกับการเติมเอนไซม์ α-amylase (Solvay Enzymes®) พบว่าการทำให้ความร้อนกับปลายข้าวช่วยให้เอนไซม์ย่อยแป้งได้ดีขึ้น

ตารางที่ 4.2 ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส เมื่อใช้ α-amylase และ protease ย่อยปลายข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสและไม่ได้ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส

การเตรียมวัตถุดิบ	ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส (มิลลิกรัม/กรัมปลายข้าว)	
	α-amylase	protease
no heat treatment	$0.85^{b} \pm 0.19$	$0.21^{b} \pm 0.13$
heat treatment	$5.18^{a} \pm 0.66$	$2.91^{a} \pm 0.27$

a,b,....อักษรต่างกันในแนวตั้งของข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

โดยทำให้ได้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสสูง และเมื่อพิจารณาผลของชนิดเอนไซม์ จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ α-amylase ให้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส (5.18 มิลลิกรัมต่อปลายข้าว 1 กรัม) สูงกว่าเอนไซม์ protease (2.91 มิลลิกรัมต่อปลายข้าว 1 กรัม) ซึ่งสอดคล้องกับสมมติฐานว่าการใช้ amylase ย่อยแป้งจากปลายข้าว จะช่วยย่อยเม็ดแป้งออกจากโปรตีนทำให้ protein body ละลายออกมาได้มากขึ้น (รูปที่ 2.1) และเมื่อให้ความร้อนกับปลายข้าวก็จะช่วยให้เอนไซม์เข้าถึงซับสเตรตได้ง่ายขึ้น ทำให้เอนไซม์ย่อยแป้งได้ดีขึ้น การใช้ protease ในการสกัดโปรตีนจากปลายข้าวให้ปริมาณโปรตีนต่ำกว่าการใช้ α-amylase เนื่องจากในโครงสร้างของปลายข้าวมีองค์ประกอบอื่นนอกจากแป้ง เช่น เส้นใย เป็นต้น องค์ประกอบเหล่านี้จะขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ protease เหตุที่เลือกอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสในการศึกษาผลของการให้ความร้อนกับปลายข้าวก่อนการใช้เอนไซม์ย่อยแป้งเนื่องจากที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะมีประสิทธิภาพในการทำงานมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (Anon, 1991) อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ α-amylase แสดงดังรูปที่ 1 ช (ภาคผนวก ช.) จากงานวิจัยของ Shih และ Daigle (1997) เห็นได้ว่าแป้งข้าวเจ้า (rice starch) จะเกิด gelatinization ที่อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส แต่จากการศึกษาอุณหภูมิที่ทำให้ปลายข้าวเกิด gelatinization โดยใช้ Brabender Viscoamylograph จะได้ gelatinization temperature เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส และในการทำให้ปลายข้าวเกิด gelatinization จะใช้เวลาในการทำให้ปลายข้าวเกิด gelatinization เป็นเวลา 30 นาที ตามวิธีของ Brook และ Griffin (1987) ดังนั้น งานวิจัยขั้นต่อไปจึงให้ความร้อนกับปลายข้าวก่อนใช้เอนไซม์ย่อยเพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาต่อการทำงานของเอนไซม์ α-amylase ต่อไป

เมื่อใช้ α-amylase ความเข้มข้น 0.15 %v/w บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส cellulase ความเข้มข้น 0.10 %v/w ที่ pH 5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส mixed enzymes ความเข้มข้น 0.10 %v/w ที่ pH 3.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ protease ปริมาณ 30 LAPU/g บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 6 โดยบ่มรำข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสและไม่ได้ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส แสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส เมื่อใช้เอนไซม์ต่าง ๆ ย่อยรำข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสและไม่ได้ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส

การเตรียมวัตถุดิบ	ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส (มิลลิกรัม/กรัมรำข้าว)			
	α-amylase[ns]	cellulase[ns]	mixed enzymes[ns]	protease[ns]
no heat treatment	20.73 ± 1.73	28.03 ± 1.09	59.39 ± 1.58	4.97 ± 0.19
heat treatment	21.22 ± 1.00	28.28 ± 1.28	59.07 ± 1.48	5.58 ± 0.85

ns หมายถึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

เมื่อบ่มรำสกัดไขมันที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสและไม่ได้ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ด้วย α-amylase ความเข้มข้น 0.15 %v/w บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส cellulase ความเข้มข้น 0.10 %v/w ที่ pH 5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส mixed enzymes ความเข้มข้น 0.10 %v/w ที่ pH 3.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ protease ปริมาณ 30 LAPU/g บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 6 เป็นเวลา 60 นาที ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส แสดงดังตารางที่ 4.4 จากการวิเคราะห์ทางสถิติ จะเห็นได้ว่าการให้ความร้อนกับรำข้าวและรำสกัดไขมันก่อนการใช้เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ย่อย ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสไม่แตกต่างจากการไม่ได้ให้ความร้อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 4.4) การให้ความร้อนกับรำข้าวและรำสกัดไขมันไม่ได้ช่วยให้ได้โปรตีนในส่วนน้ำใสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากรำข้าวมีแป้งเป็นองค์ประกอบเพียง 7.34 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1) จึงมีปริมาณแป้งที่เกิดเจลได้ต่ำ เอนไซม์ α-amylase จึงมีผลในการย่อยแป้งส่วน amorphous ได้ต่ำ ในขณะที่การใช้ α-amylase ย่อยรำสกัดไขมันที่ให้ความร้อนให้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสไม่แตกต่างจากรำสกัดไขมันที่ไม่ได้ให้ความร้อนเนื่องจากโปรตีนในรำสกัดไขมันจับกับ xylan และ phytate (Cheryan,1980) และจับกับ cellulose hemicellulose และ β-glucan

ตารางที่ 4.4 ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส เมื่อใช้เอนไซม์ต่าง ๆ ย่อยรำสกัดไขมันที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสและไม่ได้ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส

การเตรียมวัตถุดิบ	ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส (มิลลิกรัม/กรัมรำสกัดไขมัน)			
	α-amylase^{ns}	cellulase^{ns}	mixed enzymes^{ns}	protease^{ns}
no heat treatment	18.29 $\pm$ 1.86	24.93 $\pm$ 2.39	31.70 $\pm$ 1.12	5.06 $\pm$ 1.18
heat treatment	20.96 $\pm$ 2.50	25.16 $\pm$ 1.91	31.71 $\pm$ 2.25	4.90 $\pm$ 0.79

ns หมายถึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

มากกว่าจับกับแป้ง (Barber และ Barber, 1980) และเมื่อพิจารณาผลของชนิดเอนไซม์ จะเห็นได้ว่า mixed enzymes ให้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส (59.39 มิลลิกรัมต่อรำข้าว 1 กรัม และ 31.70 มิลลิกรัมต่อรำสกัดไขมัน 1 กรัม) สูงกว่าเอนไซม์ α-amylase cellulase และ protease ทั้งนี้เนื่องจาก mixed enzymes มีเอนไซม์ arabanase, cellulase, hemicellulase, β-glucanase และ xylanase เป็นองค์ประกอบ (Anon, 1991) จึงมีประสิทธิภาพในการย่อยองค์ประกอบต่าง ๆ ได้แก่ cellulose hemicellulose xylan และ β-glucan ของรำข้าวได้ดีกว่า cellulase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สกัดจาก *Trichoderma reesei* ที่ย่อย cellulose เป็นหลัก (Boyce, 1986) เนื่องจากโปรตีนในรำข้าวและรำสกัดไขมันอยู่บริเวณรอบ cellulose hemicellulose xylan และ β-glucan ซึ่งอยู่ในส่วนของ seed coat pericarp และ aleurone layer ดังนั้น การใช้ cellulase เพียงชนิดเดียวย่อยรำข้าวจึงมีผลในการสกัดต่ำ ผลที่ได้สอดคล้องกับ Tang และ Hettiarachchy (2002) โดยพบว่า mixed enzymes (arabanase, cellulase, hemicellulase, β-glucanase และ xylanase) (novozymes®) สกัดโปรตีนจากรำข้าวได้ดีกว่า cellulase (novozymes®) ส่วนการใช้ protease ย่อยรำข้าวและรำสกัดไขมันแล้วได้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสต่ำที่สุด เนื่องจากโปรตีนรำข้าวและรำสกัดไขมันจะจับกันด้วยพันธะ disulfide และ crosslink กันอยู่จึงทำให้เอนไซม์ protease เข้าไปย่อยซับสเตรตได้ยาก อาจต้องใช้ disulfide bond breaking agent เพื่อช่วยสกัด ดังนั้น งานวิจัยขั้นต่อไปจึงไม่ต้องให้ความร้อนกับรำข้าวก่อนใช้เอนไซม์ย่อยซึ่งสอดคล้องกับ Shih และคณะ (1999) และ Ansharullah, Hourigan และ Chesterman (1997) ซึ่งใช้รำข้าวดิบเป็นวัตถุดิบในการสกัดโปรตีนโดยใช้เอนไซม์ ดังนั้น ใช้รำข้าวดิบเพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิ pH และเวลาต่อการทำงานของเอนไซม์ mixed enzymes ต่อไปสอดคล้องกับ Tang และ Hettiarachchy

(2002) พบว่า mixed enzymes ของ arabanase cellulase hemicellulase β-glucanase และ xylanase สกัดโปรตีนได้ดีกว่า cellulase

4.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากปลายข้าวโดยใช้ α-amylase

4.3.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากปลายข้าวโดยใช้ α-amylase ความเข้มข้น 0.15 %v/w ย่อยปลายข้าวที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เมื่อย่อยปลายข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส pH 6.5 เป็นเวลา 30 นาที ด้วย α-amylase ความเข้มข้น 0.15 %v/w ที่ pH 6.5 เป็นเวลา 60 นาที ตามวิธีของ Shih และคณะ (1997) โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิต่าง ๆ ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใส โปรตีนในตะกอน แสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อย่อยปลายข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนแล้ว บ่มด้วย α-amylase ความเข้มข้น 0.15 %v/w ที่ pH 6.5 เป็นเวลา 60 นาที อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (°C)	น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/กรัมปลายข้าว)	โปรตีนในส่วนน้ำใส (มิลลิกรัม/กรัมปลายข้าว)	โปรตีนในตะกอน (มิลลิกรัม/กรัมปลายข้าว)
60	$757.00^{c} \pm 45.00$	$3.30^{c} \pm 0.08$	$76.03^{b} \pm 0.21$
70	$1786.73^{a} \pm 10.40$	$5.22^{a} \pm 0.06$	$74.23^{d} \pm 0.13$
80	$1351.51^{b} \pm 13.00$	$4.79^{b} \pm 0.08$	$74.65^{c} \pm 0.21$

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

จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า อุณหภูมิมีอิทธิพลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใส และโปรตีนในตะกอนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.5) โดยที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีนในส่วนน้ำใสสูงที่สุด (1786.73 และ 5.22 มิลลิกรัมต่อปลายข้าว 1 กรัม ตามลำดับ) รองลงมา คือ 80 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ) การสกัดโปรตีนจากปลายข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีแล้วบ่มด้วยเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสให้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสสูงที่สุดเนื่องจากที่อุณหภูมินี้เอนไซม์มีการทำงานสูงที่สุด (Anon, 1991) (รูปการทำงานของเอนไซม์แสดงดังภาคผนวก ช.) active site ของเอนไซม์สามารถจับกับซับสเตรตได้ดี ทำให้เกิด

ผลิตภัณฑ์ได้มาก จากตารางที่ 4.5 จะเห็นได้ว่าเมื่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสก็จะสูงขึ้นซึ่งสอดคล้องกับสมมติฐานว่าการใช้ amylase ย่อยแป้ง เมื่อแป้งถูกเอนไซม์ย่อยทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูง และทำให้ protein body ละลายออกมาได้มากขึ้น เนื่องจากโครงสร้างของปลายข้าวมีเนื้อข้าวโดยมีเม็ดแป้งเกาะติดกับโปรตีนที่มีลักษณะเป็น protein body (รูปที่ 4.1) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Shih และคณะ (1999) ซึ่งใช้ α-amylase ย่อยปลายข้าวบดพบว่าได้ปริมาณโปรตีนและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนน้ำใสสูง แต่ได้ปริมาณโปรตีนในส่วนตะกอนต่ำลง Brook และ Griffin (1987) ใช้แป้งข้าวความเข้มข้น 5 %w/v และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และใช้ α-amylase ย่อยแป้งที่ผ่านการให้ความร้อนแล้วบ่มด้วยเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่อุณหภูมิอื่น จากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเพื่อศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อไป

4.3.2 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากปลายข้าวโดยใช้ α-amylase ย่อยปลายข้าว ที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

เมื่อย่อยปลายข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ด้วย α-amylase ความเข้มข้น 0.15 %v/w ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส pH 6.5 ที่เวลาต่าง ๆ ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใส และโปรตีนในตะกอน แสดงดังตารางที่ 4.6 จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าเวลาในการสกัดโปรตีนมีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใส และตะกอน ($p \leq 0.05$) โดยเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสก็จะสูงขึ้นด้วย ในขณะที่โปรตีนในตะกอนจะต่ำลง ($p \leq 0.05$) และที่เวลา 120 นาที จะได้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส (5.73 มิลลิกรัมต่อปลายข้าว 1 กรัม) ไม่แตกต่างจากที่เวลา 180 240 และ 300 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องจากเกิดการอิ่มตัวของซับสเตรต คือ เมื่อใช้เอนไซม์ย่อยซับสเตรตที่เวลาเพิ่มขึ้นในขณะที่ซับสเตรตมีปริมาณคงที่ จึงไม่มีซับสเตรตที่ให้เอนไซม์ย่อยได้หรืออาจเกิดจากเอนไซม์ไปจับกับผลิตภัณฑ์ที่ได้แทนที่จะจับกับซับสเตรต จึงไม่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น (Whitaker, 1994) ดังนั้นเลือกเวลาที่เหมาะสม คือ 120 นาที สำหรับการทดลองในขั้นต่อไปเนื่องจากไม่สิ้นเปลืองเวลาและพลังงาน

ตารางที่ 4.6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อย่อยปลายข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนแล้วบ่มด้วย α-amylase ความเข้มข้น 0.15 %v/w ที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่าง ๆ

เวลา (นาที)	น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/กรัมปลายข้าว)	โปรตีนในส่วนน้ำใส (มิลลิกรัม/กรัมปลายข้าว)	โปรตีนในตะกอน (มิลลิกรัม/กรัมปลายข้าว)
0	$5.24^{c} \pm 0.77$	$0.06^{c} \pm 0.00$	$79.60^{a} \pm 0.28$
60	$1789.00^{b} \pm 11.00$	$5.19^{b} \pm 0.02$	$74.20^{b} \pm 0.14$
120	$1798.00^{ab} \pm 32.90$	$5.73^{ab} \pm 0.6$	$73.60^{bc} \pm 0.78$
180	$1813.80^{ab} \pm 27.30$	$6.13^{a} \pm 0.31$	$73.30^{c} \pm 0.39$
240	$1822.80^{ab} \pm 26.30$	$6.16^{a} \pm 0.20$	$73.10^{c} \pm 0.12$
300	$1843.50^{a} \pm 41.60$	$6.07^{a} \pm 0.32$	$73.10^{c} \pm 0.18$

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

4.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมัน

4.4.1 ศึกษาปริมาณเอนไซม์ mixed enzymes ที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมัน

จากการผลการทดลองข้อ 4.3 เมื่อใช้ mixed enzymes ปริมาณต่าง ๆ ย่อยรำข้าวและรำสกัดไขมันดิบ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 3.8 เป็นเวลา 60 นาที ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและตะกอน แสดงดังตารางที่ 4.7 และ 4.8 จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าปริมาณเอนไซม์มีอิทธิพลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอน ($p \leq 0.05$) โดยเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสก็จะสูงขึ้นด้วย ($p \leq 0.05$) ในขณะที่ปริมาณโปรตีนในตะกอนต่ำลง โดยปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 0.10 %v/w ให้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส (31.92 มิลลิกรัมต่อรำสกัดไขมัน 1 กรัม) ไม่แตกต่างจากที่ปริมาณ 2 6 8 8.7 9.4 และ 10 %v/w ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณเอนไซม์ที่แนะนำไว้ คือ 0.05-0.10 %v/w (Anon, 1991) เนื่องจากเกิดการอิ่มตัวของซับสเตรตหรือเกิด product inhibition คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้มีมากเกินพอแล้ว ดังนั้นเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์จึงไม่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น (Whitaker, 1994) จากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกปริมาณเอนไซม์นี้เพื่อศึกษาภาวะเหมาะสมในขั้นต่อไป เนื่องจากไม่สิ้นเปลืองเอนไซม์

ตารางที่ 4.7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อใช้ mixed enzymes ปริมาณเอนไซม์ต่าง ๆ ย่อยรำข้าวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 3.8 เป็นเวลา 60 นาที

เอนไซม์ (%v/w)	น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/กรัมรำข้าว)	โปรตีนในส่วนน้ำใส (มิลลิกรัม/กรัมรำข้าว)	โปรตีนในตะกอน (มิลลิกรัม/กรัมรำข้าว)
0.00	$0.44^{c} \pm 0.08$	$0.00^{c} \pm 0.00$	$143.13^{a} \pm 0.11$
0.05	$48.20^{b} \pm 7.64$	$23.15^{b} \pm 2.62$	$119.99^{b} \pm 0.14$
0.10	$121.32^{a} \pm 0.53$	$58.39^{a} \pm 0.55$	$84.80^{d} \pm 0.28$
2.00	$121.24^{a} \pm 2.51$	$57.80^{a} \pm 0.28$	$85.23^{c} \pm 0.24$
6.00	$120.98^{a} \pm 4.36$	$58.03^{a} \pm 0.10$	$85.25^{c} \pm 0.07$
8.00	$121.35^{a} \pm 3.89$	$58.55^{a} \pm 0.64$	$84.51^{de} \pm 0.22$
8.70	$121.82^{a} \pm 0.31$	$58.59^{a} \pm 0.76$	$84.68^{d} \pm 0.08$
9.40	$121.53^{a} \pm 7.46$	$58.81^{a} \pm 1.29$	$84.36^{e} \pm 0.06$
10.00	$121.84^{a} \pm 1.75$	$59.25^{a} \pm 0.78$	$83.93^{f} \pm 0.08$

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

4.4.2 ศึกษาอุณหภูมิและ pHที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมันโดยใช้ mixed enzymes ความเข้มข้น 0.10 %v/w ที่ภาวะการสกัดต่าง ๆ

จากการผลการทดลองข้อ 4.4.1 เมื่อใช้ mixed enzymes ความเข้มข้น 0.10 %v/w ย่อยรำข้าวที่ภาวะการสกัดต่าง ๆ เป็นเวลา 60 นาที ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและตะกอน แสดงดังตารางที่ 4.9 จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบอิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่าง (pH) มีผลต่อปริมาณโปรตีนและน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนน้ำใส และปริมาณโปรตีนในตะกอน ($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาที่ระดับอุณหภูมิเดียวกัน ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนน้ำใสลดลง ในขณะที่ปริมาณโปรตีนในตะกอนสูงขึ้น เมื่อ pH สูงขึ้น ($p \leq 0.05$) ช่วง pH ที่ศึกษาอยู่ในช่วง optimum pH ของเอนไซม์ คือ pH ตั้งแต่ 3.3-5.5 (Anon, 1991) เหตุที่เมื่อ pH สูงขึ้นทำให้ได้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสต่ำลงอาจเนื่องจากเมื่อ pH เปลี่ยนแปลงจาก 3.8 เป็น 5.4 ทำให้ prototropic group ในบริเวณเร่งของเอนไซม์จับกับ

ตารางที่ 4.8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อใช้ mixed enzymes ปริมาณเอนไซม์ต่าง ๆ ย่อยรำสกัดไขมัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 3.8 เป็นเวลา 60 นาที

เอนไซม์ (%v/w)	น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/กรัมรำสกัดไขมัน)	โปรตีนในส่วนน้ำใส (มิลลิกรัม/กรัมรำสกัดไขมัน)	โปรตีนในตะกอน (มิลลิกรัม/กรัมรำสกัดไขมัน)
0.00	$0.81^{c} \pm 0.13$	$0.01^{c} \pm 0.00$	$169.13^{a} \pm 0.95$
0.05	$50.11^{b} \pm 1.34$	$17.15^{b} \pm 0.49$	$152.90^{b} \pm 0.42$
0.10	$90.45^{a} \pm 1.63$	$31.49^{a} \pm 0.73$	$137.25^{c} \pm 4.31$
2.00	$90.98^{a} \pm 0.54$	$31.85^{a} \pm 0.23$	$138.82^{c} \pm 0.31$
6.00	$90.82^{a} \pm 3.94$	$31.61^{a} \pm 4.88$	$138.17^{c} \pm 3.02$
8.00	$90.17^{a} \pm 5.84$	$31.76^{a} \pm 3.25$	$138.90^{c} \pm 1.84$
8.70	$91.20^{a} \pm 1.56$	$30.10^{a} \pm 3.82$	$138.65^{c} \pm 2.33$
9.40	$90.90^{a} \pm 4.66$	$30.55^{a} \pm 4.60$	$138.15^{c} \pm 2.90$
10.00	$90.73^{a} \pm 1.88$	$30.68^{a} \pm 1.02$	$138.25^{c} \pm 0.50$

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

ซับสเตรตได้น้อยลงจึงเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรตได้น้อยลงทำให้เอนไซม์ทำงานได้ไม่เต็มที่ส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์น้อยกว่าที่ pH ต่ำ (Whitaker, 1994) จึงทำให้ได้ปริมาณโปรตีนต่ำ และเมื่อพิจารณาที่ระดับ pH เดียวกัน ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงแล้วเพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณโปรตีนในตะกอนสูงขึ้นแล้วลดลง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โดยเอนไซม์นี้มีการทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-55 องศาเซลเซียส ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 30 เป็น 50 องศาเซลเซียสจึงมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โดยเอนไซม์ β-glucanase ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักใน mixed enzymes จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบอิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่าง (pH) มีผลต่อปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสและในตะกอน($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาที่ระดับอุณหภูมิเดียวกัน ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนน้ำใสลดลง ในขณะที่ปริมาณโปรตีนในตะกอนสูงขึ้น เมื่อ pH สูงขึ้น ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อ pH เปลี่ยนแปลงจาก 3.8 เป็น 5.4 ซึ่งอยู่ในช่วง opimum

ตารางที่ 4.9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อย่อยรำข้าวด้วย mixed enzymes ความเข้มข้น 0.10 %v/w ที่ภาวะการสกัดต่าง ๆ เป็นเวลา 60 นาที

อุณหภูมิ (°C)	pH	น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/กรัมรำข้าว)	โปรตีนในส่วนน้ำใส (มิลลิกรัม/กรัมรำข้าว)	โปรตีนในตะกอน (มิลลิกรัม/กรัมรำข้าว)
30	3.8	71.50^{b} ± 1.34	53.40^{b} ± 4.85	89.80^{g} ± 0.01
	4.6	73.80^{b} ± 1.86	41.80^{c} ± 0.25	101.35^{f} ± 0.64
	5.4	37.40^{c} ± 0.82	42.60^{c} ± 0.51	100.90^{f} ± 0.14
40	3.8	10.10^{e} ± 1.23	22.30^{d} ± 0.97	120.80^{e} ± 0.28
	4.6	12.00^{e} ± 0.78	15.10^{e} ± 1.27	127.75^{d} ± 1.06
	5.4	3.78^{f} ± 0.46	6.83^{g} ± 0.25	136.85^{a} ± 1.63
50	3.8	120.87^{a} ± 0.16	58.70^{a} ± 1.84	84.60^{h} ± 0.57
	4.6	25.40^{d} ± 0.86	11.80^{ef} ± 0.25	131.50^{c} ± 1.27
	5.4	11.20^{e} ± 1.06	9.96^{fg} ± 0.06	165.25^{b} ± 0.09

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

pH ของ mixed enzyme pH ที่เพิ่มขึ้นทำให้ prototropic group ในบริเวณเร่งของเอนไซม์และซับสเตรตเปลี่ยนแปลง เกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรตได้น้อยลง ทำให้เอนไซม์ทำงานไม่ดี เอนไซม์มีการทำงานสูงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Anon, 1991) ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสสูง (58.70 มิลลิกรัมต่อรำข้าว 1 กรัม) ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ansharullah, Hourigan และ Chesterman (1997) ใช้ mixed enzymes เข้มข้น 10 %v/w ย่อยรำข้าวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 3.8 ได้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสเท่ากับ 57.89 มิลลิกรัมต่อรำข้าว 1 กรัม จากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสและ pH 3.8 เพื่อศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อไป

จากการผลการทดลองข้อ 4.4.1 เมื่อใช้ mixed enzymes ความเข้มข้น 0.10 %v/w ย่อยรำสกัดไขมันที่ภาวะการสกัดต่าง ๆ เป็นเวลา 60 นาที ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและตะกอน แสดงดังตารางที่ 4.10 จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบอิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่าง (pH) มีผลต่อปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส

ตารางที่ 4.10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อใช้ mixed enzymes ปริมาณ 0.10% v/w ย่อยรำสกัดไขมันที่ภาวะการสกัดต่าง ๆ

อุณหภูมิ (°C)	pH	น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/กรัมรำสกัดไขมัน)	โปรตีนในส่วนน้ำใส (มิลลิกรัม/กรัมรำสกัดไขมัน)	โปรตีนในตะกอน (มิลลิกรัม/กรัมรำสกัดไขมัน)
30	3.8	$22.86^{d} \pm 0.51$	$5.00^{d} \pm 0.21$	$164.85^{b} \pm 0.21$
	4.6	$7.89^{e} \pm 1.56$	$2.97^{ef} \pm 0.18$	$165.85^{ab} \pm 1.20$
	5.4	$3.72^{e} \pm 0.00$	$2.31^{f} \pm 0.03$	$167.70^{ab} \pm 0.42$
40	3.8	$39.00^{b} \pm 11.07$	$16.29^{b} \pm 0.00$	$153.45^{c} \pm 0.78$
	4.6	$32.40^{bc} \pm 3.30$	$3.90^{de} \pm 0.30$	$165.55^{ab} \pm 1.91$
	5.4	$28.26^{cd} \pm 1.80$	$2.25^{f} \pm 0.21$	$167.95^{a} \pm 0.07$
50	3.8	$90.40^{a} \pm 1.13$	$31.80^{a} \pm 1.68$	$138.05^{d} \pm 1.34$
	4.6	$5.73^{e} \pm 0.39$	$13.11^{c} \pm 0.54$	$155.65^{c} \pm 1.91$
	5.4	$2.52^{e} \pm 0.00$	$4.83^{d} \pm 0.39$	$165.25^{ab} \pm 0.09$

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

และในตะกอน ($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาที่ระดับอุณหภูมิเดียวกัน ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนน้ำใสลดลง ในขณะที่ปริมาณโปรตีนในตะกอนสูงขึ้น เมื่อ pH สูงขึ้น (Whitaker, 1994) จึงทำให้ได้ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนน้ำใสลดลง ในขณะที่ปริมาณโปรตีนในตะกอนสูงขึ้น และเมื่อพิจารณาที่ระดับ pH เดียวกัน ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนน้ำใสสูงขึ้น ในขณะที่ปริมาณโปรตีนในตะกอนลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น($p \leq 0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของ ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลงจาก 30 เป็น 50 องศาเซลเซียส จึงมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โดยเอนไซม์และซับสเตรตชนกันมากขึ้นจะทำให้ side chain ของกรดอะมิโนที่อยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์อยู่ในรูปที่เหมาะสมและจับกับซับสเตรตได้มากขึ้น ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์มากขึ้น เมื่อวิเคราะห์จากปัจจัยร่วม พบว่าอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 3.8 ให้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุด (31.80 มิลลิกรัมต่อรำสกัดไขมัน 1 กรัม) ซึ่งอยู่ในช่วงอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ 25-55 องศาเซลเซียส มีเอนไซม์ β-glucanase ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักใน mixed enzymes ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส optimum pH เท่ากับ 3.3-5.5 (Anon, 1991) ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tang และ Hettiarachchy

(2002) ได้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสเท่ากับ 13-25 มิลลิกรัมต่อรำสกัดไขมัน 1 กรัม จากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 3.8 เพื่อศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อไป

4.4.3 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมันโดยใช้ mixed enzymes ความเข้มข้น 0.10 %v/w ที่ pH 3.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองข้อ 4.4.2 เมื่อใช้ mixed enzymes ปริมาณ 0.10 %v/w ย่อยรำข้าว ที่ pH 3.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่าง ๆ ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีนในส่วนน้ำใส และปริมาณโปรตีนในตะกอน แสดงดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อใช้ mixed enzymes ความเข้มข้น 0.10 %v/w ย่อยรำข้าว ที่ pH 3.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่าง ๆ

เวลา (นาที)	น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/กรัมรำข้าว)	โปรตีนในส่วนน้ำใส (มิลลิกรัม/กรัมรำข้าว)	โปรตีนในตะกอน (มิลลิกรัม/กรัมรำข้าว)
0	$5.97^{c} \pm 0.45$	$0.40^{c} \pm 0.05$	$142.29^{a} \pm 0.19$
60	$120.93^{b} \pm 0.43$	$58.60^{b} \pm 0.14$	$84.50^{b} \pm 0.10$
120	$129.42^{a} \pm 0.48$	$60.90^{a} \pm 0.14$	$82.60^{c} \pm 0.08$
180	$130.69^{a} \pm 0.43$	$60.90^{a} \pm 0.30$	$81.80^{c} \pm 0.08$
240	$129.50^{a} \pm 0.97$	$60.80^{a} \pm 0.12$	$82.10^{c} \pm 0.31$
300	$130.37^{a} \pm 0.52$	$60.90^{a} \pm 0.20$	$82.40^{c} \pm 0.14$

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

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า เวลาในการสกัดโปรตีนมีอิทธิพลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใส และตะกอน ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.11) โดยเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสก็จะสูงขึ้นด้วย ในขณะที่โปรตีนในตะกอนจะต่ำลง ($p \leq 0.05$) และที่เวลา 120 นาที จะได้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส (60.90 มิลลิกรัมต่อรำข้าว 1 กรัม) ไม่แตกต่างจากที่เวลา 180 240 และ 300 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

การสกัดโปรตีนจากรำข้าวโดยใช้ mixed enzymes ความเข้มข้น 0.10 %v/w ย่อยรำข้าวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 3.8 ที่เวลาเพิ่มขึ้นไม่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นอาจเนื่องจากบริเวณเร่งของเอนไซม์จับกับซับสเตรตอย่างอิ่มตัวแล้ว ถึงแม้จะเพิ่มเวลาในการสกัดก็ไม่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สูงขึ้น (Whitaker, 1994) ดังนั้นเลือกเวลาที่เหมาะสม คือ 120 นาที เพื่อศึกษาขั้นต่อไป

จากผลการทดลองข้อ 4.4.3 เมื่อใช้ mixed enzymes ความเข้มข้น 0.10 %v/w ย่อยรำสกัดไขมัน ที่ pH 3.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่าง ๆ ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลริดิวซ์และโปรตีนในส่วนน้ำใส และปริมาณโปรตีนในตะกอน แสดงดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อใช้ mixed enzymes ปริมาณ 0.10% v/w ย่อยรำสกัดไขมัน ที่ pH 3.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่าง ๆ

เวลา (นาที)	น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/กรัมรำสกัดไขมัน)	โปรตีนในส่วนน้ำใส (มิลลิกรัม/กรัมรำสกัดไขมัน)	โปรตีนในตะกอน (มิลลิกรัม/กรัมรำสกัดไขมัน)
0	$6.50^{b} \pm 0.50$	$0.39^{b} \pm 0.06$	$169.24^{a} \pm 0.30$
60	$89.80^{a} \pm 1.71$	$31.70^{a} \pm 0.49$	$138.12^{b} \pm 0.07$
120	$89.70^{a} \pm 1.71$	$31.50^{a} \pm 0.84$	$138.43^{b} \pm 0.23$
180	$89.80^{a} \pm 1.74$	$30.50^{a} \pm 2.36$	$138.62^{b} \pm 0.60$
240	$90.60^{a} \pm 0.38$	$31.50^{a} \pm 0.84$	$138.19^{b} \pm 0.12$
300	$89.60^{a} \pm 1.58$	$31.60^{a} \pm 0.55$	$138.16^{b} \pm 0.15$

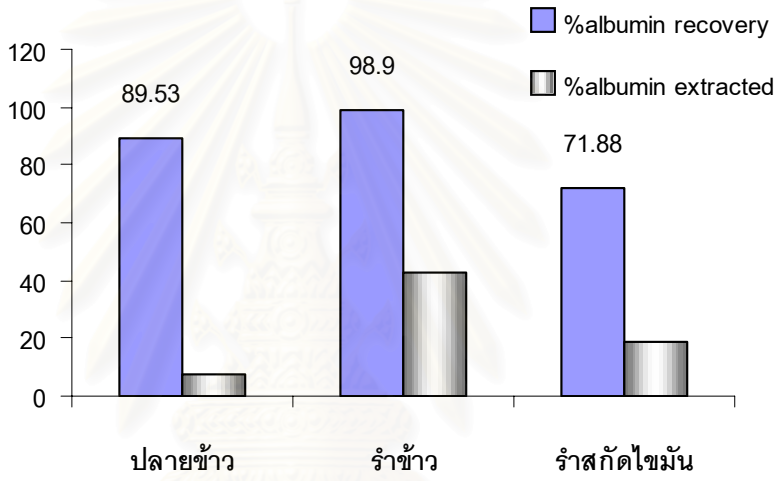
a, b, c,...ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันของข้อมูลในแนวตั้งเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าเวลาในการสกัดโปรตีนมีอิทธิพลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใส และตะกอน ($p \leq 0.05$) โดยเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสก็จะสูงขึ้นด้วย ในขณะที่โปรตีนในตะกอนจะต่ำลง ($p \leq 0.05$) และที่เวลา 60 นาที จะได้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส (31.70 มิลลิกรัมต่อรำสกัดไขมัน 1 กรัม) ไม่แตกต่างจากที่เวลา 120 180 240 และ 300 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) อาจเกิดจากเกิด product inhibitionหรือเกิดการอิ่มตัวของซับสเตรต (Whitaker, 1994) ดังนั้นเลือกเวลาที่เหมาะสม คือ 60 นาที เนื่องจากไม่สิ้นเปลืองเวลาและพลังงาน

4.5 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลายข้าวที่ใช้ α-amylase รำข้าว และรำสกัดไขมันที่ใช้ mixed emzymes

เมื่อพิตารณาปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส %albumin extracted % albumin recovery รวมทั้งต้นทุนในการผลิตโปรตีนที่ละลายน้ำจากการย่อยปลายข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนแล้วด้วย α-amylase และรำข้าวและรำสกัดไขมันที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนด้วย mixed emzymes ของ arabanase cellulase hemicellulase β-glucanase และ xylanase แสดงดังตารางที่ 4.13 และรูปที่ 4.1

% albumin recovery และ % albumin extracted



รูปที่ 4.1 % albumin recovery และ % albumin extracted ของโปรตีนที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าว และรำสกัดไขมัน

จากรูปที่ 4.1 เมื่อพิจารณา % albumin recovery และ % albumin extracted พบว่าการใช้ mixed emzymes ย่อยรำข้าวจะได้ % albumin recovery และ % albumin extracted สูงกว่าการใช้ mixed emzymes ย่อยรำสกัดไขมันและใช้ α-amylase ย่อยปลายข้าวทั้งนี้เนื่องจากในปลายข้าวจะพบ albumin ในปริมาณต่ำ ในปลายข้าวซึ่งมีอัตราส่วนของ albumin : globulin : prolamin : glutelin เท่ากับ 5:9:3:83 ในทำนองเดียวกับ Padhye และ Salunkhe (1979) ซึ่งพบว่าข้าวพันธุ์ Texas long grain มีอัตราส่วนของ albumin : globulin : prolamin : glutelin เท่ากับ 8:9.5:12.5:70 โดยปลายข้าวมีปริมาณ albumin ต่ำกว่ารำข้าวซึ่งมีอัตราส่วนของ albumin : globulin : prolamin : glutelin เท่ากับ 37:36:5:22 (Cagampang และคณะ, 1966) Betschart,

Fong และ Saunders (1977) พบว่ารำข้าว (Spanish rice bran) ที่ไม่ได้ให้ความร้อน albumin globulin prolamin และ glutelin เท่ากับ 40 : 21 : 3 : 36 และรำข้าวที่ให้ความร้อนได้ albumin globulin prolamin และ glutelin เท่ากับ 26 : 14 : 5 : 56 นอกจากปลายข้าวจะมีแป้งเป็นองค์ประกอบแล้วยังมีเส้นใยที่จับกับโปรตีนอยู่ ดังนั้น การสกัดโปรตีนออกมา อาจต้องใช้เอนไซม์อื่นร่วมด้วย เช่น งานวิจัยของ Shih และ Daigle (1977) และ Shih และคณะ (1999) ใช้ hemicellulase และ cellulase ย่อยแป้งจากปลายข้าวที่ผ่านการย่อยด้วย α-amylase มาแล้ว ส่วนรำสกัดไขมันที่ใช้ mixed emzymes ย่อยแล้วให้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสต่ำกว่ารำข้าวที่ใช้ mixed emzymes เนื่องจากรำสกัดไขมันเป็นรำข้าวที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105-110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-45 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเพสเพื่อรักษาคุณภาพของน้ำมันรำที่สกัดได้จากกระบวนการรำสกัดน้ำมันรำและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้โปรตีนเกิดแปลงสภาพและเกิดปฏิกิริยากับโปรตีน หรือเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับองค์ประกอบอื่น เช่น เส้นใยและแป้ง เป็นต้น นอกจากความร้อนแล้วในการสกัดน้ำมันรำ n-hexane ในการสกัดน้ำมันรำ ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์อาจทำให้โปรตีนแปลงสภาพเนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์จะไปจับกับส่วนที่เป็น hydrophobic ของโปรตีน (Scopes, 1994) ทำให้โครงสร้างโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป โดยเป็นไปในแนวโน้มเดียวกับงานวิจัยของ Betschart ,Fong และ Saunders (1977) ซึ่งสกัดโปรตีนจากรำข้าวพันธุ์ Spanish โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 นาที ทำให้สกัดโปรตีนได้ต่ำเพียง 20-22 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ผลที่ได้ก็เป็นไปในแนวโน้มเดียวกับ Gnanasambandam และ Hettiarachchy (1995) ซึ่งเตรียมโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว และรำข้าวที่ผ่านการให้ความร้อน พบว่าโปรตีนที่สกัดจากรำข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนจะให้ปริมาณต่ำกว่ารำข้าวที่ไม่ได้ผ่านการให้ความร้อน และเมื่อพิจาณาด้านชนิดเอนไซม์จะเห็นได้ว่า mixed enzymes ย่อยรำข้าวได้ดีทั้งนี้เนื่องจาก mixed enzymes จึงสามารถย่อยองค์ประกอบพวก cellulose hemicellulose xylan และ β-glucan ที่มีในรำข้าวออก ทำให้โปรตีนถูกปลดปล่อยออกมาได้ง่ายขึ้น จากตารางที่ 4.13 จะเห็นได้ว่ารำข้าวที่สกัดด้วย mixed enzymes ให้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสสูงกว่าการใช้ α-amylase ย่อยปลายข้าว และรำสกัดไขมันที่สกัดด้วย mixed enzymes ด้วยเหตุผลที่กล่าวข้างต้นแล้ว และเมื่อพิจารณาต้นทุนการผลิตโปรตีน 1 กิโลกรัมจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน จะเห็นได้ว่าการผลิตโปรตีนจากรำข้าวใช้ต้นทุนต่ำที่สุด (456.00 บาท) รองลงมา คือ รำสกัดไขมันและปลายข้าวตามลำดับ โปรตีนจากปลายข้าวให้ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสต่ำแต่ใช้ต้นทุนในการผลิตสูงเนื่องจากต้องใช้ปริมาณวัตถุดิบและสารละลายบัฟเฟอร์ในปริมาณสูง ดังนั้น การสกัด

ตารางที่ 4.13 ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส % protein recovery %albumin extracted และต้นทุนในการผลิตโปรตีนที่ละลายน้ำได้ 1 kg ของปลายข้าว รำข้าว และรำสกัดไขมันจากภาวะที่เหมาะสมที่สุด

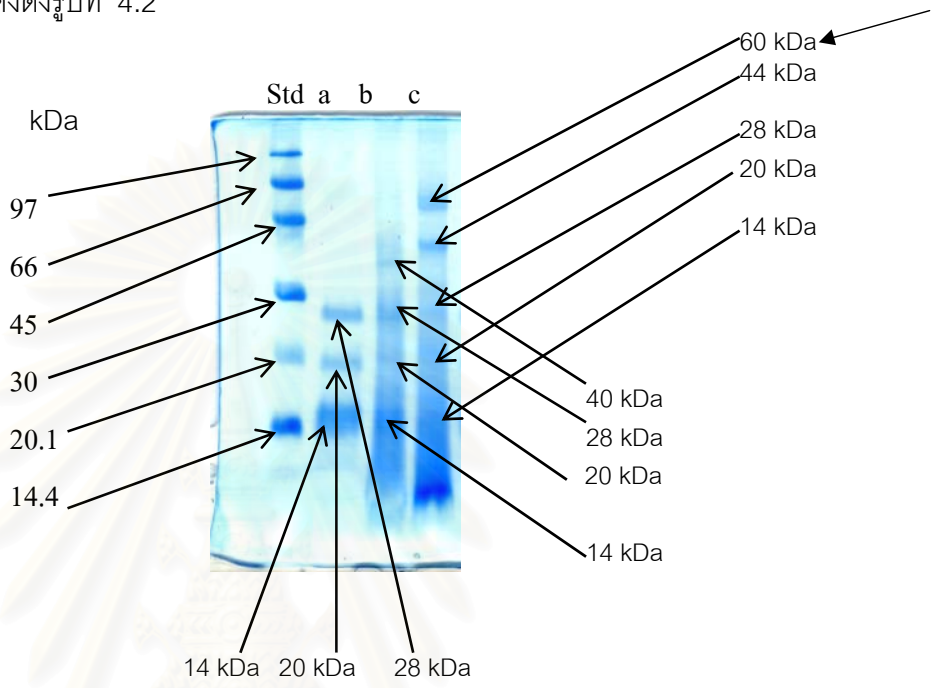
	ปลายข้าว	รำข้าว	รำสกัดไขมัน
ปริมาณโปรตีนในวัตถุดิบ (mg/g raw material)	79.60	143.20	169.60
Albumin ที่สกัดได้ (mg/g raw material) (ใช้เอนไซม์สกัด)	5.73	60.90	31.70
Albumin ในวัตถุดิบ (mg/g raw material) (Ju, Hettiarachchy และ Rath, 2001)	6.40	61.58	44.10
% albumin recovery	89.53	98.90	71.88
% albumin extracted	7.20	42.53	18.67
ปริมาณวัตถุดิบ(kg/protein 1 kg)	174.00	17.00	32.00
ราคาวัตถุดิบ(บาท/protein 1 kg)	1,740.00	170.00	320.00
ราคาเอนไซม์(บาท/protein 1 kg)	82.00	25.00	46.00
ราคาบัฟเฟอร์ (บาท/protein 1 kg)	37,079.00	261.00	491.00
ต้นทุนการผลิต* (บาท/protein1 kg)	38,901.10	456.00	857.00

*ต้นทุนในการผลิตยังไม่รวมค่าสาธารณูปโภค

โปรตีนจากปลายข้าวอาจต้องใช้วิธีอื่นในการกำจัดแป้งออกจากโครงสร้างของปลายข้าว เช่น การโม่แป้งเอาแป้งออก และนำส่วนที่เป็นน้ำล้างแป้งระหว่างการโม่มาศึกษาการสกัดโปรตีน เป็นต้น แต่ในการพิจารณาเลือกภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากข้าวเจ้า นอกจากจะพิจารณาจากปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส % albumin recovery % albumin extracted และต้นทุนในการผลิตแล้วยังต้องพิจารณาขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ คุณค่าทางโภชนาการ และสมบัติเชิงหน้าที่อีกด้วย

4.6 การศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้

4.6.1 ศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้ โดย SDS-PAGE (รายละเอียด แสดงดังภาคผนวก ข.) ศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันโดย SDS-PAGE แสดงดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ละลายน้ำที่สกัดได้จาก (a) ปลายข้าว (b) รำข้าวและ (c) รำสกัดไขมันด้วยวิธี SDS-PAGE โดย Std = molecular weight marker ปริมาณโปรตีนต่อ well เท่ากับ 8 ไมโครกรัม

จากรูปที่ 4.2 พบว่าโปรตีนจากปลายข้าวมีขนาดเท่ากับ 14 20 และ 28 kDa โปรตีนจากรำข้าวที่สกัดด้วย mixed enzymes (novozymes®) มีขนาดเท่ากับ 14 20 28 และ 40 kDa โปรตีนจากรำสกัดไขมันที่สกัดด้วย mixed enzymes (novozymes®) มีขนาดเท่ากับ 14 20 28 44 และ 60 kDa โปรตีนจากรำสกัดไขมันมีขนาดโมเลกุล 60 kDa ซึ่งไม่พบในโปรตีนจากรำข้าว ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนจากรำสกัดไขมันสกัดได้จากรำสกัดไขมันซึ่งเป็นรำข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105-110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-45 นาที โปรตีนเกิดแปลงสภาพ ทำให้โปรตีนเกิด crosslink กัน ทำให้ได้โปรตีนที่มีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ไม่พบโปรตีนที่มีขนาด 16 kDa ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Matsuda และคณะ (1988) รายงานว่าไม่พบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 16 kDa ในส่วนของ albumin หรือ globulin และเป็นไปในแนวโน้มเดียวกับ Landers และ Hamaker (1994) ซึ่งไม่พบโปรตีน 16 kDa ใน albumin หรือ globulin ที่สกัดจากรำข้าว และโปรตีนที่พบมีขนาด 17.6 18.6 22.0 24.5 34.0 และ 60.7 kDa จากรูปที่ 4.2 จะเห็นได้ว่า

ขนาดโมเลกุลของโปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมันแยกออกจากกันไม่ชัดเจน ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าวและรำสกัดไขมันมีองค์ประกอบอื่นที่พบในรำข้าวและรำสกัดไขมัน เช่น cellulose hemicellulose และแป้ง เป็นต้น โดยองค์ประกอบเหล่านี้มีประจุและจับกับโปรตีน ทำให้การเคลื่อนที่ของโปรตีนเมื่อได้รับกระแสไฟฟ้าเปลี่ยนแปลงไป จึงต้องใช้วิธีการหาขนาดโมเลกุลวิธีอื่นร่วมด้วยโดยใช้ gel filtration chromatography ใช้คอลัมน์ Sephacryl S-200

4.6.2 การวิเคราะห์หาขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วย gel filtration chromatography

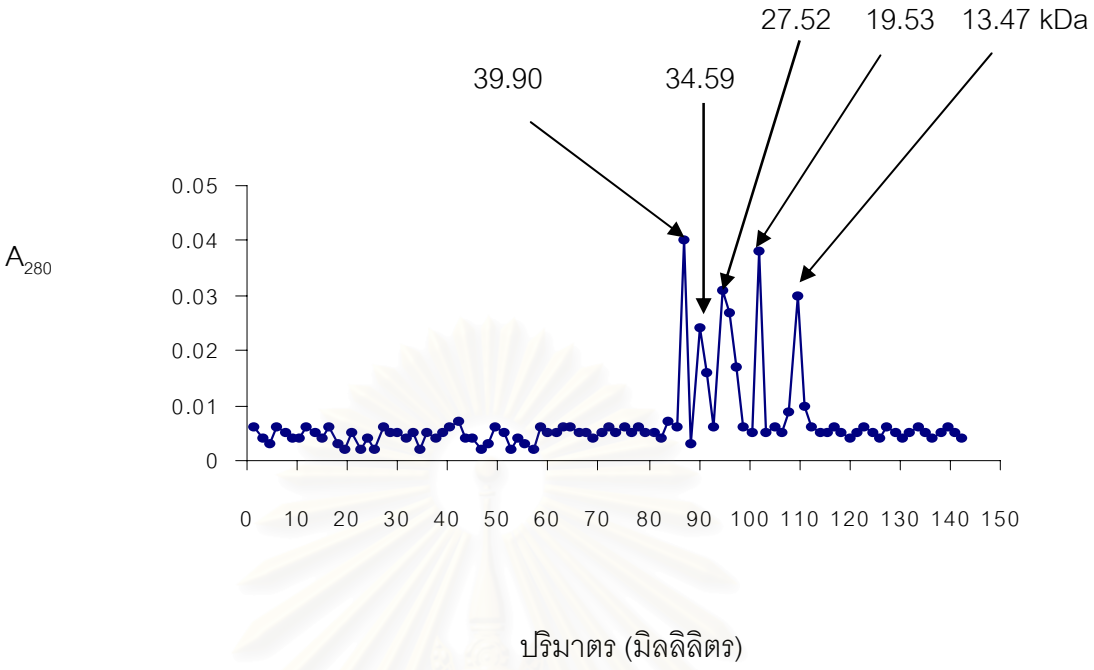
วิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดยใช้ gel filtration chromatography โดย load ตัวอย่างลงในคอลัมน์ขนาด 1.6 x 100 ซม. ที่บรรจุด้วย Sephacryl S-200

เมื่อคำนวณค่า V_e/V_o ได้แล้วนำไปคำนวณหาขนาดโมเลกุลจากสมการ

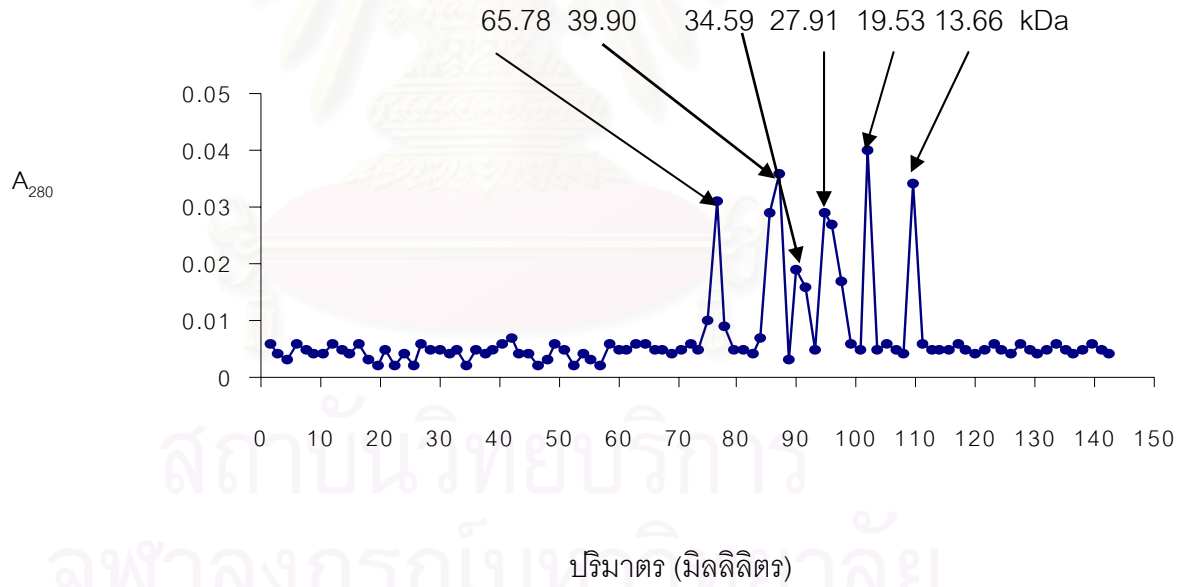
$$\log MW = -1.241\ V_e/V_o + 3.4004$$ (รายละเอียดในภาคผนวก ข.)

จากรูปที่ 4.3 วิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนจากรำข้าว พบว่าโปรตีนจากรำข้าวมี 5 peak ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 13.5 19.5 27.5 34.6 และ 39.9 kDa ในขณะที่เมื่อศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนจากรำข้าวด้วย SDS-PAGE จะได้แถบโปรตีน 4 band ขนาด 14 20 28 และ 40 kDa โดยไม่พบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 34.6 kDa ทั้งนี้อาจเนื่องจากในการศึกษา SDS-PAGE นั้นเป็นการใช้ภาวะที่รุนแรงและมีการใช้ β-mercaptoethanol ในการตัด disulfide bond จึงอาจเป็นผลให้โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 34.6 kDa เกิดการสลายตัวไปเป็นโปรตีนที่มีขนาด 13.5 และ 19.5 kDa แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาค่าปริมาณของโปรตีนขนาด 34.6 kDa ที่แยกด้วย gel filtration จากค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนขนาด 34.6 kDa จะพบว่าเป็นโปรตีนที่มีในปริมาณต่ำ

จากรูปที่ 4.4 โปรตีนจากรำสกัดไขมันมีขนาดโมกุลเท่ากับ 13.7 19.5 27.9 34.6 39.9 และ 65.8 kDa ซึ่งโปรตีนที่มีขนาดเท่ากับ 65.8 kDa อาจเป็นโปรตีน albumin ในขณะที่เมื่อศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนจากรำสกัดไขมันด้วย SDS-PAGE จะได้แถบโปรตีน 5 band โดยไม่พบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 34.6 kDa ทั้งนี้อาจเนื่องจากโปรตีนขนาด 34.6 kDa สลายไปในการศึกษาขนาดของโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE ด้วยเหตุผลเช่นเดียวกันกับข้างต้น และเมื่อพิจารณา peak ที่ได้จากการ run ตัวอย่างโปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมันด้วยวิธี SDS-PAGE และ gel filtration chromatography พบว่ามี peak ต่างกัน 1 peak คือ 65.8 kDa อาจเนื่องจากรำสกัดไขมันเป็นรำข้าวที่มีการใช้ความร้อนในการรักษาคุณภาพของรำข้าวก่อนการสกัดน้ำมันจึงทำให้โปรตีนเกิดแปลงสภาพและเกิด crosslink กัน



รูปที่ 4.3 ขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าวที่ใช้ mixed enzymes ย่อย โดยใช้ gel filtration chromatography ด้วยคอลัมน์ Sephacryl S-200 HR



รูปที่ 4.4 ขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้จากรำสกัดไขมันที่ใช้ mixed enzymes ย่อย โดยใช้ gel filtration chromatography ด้วยคอลัมน์ Sephacryl S-200 HR

จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE และ gel filtration chromatography จะเห็นได้ว่าไม่พบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 16 kDa ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ ผลที่ได้เป็นไปในแนวโน้มเดียวกับ Matsuda และคณะ (1988) ซึ่งไม่พบโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้เช่นกัน การเลือกภาวะที่เหมาะสมต้องพิจารณาด้านคุณค่าทางโภชนาการด้วย รายละเอียดแสดงดังหัวข้อ 4.7

4.7 การศึกษาคุณค่าทางโภชนาการ

4.7.1 องค์ประกอบของกรดอะมิโนและค่าคะแนนกรดอะมิโน

องค์ประกอบของกรดอะมิโนของโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันที่ภาวะที่เหมาะสมที่สุด แสดงดังตารางที่ 4.14 เมื่อศึกษาองค์ประกอบของกรดอะมิโนจะเห็นได้ว่า โปรตีนที่สกัดได้จากปลายข้าวที่ย่อยด้วย α-amylase รำข้าวและรำสกัดไขมันที่ย่อยด้วย mixed enzymes ของ arabanase cellulase hemicellulase β- glucanase และ xylanase พบว่าโปรตีนที่สกัดได้จากปลายข้าวมีปริมาณกรดอะมิโนจำเป็น tryptophan สูงกว่าเคซีน ส่วนกรดอะมิโนจำเป็นชนิดอื่นต่ำกว่าเคซีนทุกตัว และไม่มีกรดอะมิโนจำเป็นที่มีปริมาณสูงกว่าปริมาณที่ recommend ไว้สำหรับเด็กอายุ 2-5 ปี โปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าวมีปริมาณกรดอะมิโนใกล้เคียงกับเคซีน และมีกรดอะมิโนจำเป็น ได้แก่ threonine valine tryptophan และ histidine สูงกว่าเคซีน และมี threonine isoleucine tryptophan และ histidine สูงกว่าปริมาณที่ recommend ไว้สำหรับเด็กอายุ 2-5 ปี ผลการทดลองที่ได้เป็นไปในแนวโน้มเดียวกับงานวิจัยของ Wang และคณะ (1999) ที่สกัดโปรตีนจากรำข้าวและศึกษาองค์ประกอบกรดอะมิโน พบว่ามีองค์ประกอบกรดอะมิโนใกล้เคียงกับเคซีนโดยมีกรดอะมิโน valine cystine phenylalanine threonine histidine arginine alanine aspartic acid และ glycine สูงกว่าเคซีน และมี threonine และ histidine สูงกว่าปริมาณที่ recommend ไว้สำหรับเด็กอายุ 2-5 ปี โปรตีนที่สกัดจากรำสกัดไขมันมีกรดอะมิโนจำเป็น histidine สูงกว่าเคซีนและสูงกว่าปริมาณที่ recommend ไว้สำหรับเด็กอายุ 2-5 ปี เมื่อพิจารณาปริมาณกรดอะมิโนไม่จำเป็นจะเห็นได้ว่าโปรตีนที่สกัดจากปลายข้าวด้วย α-amylase มีปริมาณกรดอะมิโนไม่จำเป็น glycine arginine alanine และ cystine สูงกว่าเคซีน ในขณะที่โปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าวและรำสกัดไขมันที่สกัดด้วย mixed enzymes มีปริมาณกรดอะมิโนไม่จำเป็นใกล้เคียงกับเคซีน และมี aspartic acid glycine arginine alanine และ cystine สูงกว่าเคซีน และเมื่อพิจารณาปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นของโปรตีนที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันเปรียบเทียบกับไข่ จะเห็นได้ว่าโปรตีนจากปลายข้าวมีปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นทุกตัวต่ำกว่าโปรตีนจากไข่ ในขณะที่โปรตีนจากรำข้าวมี threonine valine tryptophan และ histidine สูงกว่าโปรตีนจากไข่ โปรตีนจากรำสกัดไขมันมี histidine สูงกว่าโปรตีนจากไข่ การที่โปรตีนจากปลายข้าวมีปริมาณกรดอะมิโนต่ำกว่าโปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมันอาจเนื่องจากในกระบวนการสกัดจะต้องให้ความร้อนจนอุณหภูมิเป็น 95 องศาเซลเซียส โดยอาจมีผลทำให้โปรตีนแปลงสภาพ กรดอะมิโนทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบอื่น เช่น แป้ง และเส้นใย เป็นต้น ทำให้โปรตีนจากปลายข้าวมีปริมาณกรดอะมิโนต่ำ ส่วนเหตุที่

ตารางที่ 4.14 องค์ประกอบของกรดอะมิโนของโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันที่ภาวะที่เหมาะสมที่สุด เคซีนและไข่ (g amino acid/100 g protein)

Amino acids	ปริมาณ Amino acid					amount recommended
	A	B	C	Casein	Egg ****	for infant (2-5 years)
Thr*	1.43	5.50	3.70	4.77	4.7	4.3
Val*	2.86	7.50	2.96	7.35	6.6	5.5
Leu*	4.29	8.13	2.78	9.99	8.6	9.3
Ile*	1.43	4.63	1.67	5.74	5.4	4.6
Lys*	1.43	6.63	4.81	8.77	7.0	6.6
Trp*	1.43	2.13	1.11	1.33	1.7	1.7
Phe*	1.43	5.00	1.48	5.48	9.3**	7.2
Met*	1.43	2.63	1.48	3.52	5.7***	4.2
His*	1.43	4.13	3.33	3.15	2.2	2.6
Asp	5.71	14.38	13.89	7.89		
Ser	2.86	5.88	3.15	5.99		
Glu	11.43	21.63	21.30	25.14		
Gly	4.29	8.88	7.22	2.09		
Arg	7.14	12.63	9.81	4.23		
Ala	5.71	9.88	7.04	3.91		
Pro	4.29	7.63	2.59	11.88		
Cys	2.86	3.25	2.59	0.40		
Tyr	1.43	4.13	1.85	5.92		

A = โปรตีนปลายข้าว B = โปรตีนรำข้าว C = โปรตีนรำสกัดไขมัน

โปรตีนจากปลายข้าว รำข้าว รำสกัดไขมัน และ Casein วิเคราะห์ด้วยวิธี AccQ Tag (Liu และคณะ, 1995)

* กรดอะมิโนจำเป็น

** ปริมาณกรดอะมิโนของ phe คือ phe + tyr

*** ปริมาณกรดอะมิโนของ met คือ met + cys

**** FAO/WHO/UNU (1985)

ปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนจากรำสกัดไขมันต่ำกว่าโปรตีนจากรำข้าวอาจเนื่องจากรำสกัดไขมันเป็นรำข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนสูงในการให้ความร้อนและผ่านการสกัดน้ำมันด้วย hexane ซึ่งมีผลทำให้โปรตีนแปลงสภาพได้ทำให้กรดอะมิโนถูกทำลาย

ค่าคะแนนกรดอะมิโนของโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันเมื่อเปรียบเทียบกับเคซีนและไข่ แสดงดังตารางที่ 4.15 จะเห็นได้ว่าโปรตีนจากปลายข้าวที่สกัดด้วย α-amylase โปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมันที่สกัดด้วย mixed enzymes ของ arabanase cellulase hemicellulase β-glucanase และ xylanase มี lysine methionine และ phenylalanine เป็นกรดอะมิโนจำกัด (limiting amino acid) ตามลำดับ โดยมีคะแนนกรดอะมิโนเท่ากับ 16.29 74.49 และ 27.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Juliano (1972) พบว่า lysine เป็น limiting amino acid ในข้าว และ Damodaran (1996) ซึ่งระบุว่าโปรตีนจากพืชส่วนใหญ่จะมี lysine และ sulfur-containing amino acid เป็น limiting amino acid ในทางตรงข้ามกับ Wang และคณะ (1999) ที่สกัดโปรตีนจากรำข้าวและศึกษาองค์ประกอบกรดอะมิโน พบว่า โปรตีนไอโซเลทที่ได้จากการใช้ phytase และ xylanase ย่อยรำข้าวมีกรดอะมิโน tryptophan เป็น first limiting amino acid เหตุที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจากรำข้าวที่ใช้ในงานวิจัยแตกต่างจาก Wang และคณะ (1999) หลายด้าน เช่น ทั้งทางด้านพันธุ์ การเพาะปลูก กระบวนการสีข้าว เป็นต้น โปรตีนจากพืชส่วนใหญ่จะมี lysine และ sulfur-containing amino acid เป็น limiting amino acid (Damodaran, 1996) ในทางตรงข้ามกับ Wang และคณะ (1999) ที่สกัดโปรตีนจากรำข้าวและศึกษาองค์ประกอบกรดอะมิโน พบว่า โปรตีนไอโซเลทที่ได้จากการใช้ phytase และ xylanase ย่อยรำข้าวมีกรดอะมิโน tryptophan เป็น first limiting amino acid เหตุที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจากรำข้าวที่ใช้ในงานวิจัยแตกต่างจาก Wang และคณะ (1999) หลายด้าน เช่น ทั้งทางด้านพันธุ์ การเพาะปลูก กระบวนการสีข้าว เป็นต้น ดังนั้น จะเห็นได้ว่าโปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าวที่ใช้ mixed enzymes ในการย่อยเหมาะสม ในการใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารได้ดีเนื่องจากมีองค์ประกอบกรดอะมิโนใกล้เคียงกับเคซีน และมี limiting amino acid ที่มีคะแนนกรดอะมิโนสูง (คะแนนกรดอะมิโนเท่ากับ 74.49 เปอร์เซ็นต์) เมื่อพิจารณาค่าคะแนนกรดอะมิโนของโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนจากไข่ จะเห็นได้ว่าโปรตีนจากปลายข้าวมี lysine เป็น limiting amino acid (คะแนนกรดอะมิโนเท่ากับ 20.43 เปอร์เซ็นต์) โปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมันมี isoleucine เป็น limiting amino acid (คะแนนกรดอะมิโนเท่ากับ 85.74 และ 30.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) โปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าวที่ใช้ mixed enzymes ในการย่อยเหมาะสมในการใช้เป็นองค์ประกอบ

ตารางที่ 4.15 ค่าคะแนนกรดอะมิโน (%) ของโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันเมื่อเปรียบเทียบกับเคซีนและไข่

Amino acids	amino acid score (%)					
	A_C	B_C	C_C	A_E	B_E	C_E
Thr	29.93	115.24	77.61	30.43	117.02	78.72
Val	38.86	102.00	40.30	43.33	113.64	44.85
Leu	42.90	81.34	27.81	49.88	94.53	32.33
Ile	24.87	80.52	29.02	26.48	85.74	30.93
Lys	16.29	75.56	54.91	20.43	94.71	68.71
Trp	107.26	159.55	83.43	84.12	125.29	65.29
Phe	26.07	91.24	27.03	30.75	98.17	35.81
Met	40.54	74.49	42.04	72.26	103.16	71.40
His	45.36	130.98	105.84	65.00	187.73	151.36

A_C คือ คะแนนกรดอะมิโนของโปรตีนจากปลายข้าวที่ใช้ α-amylase ในการย่อยเมื่อเปรียบเทียบกับเคซีน

B_C คือ คะแนนกรดอะมิโนของโปรตีนจากรำข้าวที่ใช้ mixed enzymes ในการย่อยเมื่อเปรียบเทียบกับเคซีน

C_C คือ คะแนนกรดอะมิโนของโปรตีนจากรำสกัดไขมันที่ใช้ mixed enzymes ในการย่อยเมื่อเปรียบเทียบกับเคซีน

A_E คือ คะแนนกรดอะมิโนของโปรตีนจากปลายข้าวที่ใช้ α-amylase ในการย่อยเมื่อเปรียบเทียบกับไข่

B_E คือ คะแนนกรดอะมิโนของโปรตีนจากรำข้าวที่ใช้ mixed enzymes ในการย่อยเมื่อเปรียบเทียบกับไข่

C_E คือ คะแนนกรดอะมิโนของโปรตีนจากรำสกัดไขมันที่ใช้ mixed enzymes ในการย่อยเมื่อเปรียบเทียบกับไข่

ในอาหารได้ดีเนื่องจากมีองค์ประกอบกรดอะมิโนใกล้เคียงกับเคซีนและโปรตีนจากไข่ นอกจากนี้ยังมี limiting amino acid ที่มีคะแนนกรดอะมิโนสูง (คะแนนกรดอะมิโนเท่ากับ 85.74 เปอร์เซ็นต์) ถึงแม้การประเมินคุณภาพของโปรตีนโดยวิเคราะห์องค์ประกอบกรดอะมิโนและค่าคะแนนกรดอะมิโนจะมีข้อดี คือ วิเคราะห์ได้ง่ายและสะดวกในการวิเคราะห์ complementary effect ของโปรตีนในอาหารเพื่อใช้พัฒนาคุณภาพของอาหารโปรตีนโดยเติมกรดอะมิโนที่เป็นกรดอะมิโนจำกัดลงไป แต่การวิเคราะห์คะแนนกรดอะมิโนนั้นมีสมมติฐานว่าตัวอย่างโปรตีนต้องถูกย่อยจนหมด และกรดอะมิโนจำเป็นทุกตัวต้องถูกดูดซึม นอกจากนี้มนุษย์ยังมีความสามารถในการใช้กรดอะมิโนได้เฉพาะรูป L-form แต่การวิเคราะห์คะแนนกรดอะมิโนนั้นไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง L และ D-amino acid ได้ ฉะนั้นค่าคะแนนกรดอะมิโนที่ได้จึงมีค่ามากเกิน

ประมาณ (overestimate) นอกจากนี้ยังไม่สามารถทำนายผลยับยั้งของกรดอะมิโนที่มีปริมาณสูงต่อการนำกรดอะมิโนชนิดอื่นไปใช้ของร่างกาย และไม่สามารถประเมินผลของ antinutritional factor ได้ (Damodaran, 1996) ฉะนั้น การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดอะมิโนและค่าคะแนนกรดอะมิโนจึงไม่ได้บอกว่าเมื่อร่างกายได้รับอาหารโปรตีนเข้าไปแล้วสามารถย่อยและดูดซึมกรดอะมิโนไปใช้ได้มากน้อยเพียงใด ดังนั้น จึงต้องมีการ correct คะแนนกรดอะมิโนด้วยการวิเคราะห์ค่า protein digestibility ค่า Protein Efficiency Ratio (PER) โดยค่า C-PER วิเคราะห์ได้จากองค์ประกอบของกรดอะมิโนร่วมกับค่า protein digestibility ส่วนค่า DC-PER วิเคราะห์ได้จากองค์ประกอบของกรดอะมิโนเท่านั้น และค่า Protein digestibility corrected amino acid score (PDCAAS)

4.7.2 ค่า protein digestibility ค่า Protein Efficiency Ratio (PER) (A.O.A.C, 1990) และค่า Protein digestibility corrected amino acid score (PDCAAS) (FAO/WHO/UNU, 1985)

จากตารางที่ 4.16 จะเห็นได้ว่าค่า Protein Efficiency Ratio (PER) ของโปรตีนที่สกัดจากปลายข้าวและรำสกัดไขมันให้ค่า PER มากเกินประมาณ (overestimate) ค่า PER ของโปรตีนที่สกัดจากปลายข้าวและรำสกัดไขมันไม่สอดคล้องกับปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นซึ่งมีปริมาณต่ำมาก และมีค่า %protein digestibility ค่อนข้างต่ำแต่กลับให้ค่า PER สูง ทั้งนี้อาจเนื่องจากโปรตีนจากปลายข้าวและรำสกัดไขมันอาจมีผนังเซลล์ที่ถูกย่อยไม่หมด ทำให้มีโปรตีนส่วนที่ถูกผนังเซลล์ห่อหุ้มอยู่ หรือเป็นโปรตีนที่มี proteolytic inhibitor ซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ย่อยโปรตีน ทำให้การคำนวณค่า %protein digestibility ได้ต่ำลง และอาจเนื่องจากโปรตีนที่สกัดจากปลายข้าวและรำสกัดไขมันมีปริมาณกรดอะมิโนที่ต่อต้านการย่อยด้วยเอนไซม์ protease (lysine leucine cystine aspartic acid และ proline) ต่ำ ส่งผลถึงการจำแนกกลุ่มในการคำนวณค่า PER ดังนั้น การประเมินคุณภาพของโปรตีนจากปลายข้าวและรำสกัดไขมันจึงต้องใช้การประเมินคุณภาพโปรตีนของวิธีอื่นร่วมด้วยโดยเลือกใช้วิธีการวิเคราะห์ Protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมาเป็นเวลานาน และได้รับการ recommend โดย FAO/WHO แล้ว ค่า PDCAAS ของโปรตีนจากปลายข้าวมีค่า PDCAAS เท่ากับ 0.09 (เทียบกับเคซีน) และ 0.12 (เทียบกับโปรตีนจากไข่) โปรตีนจากรำข้าวมีค่า PDCAAS เท่ากับ 0.54 (เทียบกับเคซีน) และ 0.62 (เทียบกับโปรตีนจากไข่) โปรตีนจากรำสกัดไขมันมีค่า PDCAAS เท่ากับ 0.17 (เทียบกับเคซีน) และ 0.19 (เทียบกับโปรตีนจากไข่) จะเห็นได้ว่าค่า PDCAAS ของโปรตีนจากรำข้าวมีค่าสูงกว่า wheat gluten (0.25) แต่ต่ำ

กว่าเคซีนและโปรตีนจากไข่ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนจากรำข้าวมีองค์ประกอบกรดอะมิโนที่ดี คือ มีปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นใกล้เคียงกับเคซีนและโปรตีนจากไข่ และมีกรดอะมิโนจำเป็นบางตัวที่มีปริมาณสูงกว่าเคซีนและไข่ นอกจากนี้โปรตีนจากรำข้าวยังมีค่า %protein digestibility สูงกว่าโปรตีนจากปลายข้าวและรำสกัดไขมันอีกด้วย ปลายข้าวและรำสกัดไขมันผ่านการให้ความร้อนก่อนการสกัดโปรตีนโดยในการสกัดโปรตีนจากปลายข้าวต้องทำให้ปลายข้าวสุกที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีก่อนการใช้เอนไซม์ย่อยและรำสกัดไขมันก็เป็นรำข้าวที่ผ่าน heat stabilize มาแต่โปรตีนจากปลายข้าวมีค่า %protein digestibility ต่ำกว่าโปรตีนจากรำสกัดไขมัน ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนในปลายข้าวมี leucine cystine และ proline ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ต่อต้านการย่อยด้วย protease ในปริมาณสูง ทำให้เอนไซม์ protease เข้าไปย่อยโปรตีนได้ยาก (Jewell, Kendrick และ Satterlee, 1980) และเมื่อพิจารณาค่า PER ของเคซีนจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีของ A.O.A.C (1990) และ FAO/WHO/UNU (1985) ซึ่งใช้หนูทดลองในการวิเคราะห์ พบว่าเคซีนมีค่า PER ที่วิเคราะห์ได้จากทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกัน คือ ได้ค่า PER เท่ากับ 2.50 ในขณะที่โปรตีนจากรำข้าวให้ค่า PER เท่ากับ 2.14 (C-PER) และ 2.07 (DC-PER) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันและใกล้เคียงกับเนื้อวัว (2.30) (Hansen และคณะ, 1981) ถึงแม้ค่า PER ของโปรตีนจากรำข้าวจะต่ำกว่าเคซีนและไข่แต่โปรตีนจากรำข้าวก็มีค่า PER สูงกว่า wheat gluen ค่า PER ที่ได้ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Hansen และคณะ (1981) ซึ่งรายงานว่าโปรตีนข้าวมีค่า Protein Efficiency Ratio (PER) เท่ากับ 2.18 การที่โปรตีนข้าวมีค่า PER สูงอาจเนื่องจากมีสมดุลของกรดอะมิโนจำเป็นที่ดี นอกจากนี้ค่า PER ที่ได้ยังมีค่าใกล้เคียงกับ Chang, Lee และ Brown (1986) ซึ่งศึกษาคุณภาพของแป้งข้าวโปรตีนสูงที่ผลิตจากแป้งที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ย่อยด้วย ∝-amylase 0.25 มิลลิกรัม ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาทีไ ด้ค่า PER เท่ากับ 2.17 เมื่อพิจารณาด้านคุณค่าทางโภชนาการจะเห็นได้ว่าโปรตีนจากรำข้าวมีคุณค่าทางโภชนาการที่ดีโดยมีองค์ประกอบกรดอะมิโนใกล้เคียงกับเคซีนและไข่ นอกจากนี้ยังมีค่า PER สูงกว่า wheat gluten และใกล้เคียงกับเนื้อวัวอีกด้วย และมีค่า PDCAAS สูงกว่า wheat gluten ด้วย ทั้งนี้อาจเนื่องจากโปรตีนจากรำข้าวมีองค์ประกอบกรดอะมิโนที่ดี และไม่มี antinutritional factor

การเลือกภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนที่ละลายน้ำได้นอกจากจะพิจารณาด้านปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส %albumin recovery และ %albumin extracted ขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้และคุณค่าทางโภชนาแล้วยังต้องพิจารณาสมบัติเชิงหน้าที่ซึ่งเป็นสมบัติที่สำคัญในการนำโปรตีนไปใช้เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์อาหาร โดยสมบัติที่เลือกพิจารณา

ได้แก่ สมบัติการเกิดโฟม และสมบัติการเกิดอิมัลชันซึ่งเป็นสมบัติที่ใช้อย่างกว้างขวางในผลิตภัณฑ์อาหารโดยมีรายละเอียดดังหัวข้อ 4.8

ตารางที่ 4.16 ค่า protein digestibility ค่า protein efficiency ratio (PER) และค่า PDCAAS ของแสดงโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน

โปรตีน	digestibility (%)	PER	PDCAAS	PDCAAS
Casein	89.61	2.50 (C-PER)	1.00	1.00
		2.50 (DC-PER)		
		2.50*		
ไข่*	97.00	3.90	1.00	1.00
Wheat gluten*	96.00	0.26	0.25	0.25
ปลายข้าว	58.03	3.32 (C-PER)	0.09**	0.12***
		3.52 (DC-PER)		
รำข้าว	72.01	2.14 (C-PER)	0.54**	0.62***
		2.07 (DC-PER)		
รำสกัดไขมัน	61.58	3.01 (C-PER)	0.17**	0.19***
		3.16 (DC-PER)		

* ที่มา: FAO/WHO/UNU (1985)

**คะแนนกรดอะมิโนที่ใช้คำนวณคิดเทียบกับเคซีน

***คะแนนกรดอะมิโนที่ใช้คำนวณคิดเทียบกับโปรตีนจากไข่

4.8 การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่

4.8.1 การศึกษาสมบัติการเกิดโฟม

สมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนไข่ขาวและเคซีน แสดงดังตารางที่ 4.17 จะเห็นได้ว่าโปรตีนจากปลายข้าวและรำสกัดไขมันมีค่า foaming capacity (12.75 ml.) มีค่าต่ำกว่าโปรตีนไข่ขาว (19.75 ml.) เนื่องจากโปรตีนที่ได้จากปลายข้าวที่ใช้ α-amylase ในการสกัดอาจไม่ได้ช่วยย่อยแป้งออกจากโปรตีนได้มากเท่าที่ควร โปรตีนละลายออกมาได้น้อย ค่า foaming capacity จึงค่อนข้างต่ำ โปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าวที่ใช้ mixed enzymes ในการสกัดมีค่า foaming capacity (18.00 ml.)

ตารางที่ 4.17 สมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนไข่ขาวและเคซีน

โปรตีน	foaming capacity (ml.)	foaming stability (min.)
เคซีน	$6.88^{d} \pm 0.85$	$101.25^{c} \pm 3.50$
ไข่ขาว	$19.75^{a} \pm 0.96$	$119.25^{a} \pm 0.96$
ปลายข้าว	$12.75^{c} \pm 1.50$	$98.75^{c} \pm 1.71$
รำข้าว	$18.00^{ab} \pm 1.83$	$110.25^{b} \pm 1.89$
รำสกัดไขมัน	$16.38^{b} \pm 1.60$	$100.25^{c} \pm 6.70$

ไม่แตกต่างจากโปรตีนไข่ขาว โปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันมีค่า foaming capacity สูงกว่าเคซีน (6.88 ml.) โปรตีนจากรำสกัดไขมันมีค่า foaming capacity (16.38 ml.) ไม่แตกต่างจากโปรตีนจากรำข้าว (18.00 ml.) อาจเนื่องจากเมื่อใช้ mixed enzymes ย่อยรำข้าวแล้วจะทำให้ β-glucan arabinose cellulose hemicellulose และ xylan ถูกย่อยออกไปโปรตีนละลายออกมาและมีลักษณะเป็น random coil ซึ่งทำให้มี foaming capacity ที่ดีสอดคล้องกับ Wang และคณะ (1999) พบว่าโปรตีนไอโซเลทจากรำข้าวที่ย่อยด้วย phytase และ xylanase ทำให้ได้ foaming capacity สูงใกล้เคียงกับโปรตีนไข่ขาวทั้งนี้เนื่องจาก phytase และ xylanase ย่อย phytate และองค์ประกอบในเซลล์ของรำข้าวออก ทำให้โปรตีนที่ละลายออกมามีลักษณะเป็น flexible random-coiled มากขึ้น ช่วยเพิ่ม foaming capacity (Halling, 1981; Damodaran, 1990) ในขณะที่ Bera และ Mukherjee (1989) รายงานว่า โปรตีนรำข้าวเข้มข้นที่ผลิตจากรำข้าวสดมีค่า foaming capacity ต่ำกว่าโปรตีนเข้มข้นที่ผลิตจากรำสกัดไขมันในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากโปรตีนรำข้าวเข้มข้นที่ผลิตจากรำข้าวสดมีปริมาณไขมันสูงกว่ารำสกัดไขมันจึงทำให้สมบัติการเกิดโฟมลดลง เพราะไขมันมีค่า surface active มากกว่าโปรตีน โดยไขมันจะถูกดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับของเหลวได้ดีกว่าโปรตีนจากรำข้าวสด (Damodaran, 1996) ผลการวิจัยแตกต่างจาก Bera และ Mukherjee (1989) ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีกระบวนการสกัดโปรตีนแตกต่างกันโดย Bera และ Mukherjee (1989) สกัดโปรตีนจากรำข้าวพันธุ์ *indica* ด้วยสารละลายด่างที่ pH 9.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และตกตะกอนโปรตีนโดยการปรับ pH เป็น 4.50 จึงได้โปรตีนส่วนอื่นนอกจาก albumin ออกมาด้วย ได้แก่ glutelin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ละลายได้ดีในสารละลายด่าง รำสกัดไขมันที่ Bera และ Mukherjee (1989) ใช้ใน

งานวิจัยเป็นรำข้าวที่สกัดไขมันออกเท่านั้นไม่ได้มีการให้ความร้อน แต่โปรตีนจากรำสกัดไขมันที่ได้จากงานวิจัยที่ศึกษาเป็นรำข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงเพื่อรักษาคุณภาพของรำข้าว ดังนั้น โปรตีนจากรำสกัดไขมันจึงเกิดแปลงสภาพและละลายออกมาในลักษณะ flexible random coil ต่ำ จึงทำให้มี foaming capacity ไม่แตกต่างจากโปรตีนจากรำข้าว นอกจากนี้โปรตีนจากรำข้าวยังมี uncharged polar amino acid ได้แก่ glycine threonine cysteine และ tyrosine ในปริมาณสูง (Padhye และ Salunkhe, 1979) ซึ่งมีปริมาณที่สมดุลกับกรดอะมิโนที่มี hydrophobic side chain ได้แก่ alanine valine leucine isoleucine proline phenylalanine tryptophan และ methionine การที่โปรตีนจะให้ foaming capacity สูงเกิดจากโปรตีนเกิดแปลงสภาพ คือ มีประจุสุทธิเป็นศูนย์ นั่นคือ โปรตีนมีปริมาณกรดอะมิโนที่มี hydrophobic side chain เท่ากับ hydrophilic side chain จึงทำให้ห่อหุ้มอากาศได้มาก (Damodaran, 1996) และเมื่อพิจารณาค่า foaming stability จะเห็นได้ว่าโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันมีค่า foaming stability ต่ำกว่าโปรตีนจากไข่ขาว (119.25 min.) โปรตีนจากปลายข้าว รำสกัดไขมัน เคซีน มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่โปรตีนจากรำข้าวมีค่า foaming stability สูงกว่าเคซีนทั้งนี้อาจเนื่องจากโปรตีนจากรำข้าวมี globular protein สูงกว่าโปรตีนจากปลายข้าวและรำสกัดไขมัน เนื่องจากโปรตีนที่สกัดได้จากปลายข้าวและรำสกัดไขมันมี acidic amino acid (aspartic acid และ glutamic acid) ในปริมาณสูงกว่า basic amino acid (lysine histidine และ arginine) และอาจมี globular protein ซึ่งทำให้เกิดฟิลม์ที่มีลักษณะยืดหยุ่นในปริมาณต่ำ ทั้งนี้เนื่องจาก globular protein เป็นโปรตีนที่โครงสร้างเปลี่ยนแปลงได้ง่ายเมื่อได้รับความร้อนหรือเมื่อ pH เปลี่ยนแปลงไป ทำให้ได้ viscoelastic film ที่ไม่แข็งแรง ทำให้เกิดการ collapse ได้ ผลที่ได้สอดคล้องกับ Wang และคณะ (1999) ซึ่งพบว่าโปรตีนไอโซเลทจากรำข้าวที่ได้ก็มี foaming stability ต่ำกว่าโปรตีนไข่ขาวเนื่องจากไม่มีฟิลม์ที่เหนียวและยืดหยุ่นพอที่จะห่อหุ้มอากาศได้ จึงเกิด collapse ได้ง่าย (Halling, 1981; Damodaran, 1990) จากสมบัติการเกิดโฟมจะเห็นได้ว่าโปรตีนจากรำข้าวมีความเหมาะสมในการใช้เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องอาศัยสมบัติการเกิดฟองได้ เช่น เค้ก และเมอแรงจ์ เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนจากรำข้าวมีค่า foaming capacity และ foaming stability สูงใกล้เคียงกับโปรตีนไข่ขาวและมีค่าสูงกว่าเคซีน

4.8.2 การศึกษาสมบัติการเกิดอิมัลชัน

สมบัติการเกิดอิมัลชันของโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันเมื่อเปรียบเทียบกับเคซีนและ bovine serum albumin แสดงดังตารางที่ 4.18 จะเห็นได้ว่า

ตารางที่ 4.18 สมบัติการเกิดอิมัลชันของโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันเมื่อเปรียบเทียบกับ bovine serum albumin และเคซีน

โปรตีน	emulsifying activity (A_{500})	emulsion stability (min.)
เคซีน	$0.39^{c} \pm 0.08$	$5.00^{c} \pm 0.82$
Bovine serum albumin	$0.90^{a} \pm 0.01$	$16.75^{a} \pm 0.50$
ปลายข้าว	$0.36^{c} \pm 0.11$	$4.00^{c} \pm 0.82$
รำข้าว	$0.55^{b} \pm 0.06$	$13.75^{b} \pm 0.65$
รำสกัดไขมัน	$0.58^{b} \pm 0.12$	$14.75^{b} \pm 1.04$

โปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันมี emulsifying activity และ emulsion stability ต่ำกว่า bovine serum albumin ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันอาจมี hydrophile-lipophile balance (HLB) ต่ำ ค่า HLB มีอิทธิพลต่อ emulsifying activity ของโปรตีน (Nakai, 1983) โปรตีนจากปลายข้าวมี emulsifying activity และ emulsion stability ไม่แตกต่างจากเคซีน ในขณะที่โปรตีนจากรำข้าวมีค่า emulsifying activity และ emulsion stability ไม่แตกต่างจากโปรตีนจากรำสกัดไขมันโดยมีค่าทั้งสองสูงกว่าเคซีน ผลที่ได้เป็นไปในแนวโน้มเดียวกับ Wang และคณะ (1999) ซึ่งพบว่าโปรตีนไอโซเลทจากรำข้าวที่ย่อยด้วย phytase และ xylanase ทำให้ได้ emulsifying activity และ emulsion stability ต่ำกว่า bovine serum albumin ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนไอโซเลทจากรำข้าวมี surface hydrophobicity ต่ำ (Chaplin และ Andrew, 1989; Petrucceli และ Anon, 1994; Halling, 1981) แต่ขัดแย้งกับ Bera และ Mukherjee (1989) ซึ่งรายงานว่าโปรตีนรำข้าวเข้มข้นที่ผลิตจากรำข้าวสดมีค่า emulsion capacity สูงกว่าโปรตีนรำข้าวเข้มข้นที่ผลิตจากรำสกัดไขมัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากโปรตีนจากรำสกัดไขมันมีสารชนิดอื่นนอกจากโปรตีนที่ทำให้มีสมบัติการเกิดอิมัลชันที่ดี เช่น กรดไขมัน และเลซิทิน เป็นต้น (Orthoefer, 1996) สารดังกล่าวมีสมบัติเป็นอิมัลซิฟายเออร์ (Fisher และ Parker, 1988) โปรตีนรำข้าวเข้มข้นที่ผลิตจากรำข้าวสดนั้นมีปริมาณไขมันสูงกว่ารำสกัดไขมัน Bera และ Mukherjee (1989) สกัดโปรตีนจากรำข้าวพันธุ์ *indica* ด้วยสารละลายด่างที่ pH 9.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และตกตะกอนโปรตีนโดยการปรับ pH เป็น 4.50 ได้โปรตีน glutelin เมื่อพิจารณาสมบัติการเกิดอิมัลชันของโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน จะเห็นได้ว่าโปรตีนจากรำข้าวมีความเหมาะสมในการใช้เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องอาศัยสมบัติการเกิดอิมัลชันได้ เช่น ไอศกรีม ซอส และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เป็นต้น ทั้งนี้

จากโปรตีนจากรำข้าวมีค่า emulsifying activity และ emulsion stability สูงกว่าเคซีนและใกล้เคียงกับ bovine serum albumin

เมื่อพิจารณาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน albumin ที่สกัดได้ด้วยวิธีการที่เหมาะสม พบว่า สมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนจากรำข้าวมี foaming capacity สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนจากปลายข้าวและรำสกัดไขมันและไม่แตกต่างจากโปรตีนจากไข่ขาว โปรตีนจากรำข้าวมีค่า foaming stability สูงกว่าโปรตีนจากปลายข้าวและรำสกัดไขมัน แต่มีค่า foaming stability รองลงมาจากโปรตีนไข่ขาว โปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมันมีค่า emulsifying activity และ emulsion stability ไม่แตกต่างกันและสูงกว่าโปรตีนจากปลายข้าว ในขณะที่โปรตีนจากมีค่า emulsifying activity และ emulsion stability ต่ำกว่า bovine serum albumin

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ปลายข้าว รำข้าว และรำสกัดไขมันมีปริมาณโปรตีน 7.78 ถึง 8.14 เปอร์เซ็นต์ 14.29 ถึง 14.35 เปอร์เซ็นต์ และ 15.73 ถึง 18.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อสกัดโปรตีนจากปลายข้าวด้วย α-amylase โดยใช้ปลายข้าว ขนาด 100 mesh และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สกัดด้วย α-amylase ปริมาตร 0.15 %v/w pH 6.5 อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที ให้โปรตีน 5.73 มิลลิกรัมต่อปลายข้าว 1 กรัม ภาวะเหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวโดยใช้ mixed enzymes คือ ใช้รำข้าวขนาด 80 mesh ความเข้มข้น 25 %w/v mixed enzymes ความเข้มข้น 0.10 %v/w pH 3.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที ให้โปรตีน 60.90 มิลลิกรัมต่อรำข้าว 1 กรัม ภาวะเหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากรำสกัดไขมันโดยใช้ mixed enzymes คือ ใช้รำสกัดไขมันขนาด 80 mesh เข้มข้น 25 %w/v สกัดด้วย mixed enzymes ความเข้มข้น 0.10 %v/w pH 3.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ให้โปรตีน 31.70 มิลลิกรัมต่อรำสกัดไขมัน 1 กรัม

จากการศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ละลายน้ำที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน ไม่พบโปรตีนที่ทำให้เกิดอาการแพ้สูง (16 kDa) โปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันมี limiting amino acid คือ lysine methionine และ phenylalanine ตามลำดับ โดยโปรตีนจากรำข้าวมีองค์ประกอบกรดอะมิโนใกล้เคียงกับเคซีนและไข่มากที่สุด โปรตีนจากรำข้าวที่ย่อยด้วย mixed enzymes มีค่า Protein Efficiency Ratio สูงที่สุด คือ 2.14 (C-PER) และ 2.07 (DC-PER)

จากการศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่ละลายน้ำที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน พบว่า โปรตีนจากปลายข้าวมีค่า foaming capacity สูงกว่าเคซีน แต่มีค่าต่ำกว่าโปรตีนไข่ขาว โปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าวที่ใช้ mixed enzymes มีค่า foaming capacity ไม่แตกต่างจากโปรตีนไข่ขาว โปรตีนจากรำสกัดไขมันมีค่า foaming capacity ไม่แตกต่างจากโปรตีนจากรำข้าว ในด้าน foaming stability พบว่า โปรตีนจากรำข้าวทั้งสกัดไขมันและไม่สกัดและปลายข้าวมีค่าไม่แตกต่างจากเคซีน และต่ำกว่าไข่ขาว โปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันมี emulsifying activity และ emulsion stability ไม่แตกต่างจากเคซีนและมีค่าต่ำกว่า bovine serum albumin ต่ำกว่า bovine serum albumin โปรตีนจากรำข้าวและรำสกัดไขมันมีค่า emulsifying activity และ emulsion stability ไม่ต่างกันและมีค่าสูงกว่าเคซีน

โปรตีนที่ละลายน้ำได้ (albumin) ที่สกัดได้จากรำข้าวที่ย่อยด้วย mixed enzymes ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 3.8 เป็นเวลา 120 นาที ให้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุด และมี % albumin recovery และ % albumin extracted สูงที่สุด มีองค์ประกอบกรดอะมิโนคุณภาพโปรตีนที่ดี และมีสมบัติการเกิดโฟม และอิมัลชันที่ดี นอกจากนี้ยังมีต้นทุนในการผลิตต่ำกว่าโปรตีนที่สกัดจากปลายข้าวและรำสกัดไขมัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จำรัส โปร่งศิริวัฒนา. 2534. ความรู้เรื่องข้าว. กรุงเทพมหานคร: สถาบันวิจัยข้าว. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สารสนเทศการเกษตร, ศูนย์. 2541. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปีเพาะปลูก 2540/2541. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ภาษาอังกฤษ

Anon. 1991. Product Sheet of α-Amylase. Bagsvaerd: novozymes® Enzymes Process Division.

Anon. 1991. Product Sheet of Cellulase. Bagsvaerd: novozymes® Enzymes Process Division.

Anon. 1991. Product Sheet of Mixed Enzymes. Bagsvaerd: novozymes® Enzymes Process Division.

Anon. 1991. Product Sheet of Protease. Bagsvaerd: novozymes® Enzymes Process Division.

A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis. 12th ed. Washington, D. C. : Association of Official Analytical Chemists, Inc.

Ansharullah, Hourigan, J. A., and Chesterman, C. F. 1997. Application of Carbohydrases in Extracting Protein from Rice Bran. J. Sci. Food Agric. 74: 141-146.

Barber, S., and Barber, C. B. 1980. Rice bran: Chemistry and technology, In B. S. Luh (ed), Rice Production and Utilization, pp. 790-862. Connecticut: AVI Publishing.

Bera, M. B., and Mukherjee, R. K. 1989. Solubility, emulsifying, and foaming property of rice bran protein concentrate. J. Food Sci. 54: 142-145.

Betschart, A. A. 1975. Factors influencing the extractability of safflower protein (Carthamus tinctorius L.). J. Food Sci. 40: 1010-1015.

Betschart, A. A., Fong, R. Y., and Saunders, R. M. 1977. Rice by products: Comparative extraction and precipitation of nitrogen from U. S. and Spanish bran and germ. J. Food Sci. 42: 1088-1093.

Boyce, C. O. L. 1986. Novo's Handbook of Practical Biotechnology. Bagsvaerd: Novo Industry A/S Enzyme Division.

Brooks, J. R., and Griffin, V. K. 1987. Liquefaction of rice starch from milled rice flour using heat-stable α-amylase. J. Food Sci. 52: 712-714.

Bryant, L. A., Montecalvo, J. R., Morey, K. S., and Roy, B. 1988. Processing, functional and nutritional properties of okra seed products. J. Food Sci. 53: 810-816, 856.

Cagampang, G. B., Cruz, L. J., Espiritu, S. G., Santiago, R. G., and Juliano, B. O. 1966. Studies on the extraction and composition of rice proteins. Cereal Chem. 43: 145-155.

Carpenter, K. J., and Woodham, A. A. 1974. Protein quality of feeding –stuffs. 6. Comparisons of the results of collaborative biological assays for amino acids with those of other methods. Br. J. Nutr. 32: 647-660.

Chang, K. C., and Satterlee, L. D. 1979. Chemical, nutritional and microbiological quality of a protein concentrate from culled dry beans. J. Food Sci. 44: 1589-1594.

Chang, K. C., Lee, C. C., and Brown, G. 1986. Production and nutritional evaluation of high-protein rice flour. J. Food Sci. 51: 464-467.

Chaplin, V., and Andrew, A. T. 1989. Functional properties of peptides derived from casein proteolysis. J. Dairy Res. 56:544-548.

Cheryan, M. 1980. Phytic acid interactions in food systems. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 19: 297-335.

Cochran, W. C., and Cox, G. M. 1992. Experimental Design. New York: John Wiley & Sons.

Connor, M. A., Saunders, R. M., and Kohler, G. O. 1976. Rice bran protein concentrates obtained by wet alkaline extraction. Cereal Chem. 53: 488-496.

Crocker, W., and Barton, L. V. 1957. Physiology of Seeds. pp. 26-41. Massachusetts: Chronica Botanica Company.

Damodaran, S. 1990. Interfaces, protein films and foams. Adv. Food Nutr. Res. 34: 1-79.

Damodaran, S. 1994. Structure-function relationship of food proteins, In N. S. Hettiarachchy and G. R. Zieger (eds.), Protein Functionality in Food Systems, pp. 190-225. New York: Marcel Dekker.

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

DeGroot, A. P., and Slump, P. 1969. Effects of severe alkali treatment of protein on amino acid composition and nutritive value. J. Nutr. 98: 45-50.

Eggum, B. O., and Juliano, B. O. 1973. Nitrogen balance in rats fed rices differing in protein content. J. Sci. Food Agric. 24: 421-427.

Evancho, G. M., Hurt, H. D., Devlin, P. A., Landers, R. E., and Ashton, D. H. 1977. Comparison of *Tetrahymena pyriformis W* and rat bioassays for the determination of protein quality. J. Food Sci. 42: 444-448.

FAO/WHO. 1973. Energy and Protein Requirement. WHO Tech. Rep. Ser. No. 522.

FAO/WHO. Protein Quality Evaluation. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. FAO Food Nutr. Paper 51. pp. 23-24. Geneva: FAO, 1991.

Fisher, L. R., and Parker, N. S. 1988. Effect of surfactant on the interactions between emulsion droplets, In E. Dickinson and G. Stainby (eds.), Advances in Food Emulsions and Foams, pp. 45-90. New York: Elsevier Applied Science Publishers.

Ford, J. E. 1960. A microbiological method for assessing the nutritive value of proteins. Br. J. Nutr. 14: 485-497.

Gnanasambandam, R., and Hettiarachchy, N. S. 1995. Protein concentrates from unstabilized and stabilized rice bran: preparation and properties. J. Food Sci. 60: 1066-1069.

Halling, P. J. 1981. Protein-stabilized foams and emulsions. CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 15: 155-158.

Halvay, S., and Grossowicz, N. 1953. A microbiological approach for nutritional evaluation of proteins. Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 82: 567-572.

Hamada, J. S. 1997. Characterization of protein fractions of rice bran to devise effective methods of protein solubilization. Cereal Chem. 74: 662-668.

Hamada, J. S. 2000. Characterization and functional properties of rice bran proteins modified by commercial exoproteases and endoproteases. J. Food Sci. 65: 305-310.

Hansen, L. P., Hosek, R., Callon, M., and Jones, F. T. 1981. The development of high protein rice flour for early childhood feeding. Food Technol. 35: 38-42.

Horn, M. J., Womack, M., and Gersdorff, C. E. F. 1952. Nutritional evaluation of food proteins by measuring availability of amino acids to microorganisms. I. Cottonseed proteins. J. Nutr. 48 231-241.

Houston, D. F., Iwasaki, T., Mohammad, A., and Chen, L. 1968. Radial distribution of protein by solubility classes in the milled rice kernel. J. Agric. Food Chem. 16: 720-724.

Ju, Z. Y., Hettiarachchy, N. S., and Rath, N. 2001. Extraction, denaturation and hydrophobi properties of rice flour proteins. J. Food Sci. 66: 229-232.

Juliano, B. O. 1972. The rice caryopsis and its composition, In D. F. Houston (ed), Rice: Chemistry and Technology, pp. 16-76 . St. Paul: American Association of Cereal Chemists.

Juliano, B. O., and Boulter, D. 1976. Extraction and composition of rice endosperm glutelin. Phytochem. 15: 1601-1607.

Juliano, B. O. 1985. Polysaccharides, proteins and lipids, of rice. In D. F. Houston (ed), Rice: Chemistry and Technology, pp. 79-85 . St. Paul: American Association of Cereal Chemists.

Juliano, B. O. 1992. Structure, Chemistry, and function of the rice grain and its fractions. Cereal Food World. 37: 772-779.

Karel, M. 1973. Protein interactions in biosystems: protein lipid interaction. J. Food Sci. 38: 759-763.

Kato, A., Lee, Y., and Kobayashi, K. Determination and functional properties of food proteins by the treatment with immobilized chymotrypsin at alkaline pH. J. Food Sci. 54: 1345-1349.

Kato, T., Katayama, E., Matsubara, S., Omi. Y., and Matsuda, T. 2000. Release of allergenic proteins from rice grains induced by high hydrostatic pressure. J. Agric. Food Chem. 48: 3124-3129.

Kenedy, B. M. 1975. Nutritional quality of rice endosperm. In: Friedman, M. (ed.) Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds. Part 2. Marcel Dekker: New York.

Kinsella, J. E. 1976. Functional properties of food proteins: a review. CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 7: 219-280.

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

Landers, P. S., and Hamaker, B. R. 1994. Antigenic properties of albumin, globulin, and protein concentrate fractions from rice bran. Cereal Chem. 71: 409-411.

Lasztity, R. 1996. The Chemistry of Cereal Protein. New York: CRC Press Inc.

Leonzio, M. 1966. The lignin content of the principle by-products of rice. Riso. 15: 219-227.

Liu, H. J., Chang, B. Y., Yan, H. W., Yu, F. H., and Liu, X. X.. 1995. Determination of amino acid in food and feed by derivatization with 6-aminoquinolyl-n-hydroxysuccinimidyl carbamate and reverse-phase liquid chromatographic separation. J. AOAC International. 78: 736-744.

Lozsa, A. and Koller, K. 1954. Estimation of the biological value of rice proteins. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 5: 477-481.

Matsuda, T., Sugiyama, M., Nakamura, R., and Torii, S. 1988. Purification and properties of an allergenic protein in rice grain. Agric. Biol. Chem. 52: 1465-1470.

Matsuda, T., Nomura, R., Sugiyama, M., and Nakamura, R. 1991. Immunochemical studies on rice allergenic proteins. Agric. Biol. Chem. 55: 509-513.

Matsuo, Y. and Namba, A. 1958. Hemicellulose in rice grain. J. Fermentation Engin. 36: 190-193.

Mazur, E. G., Schock, Y. J., and Kite, F. E. 1957. Graphical analysis of the brabender viscosity curves of various starches. Cereal Chem. 34: 141-146.

McCall, E. R. 1953. Composition of rice. Influence of variety and environment on physical and chemical composition. J. Agric. Food Chem. 1: 988-993.

McClement, D. J. 1999. Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques. New York: CRC Press.

Miller, D. S., and Bender, A. E. 1955. The determination of the rat utilization of proteins by a shortened method. Br. J. Nutr. 7: 382-391.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-436.

Morita, T., and Kiriyama, S. 1993. Mass production method for rice protein isolate and nutritional evaluation. J. Food Sci. 56: 1393-1396.

Morita, T., Oh-hashi, A., Kasaoka, S., Ikai, M., and Kiriyama, S. 1996. Rice protein isolates produced by the two different methods lower serum cholesterol concentration in rats compared with casein. J. Sci. Food Agric. 71: 415-424.

Morita, Y. and Yoshida, C. 1968. Studies on gamma-globulin of rice embryo. I. Isolation and purification of gamma-globulin from rice embryo. Agric. Biol. Chem. 32: 664-670.

Morup, I.-L.K. and Olesen, E.-S. 1976. New method for prediction of protein value from essential amino acid pattern. Nutr. Rep. Int. 13: 355-362.

Nakai, S. 1983. Structure function relationship of food protein with emphasis on the importance of protein hydrophobicity. J. Agric. Food Chem. 31: 672-681.

Osborne, T. B. and Mendel, L. B. 1914. Nutritive properties of proteins of the maize kernel. J. Biol. Chem. 18: 1-10

Osborne, T. B. 1924. Monographs on biochemistry. The vegetable proteins. pp. 154. London: Longmans, Green and Co.,

Orthoefer, F. T. 1996. Rice bran oil: healthy lipid source. Food Technol. 50: 62-64.

Padhye, E W., and Salunkhe, D. K. 1979. Extraction and characterization of rice proteins. Cereal Chem. 56: 389-393.

Palmiano, Evelyn, P., Almazan, Aurea, M., and Juliano, B. O. 1968. Physicochemical properties of protein of developing and mature rice grain. Cereal Chem. 45: 1-7.

Pascual, F. and Primo, E. 1955. Industrial utilization of the rice by-products. XIII. Nutritional value of defatted rice germ and bran. Ann. Span. Roy. Soc. Phys. Sci. 51: 301-304.

Pasha, M. K., Begum, N., and Baset, Q. A. 1995. Electrophoretic characterization of albumin and globulin proteins of rice grains. Bang. J. Bot. 24: 115-120.

Pearce, K. N., and Kinsella, J. E. 1978. Evaluation of a turbidimetric technique. J. Agric. Food Chem. 26: 716-718.

Peterson, G. L. 1983. Determination of total protein. Meth. Enzymol. 91: 95-121.

Petruccelli, S., Anon, M. C. 1995. Soy protein isolate components and their interactions. J. Agric. Food Chem. 43: 1762-1767.

Prakash, J., and Ramanatham, G. 1994. Effect of stabilization of rice bran on the extractability and recovery of proteins. Die Nahrung. 38: 87-95.

Prakash, J., and Ramanatham, G. 1995. Proximate composition and protein quality of stabilized rice bran. J. Food Sci. Technol. 32: 416-419.

Poole, S., West, S. I., and Fry, J. C. 1986. Lipid tolerant protein foaming systems. Food Hydrocolloids. 1: 45-52.

Scopes, R. K. 1994. Protein Purification: Principles and Practices. New York: Springer-Verlag Heidelberg.

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

Shih, F. F., Champagne., Daigle, K., and Zarins, Z. 1999. Use of enzymes in the processing of protein products from rice bran and rice flour. Nahrung. 43:14-18.

Shih, F. F., and Daigle K. 2000. Preparation and characterization of rice protein isolate. J.A.O.C.S. 77: 885-889.

Solberg, M, Berkowitz, K. A., and Blaschek, H. P. 1979. Rapid evaluation of protein quality of foods using *Clostridium perfringens*. J. Food Sci. 44: 1335-1340.

Tang, S. and Hettiarachchy, N. S. 2002. Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran: II. The roles of amylases, celluclast, and viscozyme in protein extraction[on line].Available from: http://www.ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_11080.htm[2002, June 6]

Villareal, R. M., and Juliano, B. O. 1978. Properties of glutelin from mature and developing rice grain. Phytochem. 17: 177-180.

Wang, M., Hettiarachchy, N. S., Qi, M., Burks, W., and Siebenmorgen, T. 1999. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. J. Agric. Food Chem. 47: 411-416.

Whitaker, J. R. 1994. Principles of Enzymology for the Food Sciences. 2nd ed. New York: Marcel Dekker.

Zayas, J. F. 1997. Functionality of Proteins in Food. New York: Springer-Verlag Heidelberg.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

ก.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (ดัดแปลงจาก AOAC (1990))

อุปกรณ์

Aluminium dish

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Sartorius, A200S)

ตู้อบลมร้อน (Binder, ED)

เดซิกเคเตอร์ (desiccator)

วิธีวิเคราะห์

1. อบ aluminium dish และฝาที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ชั่งน้ำหนัก

2. ชั่งตัวอย่างให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 2 กรัม ใส่ลงใน aluminium dish ที่อบแห้งแล้ว

3. นำไปอบที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

4. นำออกจากตู้อบและทิ้งให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ และชั่งน้ำหนัก

5. นำไปอบต่ออีกประมาณ 1 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่

6. คำนวณปริมาณความชื้นหรือน้ำที่หายไป

การคำนวณ

ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) = $(m_1 - m_2)/m \times 100$

เมื่อ m = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

m_1 = น้ำหนักตัวอย่างและภาชนะก่อนอบ (กรัม)

m_2 = น้ำหนักตัวอย่างและภาชนะหลังอบ (กรัม)

ก.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (ดัดแปลงจาก AOAC (1990))

อุปกรณ์

ชุดวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Kjeldatherm and Vapodest I, Gerhardt, KT 85)

สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Commercial grade) เตรียมให้มีความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์

2. กรดบอริก (A.R. grade) เตรียมให้มีความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์

3. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์ (A.R. grade) เตรียมให้มีความเข้มข้น 0.1 N

4. สารเร่งปฏิกิริยาใช้ Selenium reagent mixture (A.R. grade)

5. กรดซัลฟิวริก (A.R. grade)

6. อินดิเคเตอร์ (สารละลายเมธิลเรดเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายเมธิลีนบลูเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร)

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 2 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อย

2. เติม selenium reagent mixture ซึ่งเป็นสารเร่งปฏิกิริยาประมาณ 5 กรัม และกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาย่อย ย่อยจนของผสมในหลอดย่อยเป็นสีเขียวใส จากนั้นปิดเตาย่อย และทิ้งไว้ให้เย็นเป็นเวลา 30 นาที

3. เตรียมขวดขนาด 500 มิลลิลิตรที่หยดอินดิเคเตอร์ไว้แล้ว 3 หยด เพื่อรับสารที่กลั่นได้ที่ปลายคอนเดนเซอร์ของเครื่องกลั่น เติมสารละลายกรดบอริกที่มีความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

4. นำหลอดตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแล้วต่อเข้ากับเครื่องกลั่น เติมน้ำกลั่นลงในหลอดย่อย หลอดละ 50 มิลลิลิตร เพื่อละลายตะกอนที่เกิดขึ้น เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 70 มิลลิลิตร

5. ในระหว่างการกลั่นจะเกิดแอมโมเนียขึ้น และแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจะถูกจับไว้ด้วยสารละลายกรดบอริกทำให้ได้สารละลายสีเขียว รองรับสิ่งที่กลั่นได้จนมีปริมาตรเท่ากับ 200 มิลลิลิตร

6. ล้างส่วนปลายของคอนเดนเซอร์ด้วยน้ำกลั่นใส่ลงในขวดที่รองรับสิ่งที่กลั่นได้

7.นำสารละลายที่ได้จากการกลั่นทั้งหมดมาไทเทรตกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 0.1 N และมีการวิเคราะห์หาความเข้มข้นที่แน่นอนไว้แล้ว จนได้จุดยุติเป็นสารละลายสีชมพู ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง และวิเคราะห์เช่นเดียวกัน

8. คำนวณหาปริมาณโปรตีน

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{1.4007 \times (V_1 - V_2) \times N \times CF}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (กรัม)}}$$

เมื่อ V_1 = ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

V_2 = ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรต blank (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรต หน่วยเป็น Normal

CF = conversion factor ใช้เปลี่ยนปริมาณไนโตรเจนให้เป็นโปรตีนโดยใช้ค่าเท่ากับ 5.95

ก.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (ดัดแปลงจาก AOAC (1990))

อุปกรณ์

ตู้อบลมร้อน (Binder, ED)

Soxhlet apparatus (Gerhardt)

เดซิกเคเตอร์ (desiccator)

สารเคมี

ปิโตรเลียมอีเทอร์ (A.R. grade)

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างแล้วนำไปอบแห้งให้ได้น้ำหนักประมาณ 5 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1

2. ใส่ตัวอย่างที่ห่อด้วยกระดาษกรองแล้วลงในทิมเบิลซึ่งบรรจุในขวดสกัดที่แห้งสนิทและทราบน้ำหนักที่แน่นอน

3. เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตรลงในขวดสกัด และต่อเข้ากับชุดสกัด ใช้เวลาในการสกัดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

4. ระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์ออกจากไขมันหรือน้ำมันที่สกัดได้

5. นำไขมันหรือน้ำมันที่ได้ในขวดสกัดไปอบที่อุณหภูมิ 100 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่ แล้วทิ้งให้เย็นในเดซิกเคเตอร์

6. ชั่งน้ำหนักของไขมันหรือน้ำมันที่สกัดได้ คำนวณหาปริมาณไขมัน

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักของไขมันที่สกัดได้ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (กรัม)}}$$

ก.4 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (ดัดแปลงจาก AOAC (1990))

อุปกรณ์

เตาเผา (Fisher Scientific, Isotemp)

Crucible

Hot plate

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอน 1 กรัม ใส่ใน crucible ที่ผ่านการเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2. นำตัวอย่างไปเผาบน hot plate จนกระทั่งตัวอย่างไม่มีควัน

3. นำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่

4.ทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ ชั่งน้ำหนัก

5. คำนวณปริมาณเถ้า

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(m_2 - m_1) \times 100}{m}$$

เมื่อ m = น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (กรัม)

m_1 = น้ำหนัก crucible (กรัม)

m_2 = น้ำหนัก crucible และเถ้า (กรัม)

ก. 5 การวิเคราะห์ปริมาณเส้นใย (ดัดแปลงจาก AOAC (1990))

สารเคมี

สารละลายกรดซัลฟิวริกที่มีความเข้มข้น 1.25% w/v

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1.25% w/v

เอธานอลที่มีความเข้มข้น 95%

อุปกรณ์

เตาเผา (Fisher Scientific, Isotemp)

Crucible

Hot plate

กระดาษกรองชนิดปราศจากเถ้า

กระดาษกรอง Whatman No.1

Suction flask

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการสกัดไขมันด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์มาแล้วให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 2 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกที่มีความเข้มข้น 1.25% w/v ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ต้มเดือดเพื่อย่อยตัวอย่างเป็นเวลา 30 นาที ในระหว่างการต้ม

เดือดต้องรักษาระดับสารละลายให้เท่ากับ 200 มิลลิลิตร โดยเติมน้ำร้อนลงไป กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ด้วยการ suction และล้างกากด้วยน้ำร้อนจนหมดฤทธิ์กรด

2. นำกากที่ได้จากการกรองมาย่อยต่อด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1.25% w/v ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ต้มเดือดเพื่อย่อยตัวอย่างเป็นเวลา 30 นาที ในระหว่างการต้มเดือดต้องรักษาระดับสารละลายให้เท่ากับ 200 มิลลิลิตร โดยเติมน้ำร้อนลงไป กรองผ่านกระดาษกรองชนิดปราศจากเถ้าที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอนด้วยการ suction และล้างกากด้วยน้ำร้อนจนหมดฤทธิ์ด่าง

3. ล้างกากด้วยเอธานอล 2 ครั้ง ครั้งละ 30 มิลลิลิตร นำกากที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ทิ้งให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ ชั่งน้ำหนัก อบต่อไปจนได้น้ำหนักคงที่

4. นำกากไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส ทิ้งให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ ชั่งน้ำหนัก เผาต่อไปจนได้น้ำหนักคงที่

การคำนวณ

ปริมาณเส้นใย (เปอร์เซ็นต์) = $(m_1 - m_2)/m \times 100$

เมื่อ m = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

m_1 = น้ำหนักตัวอย่างและภาชนะหลังอบ (กรัม)

m_2 = น้ำหนักตัวอย่างและภาชนะหลังเผา (กรัม)

ก. 6 การวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (Miller, 1959)

โดยคำนวณจากการนำผลรวมขององค์ประกอบอื่นไปหักออกจากหนึ่งร้อย ดังสมการ

CHO = 100 - (M + P + F + A)

เมื่อ CHO = ปริมาณแป้ง (เปอร์เซ็นต์)

M = ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)

P = ปริมาณโปรตีน (เปอร์เซ็นต์)

F = ปริมาณไขมัน (เปอร์เซ็นต์)

A = ปริมาณเถ้า (เปอร์เซ็นต์)

ก.7 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Miller, 1959)

สารเคมี

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2 N

เตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก โดยละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid 2.5 กรัม ลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2 N ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติมโพแทสเซียมโซเดียมทาเทรท 75 กรัม คนจนละลาย เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 250 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

วิธีวิเคราะห์

1. นำสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที
3. ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง
4. เติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
6. คำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคส 0 0.2 0.4 0.8 และ 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นสารมาตรฐาน แสดงดังตารางที่ ก 1 และรูปที่ 1 ก

ตารางที่ ก. 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรของสารละลาย D-glucose ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ D-glucose (กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
0.0	0.000
0.2	0.236
0.4	0.494
0.6	0.808
0.8	1.076
1.0	1.211

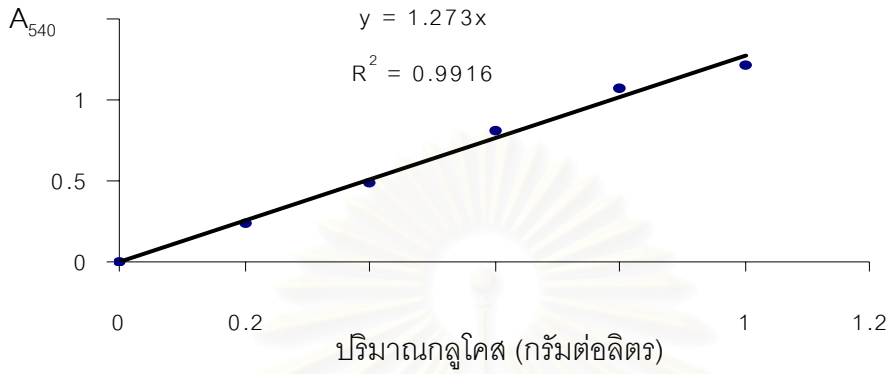
ก. 8 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส (ดัดแปลงจาก Peterson, 1983)

สารเคมี สารละลายแอลคาไลคอปเปอร์ ประกอบด้วย

1.สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตในด่างโดยใช้โซเดียมไบคาร์บอเนต 2 กรัมต่อโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.สารละลาย คอปเปอร์ ซัลเฟต-โพแทสเซียมโซเดียมทาเทรท ($CuSO_4.5H_2O$ 0.5% ใน $NaKC_4H_4O_8$ 1%)



รูปที่ 1 ก กราฟมาตรฐานของสารละลาย D-glucose ความเข้มข้นต่าง ๆ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

เตรียมสารละลายแอลคาไลคอปเปอร์โดยผสมสารละลายข้อ 1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และข้อ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เตรียมใหม่ทุกครั้ง

สารละลายฟีนอล ประกอบด้วย Folin ciocalteas 1 ส่วนผสมกับน้ำขจัดไอออนแล้ว 1 ส่วน

สารละลายดีออกซีโคเลตเข้มข้น 0.1% w/v

กรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 72%

วิธีวิเคราะห์

1. นำสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายดีออกซีโคเลต 0.1% w/v ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 72% ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 x g เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง คว่ำหลอดลงบนกระดาษทิชชู่เพื่อซับน้ำ ระวังไม่ให้ตะกอนหลุดออกมากับส่วนน้ำใส

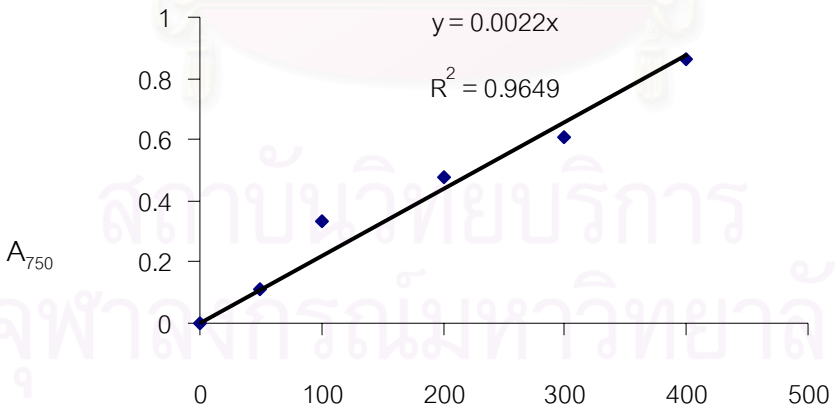
3. เติมสารละลายแอลคาไลคอปเปอร์ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายฟีนอลปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

5. คำนวณความเข้มข้นของโปรตีนในส่วนน้ำใสจากกราฟมาตรฐานซึ่งใช้ bovine serum albumin ปริมาณ 0 50 100 200 300 400 500 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นสารมาตรฐาน แสดงดังตารางที่ ก 2 และรูปที่ 2 ก

ตารางที่ ก. 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรของสารละลาย bovine serum albumin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ bovine serum albumin (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร
0	0.000
50	0.112
100	0.334
200	0.480
300	0.606
400	0.860
500	0.909
600	0.923
700	0.973



รูปที่ 2 ก กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin ความเข้มข้นต่าง ๆ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ภาคผนวก ข
การหาขนาดโมเลกุลของโปรตีน

ข. 1 การวิเคราะห์หาขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) **ตามวิธีของ** Laemmli (1970) **ซึ่งดัดแปลงโดย**

1. อุปกรณ์

ชุด Minigel electrophoresis ยี่ห้อ Hoefer รุ่น mini VE เป็นเครื่องที่ใช้หล่อแผ่นเจล ขนาดกว้าง 8 เซนติเมตร ยาว 9 เซนติเมตร สามารถหล่อเจลพร้อมกันได้ 2 แผ่น มีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างได้ทั้งหมด 10 ช่องต่อเจล 1 แผ่น ต่ออยู่กับเครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้า

2. การเตรียม stock solution แสดงดังตารางที่ ข. 1

ตารางที่ ข. 1 การเตรียมสารเคมีสำหรับทำ SDS-PAGE

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาณที่ใช้
1. Acrylamide solution (เก็บสารละลายในตู้เย็น) acrylamide เข้มข้น 30%, bisacrylamide เข้มข้น 0.8%, 200 ml		
- acrylamide (FW 71.08)	30	60 g
- bisacrylamide (FW 154.17)	0.8	1.6 g
- deionized water	-	to 200 ml
2. 4x Resolving gel buffer (เก็บสารละลายในตู้เย็น) Tris-Cl เข้มข้น 1.5 M, pH 8.8, 200 ml		
- Tris (FW 121.1)	1.5 M	36.3 g
-deionized water	-	150 ml
- HCl	to pH 8.8 $\pm$ 0.05	-
- deionized water	-	to 200 ml

ตารางที่ ข. 1 (ต่อ) การเตรียมสารเคมีสำหรับทำ SDS-PAGE

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาณที่ใช้
3. 4x Stacking gel buffer (เก็บสารละลายในตู้เย็น) Tris-Cl เข้มข้น 0.5 M, pH 6.8, 50 ml		
- Tris (FW 121.1)	0.5 M	3.0 g
- deionized water	-	40 ml
- HCl	to pH 6.8 $\pm$ 0.05	-
- deionized water	-	to 50 ml
4. SDS เข้มข้น 10% (เก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง)		
- SDS (FW 288.38)	10 %	10 g
- deionized water	-	to 100 ml
5. Ammonium persulphate เข้มข้น10% (initiator) (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)		
- ammonium persulphate (FW 228.2)	10 %	0.1 g
- deionized water	-	to 1 ml
6. 2x Treatment buffer (แบ่งใส่หลอดเล็กๆ หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส) Tris-Cl เข้มข้น 0.125 M, SDS เข้มข้น 4%, glycerol เข้มข้น 20% v/v, DTT 0.2 M, bromophenol blue เข้มข้น0.02%, pH 6.8, 10 ml		
สารเคมี		
- 4x stacking gel buffer	0.125 M	2.5 ml
- SDS เข้มข้น 10%	4%	4.0 ml
- glycerol	20%	1.0 ml
- bromophenol blue	0.02%	2.0 mg
- dithiothreitol (DTT; FW 154.2)	10.1 M	0.31 g

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- deionized water	-	to 10.0 ml

ตารางที่ ข. 1 (ต่อ) การเตรียมสารเคมีสำหรับทำ SDS-PAGE

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาณที่ใช้
7. Tank buffer (เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 1 เดือน) Tris 0.025 M, glycine เข้มข้น 0.192 M, SDS เข้มข้น0.1%, pH 8.3, 10 l		
- Tris (FW 121.1)	0.025 M	30.28 g
- glycine (FW 75.07)	0.192 M	144.13 g
- SDS	0.1%	10 g
- deionized water	-	to 10 l

3. **การเตรียม** working solution

3.1 **การเตรียม** resolving gel solution แสดงดังตารางที่ ข. 2

ตารางที่ ข. 2 การเตรียม resolving gel solution เมื่อต้องการแผ่นเจลหนา 1 มิลลิเมตร 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 เข้มข้น 10%	0.3 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Deionized water	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

3.2 **การเตรียม stacking gel solution** แสดงดังตารางที่ ข. 3

ตารางที่ ข. 3 การเตรียม Stacking gel solution สำหรับเจลหนา 1 มิลลิเมตร จำนวน 2 แผ่น

สารเคมี	ปริมาณ
acrylamide solution	0.88 ml
4x stacking gel buffer	1.66 ml
SDS เข้มข้น 10%	66 μl
deionized water	4.06 ml
ammonium persulphate*	33.4 μl
TEMED*	3.3 μl

* เติมแล้วควรหล่อเจลทันที

3.3 **การเตรียมสารละลายสำหรับย้อมเจล**

3.3.1 **การเตรียม fixing solution** แสดงดังตารางที่ ข. 4

ตารางที่ ข. 4 การเตรียม fixing solution ปริมาณ 1 ลิตร

สารเคมี	ปริมาณ
methanol	500 ml
Acetic acid 100%	100 ml
Deionized water	400 ml

3.3.2 **การเตรียม staining solution** แสดงดังตารางที่ ข. 5

ตารางที่ ข. 5 การเตรียม staining solution ปริมาณ 1 ลิตร

สารเคมี	ปริมาณ
coomassie brillant blue stain	2.50 g
Fixing solution	to 1 liter

3.4 **การเตรียม destain solution** แสดงดังตารางที่ ข. 6

ตารางที่ ข 6 การเตรียม destain solution ปริมาณ 1 ลิตร

สารเคมี	ปริมาณ
methanol	70 ml
acetic acid 100%	70 ml
deionized water	860 ml

4. ขั้นตอนการหาขนาดโมเลกุลด้วย SDS-PAGE

4.1 การเตรียมแผ่นอะครีลาไมด์เจล

4.1.1 ล้างแผ่นกระจกสำหรับหล่อเจลด้วยน้ำสะอาด ตามด้วยน้ำ deionized จากนั้นล้างด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์

4.1.2 ประกบแผ่นกระจกทั้งสองแผ่นเข้าหากันโดยใช้แผ่นพลาสติกสีขาวที่มีความหนา 1 มิลลิเมตร คั่นไว้ที่ขอบทั้ง 2 ด้าน

4.1.3 ประกอบแผ่นกระจกเข้ากับตัวเครื่องโดยให้กระจกแผ่นที่มีรอยเว้าหันเข้าด้านในของตัวเครื่อง

4.1.4 ใช้เข็มฉีดยาหรือไมโครปิเปตต์ดูด resolving gel solution ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 12.5% แล้วค่อยๆ หยอดลงในช่องระหว่างแผ่นกระจก ระวังอย่าให้เกิดฟอง ใส่ resolving gel solution จนสารละลายอยู่ต่ำกว่าขอบบนของกระจกแผ่นที่มีรอยเว้าประมาณ 1.5 – 2 เซนติเมตร

4.1.5 หยอด deionized water ปิดทับหน้าเจล ตั้งทิ้งไว้บนพื้นที่เรียบ รอให้เจลแข็ง ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง

4.1.6 ใช้เข็มฉีดยาหรือไมโครปิเปตต์ดูด stacking gel solution ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 4% แล้วค่อยๆ หยอดลงในช่องระหว่างแผ่นกระจก ระวังอย่าให้เกิดฟอง ใส่ stacking gel solution จนสารละลายสูงถึงขอบบนของกระจกแผ่นที่มีรอยเว้า

4.1.7 เสียบหวีพลาสติก (comb) ลงในช่องระหว่างแผ่นกระจก เพื่อให้เกิดช่อง (well) สำหรับหยอดตัวอย่าง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เจลชั้นบนนี้แข็ง ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ดึงหวีพลาสติกออก จะได้แผ่นเจลที่พร้อมสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่าง

4.2 การเตรียมสารละลายโปรตีนตัวอย่างและ molecular weight marker

4.2.1 การเตรียมสารละลายโปรตีนตัวอย่าง

เตรียมสารละลายโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันให้มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำตัวอย่างมาเจือจางด้วย treatment buffer โดยเมื่อเจือจางแล้วสารละลายที่ได้ควรมีความเข้มข้นของโปรตีนในช่วง 8 ไมโครกรัม ในสารละลาย 5 ไมโครลิตร (ปริมาตรที่หยอดลงใน well) เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายที่ได้ใส่ใน microcentrifuge tube นำไปต้มในน้ำกลั่นอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที หากสารละลายมีตะกอนควรนำไปเหวี่ยงแยกก่อนจึงนำสารละลายส่วนใสมาใช้ ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง จะได้ตัวอย่างที่พร้อมสำหรับการวิเคราะห์

4.2.2 การเตรียม molecular weight marker

molecular weight marker ที่ใช้เป็น low molecular weight calibration kit มีปริมาณโปรตีน 576 ไมโครกรัมต่อ vial และมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 6 ชนิด ได้แก่

Phosphorylase b จาก rabbit muscle มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 67 ไมโครกรัม มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 97,000 Da

Albumin จาก bovine serum มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 83 ไมโครกรัม มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 66,000 Da

Ovalbumin จาก chicken egg white มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 147 ไมโครกรัม มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 45,000 Da

Carbonic anhydrase จาก bovine erythrocyte มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 83 ไมโครกรัม มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 30,000 Da

Trypsin inhibitor จาก soybean มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 80 ไมโครกรัม มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 20,100 Da

∝-Lactalbumin จาก bovine milk มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 116 ไมโครกรัม มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 14,400 Da

เตรียมสารละลาย molecular weight marker โดยละลายโปรตีนใน vial ด้วย sample buffer (Tris-HCl เข้มข้น 0.0625 M, SDS เข้มข้น 2%, glycerol เข้มข้น 10% v/v, Dithiothreitol เข้มข้น 0.1 M และ bromophenol blue เข้มข้น 0.01% ที่ pH 6.8) ปริมาตรเท่ากับ 200 ไมโครลิตร แบ่งใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

4.3 วิธีการศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วย SDS-PAGE

4.3.1 ประกอบส่วนแผ่นเจลเข้ากับแทงค์ คลายส่วนฐานของแท่นหล่อเจลออก แล้วใส่สารละลาย tank buffer ลงในช่องด้านหลังของแผ่นกระจกที่ใช้หล่อเจลจนสารละลายท่วมแผ่นเจล แล้วจึงดูดสารละลายตัวอย่างและ molecular weight marker ในข้อ 4.2.1 และ 4.2.2 ตามลำดับ หยอดลงในแต่ละ well ปริมาณ 5 ไมโครลิตรต่อ well

4.3.2 เติม tank buffer ลงในแทงค์ให้อยู่ระหว่างระดับขีดล่างและขีดบนของตัวแทงค์ ต่อชุดวิเคราะห์เข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า กำหนดให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่เท่ากับ 300 โวลต์ และกระแสไฟฟ้าเท่ากับ 20 มิลลิแอมแปร์ กดปุ่ม start

4.3.3 รอจนตัวอย่างวิ่งลงมาตามแผ่นเจลจนสุดขอบล่างของแผ่นเจลโดยมีระยะห่างจากขอบล่างประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ปิดเครื่องแล้วถอดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าออก แกะแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจก

4.3.4 นำแผ่นเจลมาแช่ใน fixing solution ให้ท่วมแผ่นเจลเป็นเวลาประมาณ 30 นาที แล้วจึงนำมาแช่ใน staining solution ให้ท่วมแผ่นเจล เป็นเวลาประมาณ 30 นาที และนำมาแช่ใน destain solution อีกประมาณ 60 นาที และนำไปเขย่าอย่างช้า ๆ บนเครื่องเขย่า

4.3.5 เท destain solution ออกและเปลี่ยน destain solution นำไปเขย่าต่ออีก 60 นาที จะเริ่มมองเห็นแถบโปรตีนที่วิเคราะห์ เท destain solution ออกเปลี่ยนเป็น deionized water แทน แล้วนำไปเขย่าอย่างช้า ๆ บนเครื่องเขย่าประมาณ 24 ชั่วโมง

4.3.6 วัดระยะทางที่สารละลายโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน molecular weight marker และระยะทางที่สีย้อมเคลื่อนที่ได้ และคำนวณเป็นค่า R_f สร้างกราฟมาตรฐานโดยสร้างกราฟระหว่าง logMW และ R_f วิเคราะห์หามวลโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้โดยนำค่า R_f เทียบกับกราฟมาตรฐาน

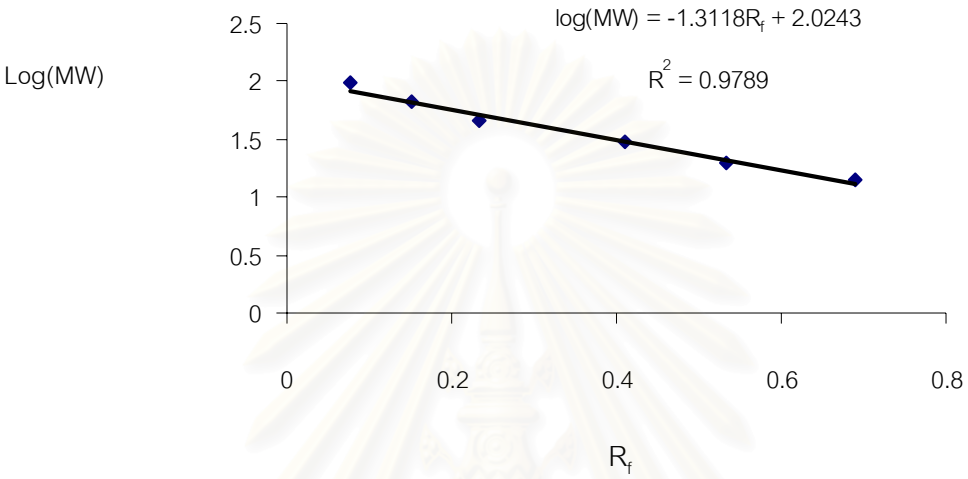
4.3.7 ในการเก็บรักษาเจลที่ได้จะนำแผ่นเจลเก็บในถุงที่มี deionized water อยู่ หรือนำแผ่นเจลที่ได้มาวางบนแผ่นกระจกที่ปูด้วยกระดาษแก้วใส แล้วปิดทับด้วยกระดาษแก้วใสอีกแผ่นหนึ่ง พยายามรีดกระดาษแก้วให้แนบกับแผ่นเจลอย่าให้มีฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง จะได้แผ่นเจลที่แห้ง

4.4 กราฟมาตรฐานและการคำนวณขนาดโมเลกุล

วัดระยะทางที่สารละลายโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน molecular weight marker และสีย้อมเคลื่อนที่และคำนวณค่า R_f โดย

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

ขนาดโมเลกุลและค่า R_f แสดงในตารางที่ ค 8



รูปที่ 1 ข กราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน (low molecular weight calibration kit) ในการศึกษา SDS-PAGE

ข.2 การหามวลโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธี gel filtration

การหามวลโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธี gel filtration ดัดแปลงจากวิธีของ Matsuda และคณะ (1991) มีรายละเอียดดังนี้

การเตรียม sephacryl S-200 HR

sephacryl HR 200 เป็นเจลที่พองตัวเต็มที่และพร้อมที่ใช้งานและมีเอทานอล 20% เป็น preservative มีความหนืดสูงจึงต้องเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะจนเข้มข้นประมาณ 75%

การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน

นำโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล (low molecular weight gel filtration kit) ได้แก่ ribonuclease A มีมวลโมเลกุล 13,700 Da chymotrypsinogen A มีมวลโมเลกุล 25,000 Da ovalbumin มีมวลโมเลกุล 43,000 Da albumin มีมวลโมเลกุล 67,000 Da ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.1 M ให้มีความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

การเตรียม blue dextran 2000

สารละลาย blue dextran 2000 เตรียมได้โดยละลาย blue dextran 2000 ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.1 M ให้มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

การเตรียมตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน

นำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 M ให้โปรตีนมีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

วิธีการบรรจุ sephacryl S-200 HR **ลงคอลัมน์**

1. ตรวจสอบสภาพของคอลัมน์ และตาข่าย ประกอบเครื่องโดยจัดให้คอลัมน์ตั้งอยู่ในแนวตั้งสูงจากพื้นและต่อคอลัมน์เข้ากับ adaptor ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกาะที่ adaptor

2. เติมน้ำกลั่นลงในคอลัมน์ประมาณ 2 เซนติเมตร ปล่อยให้น้ำกลั่นไหลออกมาทางด้านล่างของคอลัมน์เพื่อไล่ฟองอากาศ

3. นำ sephacryl S-200 HR ที่ละลายในน้ำกลั่นและมีความเข้มข้นประมาณ 75% มาบรรจุลงในคอลัมน์แก้วขนาด 1.6 x 100 ซม. ที่อุณหภูมิที่ใช้งานจริง โดยค่อย ๆ เทลงด้านข้างของคอลัมน์ให้มีความสูงประมาณ 1 ใน 4 ของความยาวคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้สักพักจนแยกชั้น ใช้แท่งแก้วกวนผิวหน้าของของเหลวเหนือเจล แล้วจึงเท sephacryl S-200 HR ลงไปอีก ทิ้งให้แยกชั้นและใช้แท่งแก้วกวนผิวหน้าของของเหลวเหนือเจล แล้วจึงเท sephacryl S-200 HR ลงไปอีก ทำเช่นนี้ 2-3 ครั้งในการบรรจุเจลลงคอลัมน์

4. ต่อคอลัมน์เข้ากับปั๊มใช้ขั้นตอนในการบรรจุ 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกใช้อัตราเร็วของการไหล 60 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ขั้นที่สองใช้อัตราเร็วของการไหล 20 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยใช้ตัวชะ คือ สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 M

5. ทิ้งให้เจลแพ็คตัวกันและมีของเหลวเหนือเจลประมาณ 1 เซนติเมตร ถ้าเจลแพ็คตัวกันดีแล้วระดับเจลหลังจากใช้ตัวชะชะคอลัมน์ที่อัตราเร็วของการไหล 20 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เป็นเวลา 3 ชั่วโมงจะไม่แตกต่างจากที่อัตราเร็วของการไหล 60 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เป็นเวลา 3 ชั่วโมงหรือแตกต่างน้อยมาก

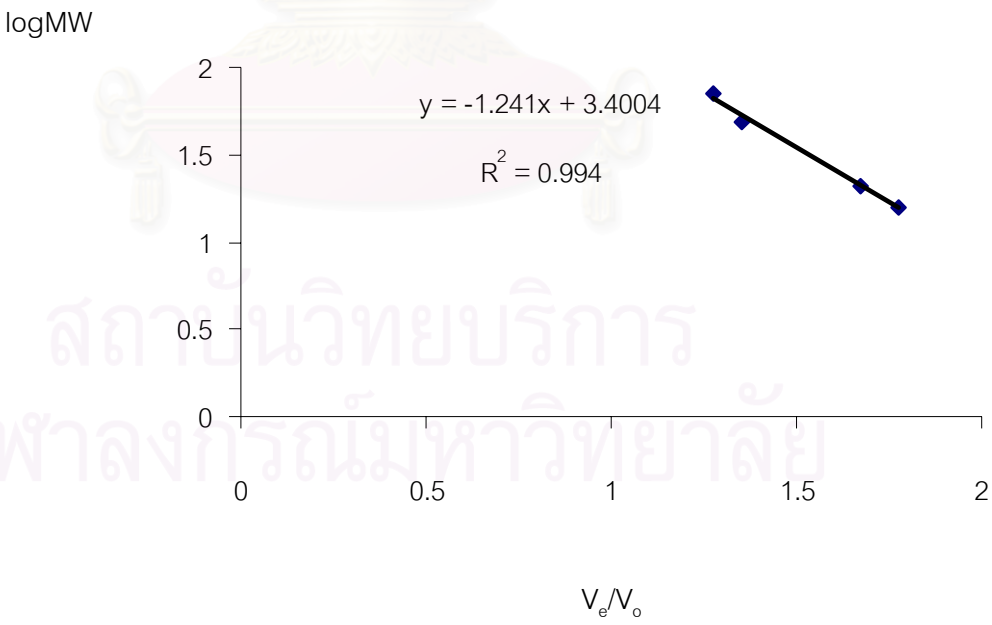
วิธีการวิเคราะห์หามวลโมเลกุลของโปรตีน

1. ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่เตรียมได้โดยผ่านสารละลาย blue dextran 2000 เข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรลงไปบนคอลัมน์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.1 M เป็นตัวชะ เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร นำหลอดที่ได้มาวัดค่า

การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร หาค่า void volume (V_o) ของคอลัมน์โดยวัดปริมาตรที่สารละลาย blue dextran 2000 ผ่านคอลัมน์ออกมา

2. เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานของ ribonuclease A ผสมกับ ovalbumin ให้มีความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผ่านลงไปบนคอลัมน์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 M เป็นตัวชะ เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร นำหลอดที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จะได้ elution volume (V_e) หรือปริมาตรของโปรตีนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ หน่วยเป็นมิลลิลิตร และเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานของ albumin ผสมกับ chymotrypsinogen A ให้มีความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกับ ribonuclease A ผสมกับ ovalbumin สร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานโดยสร้างกราฟระหว่าง logMW และ V_e/V_o

3. นำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 M ให้โปรตีนมีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผ่านลงไปบนคอลัมน์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกับโปรตีนมาตรฐาน คำนวณค่า V_e/V_o และหามวลโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน



รูปที่ 2 ข กราฟมาตรฐานของ protein marker (albumin ovalbumin alpha-chymotrypsinogen A และ ribonuclease A) เมื่อศึกษา gel filtration ใช้คอลัมน์ Sephacryl S-200 HR

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ

ค. 1 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนโดยวิธี AccQ. Tag (Liu **และคณะ**, 1995)

วิธี AccQ. Tag เป็นวิธีที่ Waters พัฒนาขึ้นและเป็นวิธีที่ง่าย สะดวกและใช้สารเคมีน้อย ซึ่งแต่เดิมใช้สารเคมีทำอนุพันธ์กับกรดอะมิโนแบบ pre-column ก่อนฉีดตัวอย่างเข้าสู่ separating column แล้วตรวจวัดสัญญาณ (sensitivity) ของแต่ละอนุพันธ์ของกรดอะมิโนด้วยเครื่องตรวจวัดสัญญาณ (detector) สารเคมีที่มักนำมาทำอนุพันธ์กับกรดอะมิโน เช่น OPA (orthophthaldehyde) PITC (phenylisothiocyanate) หรือ FMOC-Cl (fluorenyl methyl chloroformate) แต่อย่างไรก็ตามการทำอนุพันธ์กรดอะมิโนด้วยสารเคมีดังกล่าวนั้น อนุพันธ์ที่ได้มักจะไม่เสถียร สารเคมีจะทำปฏิกิริยาเฉพาะ single amino acid เท่านั้น หรือถูกรบกวนจากสารเคมีที่มากเกินไป ทำให้เกิดการปนเปื้อน (peak interfere) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อทำอนุพันธ์แล้วนำมาวิเคราะห์ใหม่ในแต่ละครั้ง ปริมาณที่วัดได้มักไม่เท่าเดิม จึงทำให้ความเชื่อถือในการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนด้วยวิธีการทำอนุพันธ์ดังกล่าวได้รับความนิยมลดลง

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ tryptophan **ด้วย** barium hydroxide ($Ba(OH)_2$)

1.บดลดขนาดตัวอย่างด้วย Cyclotec sample mill

2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างให้ได้ประมาณ 20-150 มิลลิกรัม

3. ใส่ตัวอย่างลงใน evaporating flask

4. เติม barium hydroxide ($Ba(OH)_2.8H_2O$) 4.2 กรัม

5. เติมน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ต่อเข้ากับเครื่อง condensor

6. จุ่มลงใน oil bath ที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

7. ทำให้ hydrolysate เย็นลงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ทันทีบน ice bath

8. ปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นและใช้ $Ba(OH)_2.8H_2O$ 8.4% ในการเจือจางขั้นต่อไป

9. หมุนเหวี่ยงและกรองผ่านกระดาษกรอง 0.22 ไมครอน กรองเอาเฉพาะส่วนน้ำใส

10. วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนด้วย HPLC

Chromatographic condition:

Injection volume: 5 μL

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ

ค. 1 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนโดยวิธี AccQ. Tag (Liu และคณะ, 1995)

วิธี AccQ. Tag เป็นวิธีที่ Waters พัฒนาขึ้นและเป็นวิธีที่ง่าย สะดวกและใช้สารเคมีน้อย ซึ่งแต่เดิมใช้สารเคมีทำอนุพันธ์กับกรดอะมิโนแบบ pre-column ก่อนฉีดตัวอย่างเข้าสู่ separating column แล้วตรวจวัดสัญญาณ (sensitivity) ของแต่ละอนุพันธ์ของกรดอะมิโนด้วยเครื่องตรวจวัดสัญญาณ (detector) สารเคมีที่มักนำมาทำอนุพันธ์กับกรดอะมิโน เช่น OPA (orthophthaldehyde) PITC (phenylisothiocyanate) หรือ FMOC-Cl (fluorenyl methyl chloroformate) แต่อย่างไรก็ตามการทำอนุพันธ์กรดอะมิโนด้วยสารเคมีดังกล่าวนั้น อนุพันธ์ที่ได้มักจะไม่เสถียร สารเคมีจะทำปฏิกิริยาเฉพาะ single amino acid เท่านั้น หรือถูกรบกวนจากสารเคมีที่มากเกินไป ทำให้เกิดการปนเปื้อน (peak interfere) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อทำอนุพันธ์แล้วนำมาวิเคราะห์ใหม่ในแต่ละครั้ง ปริมาณที่วัดได้มักไม่เท่าเดิม จึงทำให้ความเชื่อถือในการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนด้วยวิธีการทำอนุพันธ์ดังกล่าวได้รับความนิยมลดลง

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ tryptophan ด้วย barium hydroxide ($Ba(OH)_2$)

1.บดลดขนาดตัวอย่างด้วย Cyclotec sample mill

2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างให้ได้ประมาณ 20-150 มิลลิกรัม

3. ใส่ตัวอย่างลงใน evaporating flask

4. เติม barium hydroxide ($Ba(OH)_2.8H_2O$) 4.2 กรัม

5. เติมน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ต่อเข้ากับเครื่อง condensor

6. จุ่มลงใน oil bath ที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

7. ทำให้ hydrolysate เย็นลงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ทันทีบน ice bath

8. ปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นและใช้ $Ba(OH)_2.8H_2O$ 8.4% ในการเจือจางขั้นต่อไป

9. หมุนเหวี่ยงและกรองผ่านกระดาษกรอง 0.22 ไมครอน กรองเอาเฉพาะส่วนน้ำใส

10. วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนด้วย HPLC

Chromatographic condition:

Injection volume: 5 μL

Column: Reverse phase, AccQ. Tag C_{18}

Column temperature: 52°C

Mobile phase: 0.07 N sodium acetate with 0.25 ml/l triethylamine, pH 4.5

Flow rate: 0.5 ml/min

Run time: 18 min

Fluorometric detection: 280 nm, 340 nm

Standard curve of tryptophan (in 8.4% $Ba(OH)_2.8H_2O$): 10, 25, 50 and 75 pmol/5 µL

วิธีวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน (ยกเว้น tryptophan)

ใช้วิธี Reverse phase chromatography with pre-column technique

อุปกรณ์: HPLC, WATERS 2690

ภาวะ:

oxidation ก่อน hydrolysis (สำหรับวิเคราะห์ cystine และ methionine)

ไม่ oxidation สำหรับวิเคราะห์กรดอะมิโนทุกตัว

วิธีวิเคราะห์:

1. oxidation ก่อน hydrolysis (สำหรับ cystine และ methionine)
   1.1 เติมกรดเพอร์ฟอร์มิกและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0-5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
   1.2 เติมกรดไฮโดรโบรมิกที่อุณหภูมิห้อง
   1.3 ระเหยที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (ภายใต้ vacuum pressure) จนกระทั่งแห้ง
   1.4 ย่อยตัวอย่างด้วยกรดไฮโดรคลอริก ที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 ชั่วโมง
   1.5 ปรับ pH เป็น 2.2
   1.6 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนด้วย AccQ Tag method (WATERS's system)
2. ไม่ oxidation สำหรับกรดอะมิโนทุกตัว
   2.1 ย่อยตัวอย่างด้วยกรดไฮโดรคลอริก ที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 ชั่วโมง
   2.2 ปรับ pH เป็น 2.2
   2.3 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนด้วย AccQ Tag method (WATERS's system)

Chromatographic condition:

Injection volume: 5 µL

Column: reverse phase, AccQ. Tag C_{18}

Column temperature: with oxidation 49°C and without oxidation 37°C

Mobile phase: acetonitrile and buffer

Flow rate: gradient

Run time: with oxidation 50 min and without oxidation 60 min

Detection: fluorescence

Standard curve of Standard amino acid:

With oxidation 25, 50 and 75 pmol/5 μL

Without oxidation 12.5, 25, 50, 75 and 100 pmol/5 μL

ค.2 วิธีการวิเคราะห์ค่า Protein Efficiency Ratio (PER) (A.O.A.C., 1990)

แบ่งเป็นการวิเคราะห์ค่า C-PER และ DC-PER โดยการวิเคราะห์ค่า C-PER จะวิเคราะห์จากองค์ประกอบของกรดอะมิโนร่วมกับค่า digestibility ในขณะที่การวิเคราะห์ค่า DC-PER จะวิเคราะห์จากองค์ประกอบของกรดอะมิโนเท่านั้น

สารเคมี

1. เคซีน

2. สารละลายเอนไซม์ A ของ porcine pancreatic trypsin type IX 227,040 BAEE unit ผสมกับ ∝-chymotrypsin type II 1,860 BAEE unit ผสมกับ peptidase ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3. สารละลายเอนไซม์ B bacterial protease type XIV 65 casein unit ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างให้มีไนเตรเจน 10 mg N ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร

2. เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แช่ไว้ 1 ชั่วโมง

3. equilibrate เคซีนและตัวอย่างโปรตีน และเอนไซม์ที่ใช้ให้มี pH 8 $\pm$ 0.03 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บเอนไซม์บนอ่างน้ำแข็ง

4 .equilibrate control ด้วยการเติมสารละลายเอนไซม์ A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 19 นาที

5. เติมสารละลายเอนไซม์ B ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัด pH ทันทีหลังจากบ่มด้วยสารละลายเอนไซม์ A เป็นเวลา 20 นาที (X)

6. คำนวณ % digestibility จากสูตร

$$\% \text{ digestibility} = 234.84-22.56(X)$$

ค. 2.1 การวิเคราะห์ค่า C-PER

1. ทำปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นแต่ละตัวให้อยู่ในรูป %FAO จากสูตร

% FAO = [(g aa./16 g N)/FAO/WHO std] x %digestibility

กรดอะมิโนจำเป็นตาม FAO/WHO std มีค่าดังนี้ lys = 5.44 met+cys = 3.52 thr = 4.00 ile = 4.00 leu = 7.04 val = 4.96 phe+tyr = 6.08 และ trp = 0.96 ตัวอย่างโปรตีนต้องมีปริมาณ cystine และ tyrosine ปริมาณไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ของ met+cys และ phe+tyr ตามลำดับ ค่า %FAO แสดงดังตารางที่ ค. 1

ตารางที่ ค. 1 ค่า %FAO ของโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าว รำสกัดไขมันและเคซีน

	FAO/WHO	%FAOเคซีน.	%FAO_A	%FAO_B	%FAO_C
Thr	4.00	106.86	20.74	99.02	56.96
Val	4.96	132.79	33.46	108.89	36.75
Leu	7.04	127.16	35.36	83.16	24.32
Ile	4.00	128.59	20.74	83.36	25.71
Lys	5.44	144.46	15.25	87.77	54.45
Trp	0.96	124.15	86.43	159.78	71.20
Phe+tyr	6.08	161.53	27.30	108.14	29.98
Met+cys	3.52	99.79	47.15	107.61	51.78

%FAO_A หมายถึง %FAO ของโปรตีนจากปลายข้าว

%FAO_B หมายถึง %FAO ของโปรตีนจากรำข้าว

%FAO_C หมายถึง %FAO ของโปรตีนจากรำสกัดไขมัน

2. ปรับค่า %FAO โดยพิจารณาดังนี้

2.1 ถ้า %FAO มีค่ามากกว่า 90 % และมี leu น้อยกว่า 135 % .ทำต่อข้อ 3

2.2 ถ้า %FAO มีค่ามากกว่า 100 % ลดค่าให้เป็น 100 % ทำต่อข้อ 3

3. คำนวณค่า X และ Y ของตัวอย่างโปรตีนและเคซีนดังนี้

$X = \sum[(1/\%FAO/WHO \text{ ของกรดอะมิโนแต่ละตัว})(wt)]$

$Y = \sum wt$

ค่า 1/%FAO/WHO*wt แสดงดังตารางที่ ค. 3 เลือกค่า wt จาก %FAO/WHO ของกรดอะมิโนแต่ละตัวจากตารางที่ ค. 2

ตารางที่ ค. 2 ค่า wt เมื่อปัดค่า %FAO/WHO ให้เป็นจำนวนเต็ม

%FAO/WHO	wt
≥100	1
91-99	2
81-90	2.83
71-80	4
61-70	5.66
51-60	8
41-50	11.31
31-40	16
21-30	22.63
11-20	32
0-10	45.25

Y ของเคซีนเท่ากับ 100 Y ของโปรตีนจากปลายข้าวเท่ากับ 22.86 Y ของโปรตีนจากรำข้าวเท่ากับ 90.32 Y ของโปรตีนจากรำสกัดไขมันเท่ากับ 31.84

4. คำนวณค่า Y/X จะได้เป็นค่า essential amino acid score ของตัวอย่างโปรตีนและเคซีน

5. นำค่า Y/X ของตัวอย่างโปรตีนหารด้วย Y/X ของเคซีน เรียกค่านี้ว่า ratio ถ้า ratio อยู่ในช่วง 0.99-1.01 ถือว่าตัวอย่างมีค่า C-PER เท่ากับ 2.5 (ตัวอย่างเป็นเคซีน)

6. คำนวณค่า Z โดย Z = ratio x 2.5

7. คำนวณ discriminant value เพื่อแบ่งกลุ่มตัวอย่าง จากสมการ discriminant ดังนี้

กลุ่มที่ 1 = -671.8418-6.57689(lys)+3.56696(met+cys)+
13.10145(thr)+2.54503(ile)+16.9981(leu)-0.43395(val)-
11.5244(phe+tyr)+31.55321(trp)+14.59278(digestibility)

ตารางที่ ค. 3 ค่า X ของโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าว รำสกัดไขมันและเคซีน

	(1/%FAO_casein)(wt)	(1/%FAO_A)(wt)	(1/%FAO_B)(wt)	(1/%FAO_C)(wt)
Thr	0.01	1.09	0.02	0.14
Val	0.01	0.48	0.01	0.44
Leu	0.01	0.45	0.03	0.93
Ile	0.01	1.09	0.03	0.88
Lys	0.01	2.10	0.03	0.15
Trp	0.01	0.03	0.01	0.06
Phe+tyr	0.01	0.83	0.01	0.53
Met+cys	0.01	0.17	0.01	0.11

(1/%FAO _A)(wt) หมายถึง ค่า (1/%FAO)(wt) ของโปรตีนจากปลายข้าว

(1/%FAO _B)(wt) หมายถึง ค่า (1/%FAO)(wt) ของโปรตีนจากรำข้าว

(1/%FAO _C)(wt) หมายถึง ค่า (1/%FAO)(wt) ของโปรตีนจากรำสกัดไขมัน

กลุ่มที่ 2 = -666.4492-2.78584(lys)+5.17441(met+cys)+
13.08564(thr)+4.61808(ile)+16.22603(leu)-1.63223(val)-
10.13673(phe+tyr)+32.60196(trp)+14.11668(digestibility)

กลุ่มที่ 3 = -619.0813-3.13909(lys)+4.26918(met+cys)+10.00988(thr)-
1.42144(ile)+15.7547(leu)+5.6604(val)-
11.28705(phe+tyr)+30.49168(trp)+13.79953(digestibility)

กลุ่มที่ 4 = -744.7122-0.37674(lys)+6.03697(met+cys)+11.51527(thr)
+1.63251(ile)+17.29687(leu)+3.0294(val)-
11.5033(phe+tyr)+37.88725(trp)+14.68169(digestibility)

ผลการคำนวณค่า discriminant แสดงดังตารางที่ ค. 4 จะเห็นได้ว่ากลุ่มที่ 3 ให้ค่ามากที่สุดในโปรตีนทุกตัวอย่าง ดังนั้น เลือกสมการในการคำนวณค่า C-PER ตามกลุ่มที่ 3 ในข้อ 8

8. คำนวณค่า C-PER จากกลุ่มดังสมการต่อไปนี้ โดยเลือกกลุ่มจากค่า discriminant ที่มีค่ามากที่สุดจากสมการ discriminant ในข้อ 7

ตารางที่ ค. 4 ค่า discriminant ของโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน

	ปลายข้าว	รำข้าว	รำสกัดไขมัน
กลุ่มที่ 1	281.93	534.96	305.30
กลุ่มที่ 2	271.39	548.81	307.35
กลุ่มที่ 3	296.75	557.22	323.87
กลุ่มที่ 4	246.88	551.73	285.82

กลุ่มที่ 1: C-PER = 1.12683-1.61426(Z)+0.99306(Z^2)

กลุ่มที่ 2: C-PER = -7.25391+8.14063(Z)-1.79517(Z^2)

กลุ่มที่ 3: C-PER = 4.30469-1.99609(Z)+0.45996(Z^2)

กลุ่มที่ 4: C-PER = 12.75-8.21484(Z)+1.66016(Z^2)

ค. 2.2 **การวิเคราะห์ค่า** DC-PER

1. คำนวณค่า discriminant ของตัวอย่างโปรตีนและเคซีนดังต่อไปนี้ เพื่อเลือกกลุ่มในการคำนวณค่า % digestibility

กลุ่มที่ 1 = -203.7537-2.59402(lys)+9.27153(leu)+19.36964(asp)
+4.19676(pro)+12.46035(cys)+34.3075(amm)

กลุ่มที่ 2 = -150.3707-0.78115(lys)+7.6239(leu)+15.46558(asp)+
3.8947(pro)+12.79949(cys)+29.74493(amm)

กลุ่มที่ 3 = -155.9532+4.61135(lys)+7.85429(leu)+13.25949(asp)+
4.68431(pro)+13.2907(cys)+19.89403(amm)

ผลการคำนวณค่า discriminant แสดงดังตารางที่ ค. 5

ตารางที่ ค. 5 ค่า discriminant ของโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน

	ปลายข้าว	รำข้าว	รำสกัดไขมัน
กลุ่มที่ 1	-2.19	211.19	127.41
กลุ่มที่ 2	23.92	205.10	130.06
กลุ่มที่ 3	18.87	211.38	122.11

จากตารางที่ ค. 5 จะเห็นได้ว่าค่า discriminat ที่มีค่ามากที่สุดของโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันอยู่ในกลุ่มที่ 2 3 และ 2 ตามลำดับ ดังนั้น เลือกสมการการคำนวณ digestibility ที่ 2 3 และ 2 ในการคำนวณค่า digestibility ของ โปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน

digestibility กลุ่มที่ 1 = 67.8263+0.60144(lys)-1.73309(leu)+2.48377(asp)+2.03523(pro)-0.97312(cys)-6.44299(amm)

digestibility กลุ่มที่ 2 = 160.5607+5.7998(lys)-2.20744(leu)-7.35627(asp)-0.85275(pro)+6.11058(cys)-14.54944(amm)

digestibility กลุ่มที่ 3 = 116.5451+0.99537(lys)-4.37473(leu)-0.10243(asp)-0.06304(pro)-0.14005(cys)+3.48679(amm)

2. ขั้นที่ 2-6 ทำเหมือนการวิเคราะห์หาค่า C-PER

3. คำนวณค่า discriminant ตามสมการดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 = -350.9675+2.34642(lys)-8.60862(met+cys)-13.80721(thr)+11.71013(ile)+11.7984(leu)-12.10787(val)+9.68089(phe+tyr)+46.88927(trp)+7.291(digestibility)

กลุ่มที่ 2 = -454.6516+7.83575(lys)-14.3054(met+cys)-15.64592(thr)+13.32306(ile)+14.1817(leu)-17.40405(val)+12.36894(phe+tyr)+64.39914(trp)+8.00712(digestibility)

กลุ่มที่ 3 = -405.9275+5.01252(lys)-8.46439(met+cys)-15.014(thr)+10.1986(ile)+11.91023(leu)-9.50181(val)+9.46879(phe+tyr)+49.43095(trp)+7.78124(digestibility)

กลุ่มที่ 4 = -488.5569+9.3207(lys)-11.36379(met+cys)-15.24675(thr)+10.60119(ile)+13.93578(leu)-1.14625(val)+10.15707(phe+tyr)+63.1489(trp)+8.22588(digestibility)

ผลการคำนวณ แสดงดังตารางที่ ค. 6

ตารางที่ ค. 6 ค่า discriminant ของโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน

	ปลายข้าว	รำข้าว	รำสกัดไขมัน
กลุ่มที่ 1	687.93	416.25	347.23
กลุ่มที่ 2	696.83	419.26	332.76
กลุ่มที่ 3	756.73	521.12	403.66
กลุ่มที่ 4	704.58	433.61	338.57

จากตารางที่ ค. 6 จะเห็นได้ว่ากลุ่มที่ 3 ให้ค่ามากที่สุดในโปรตีนทุกตัวอย่าง ดังนั้น เลือกสมการในการคำนวณค่า DC-PER ตามกลุ่มที่ 3 ในข้อ 4

4. คำนวณค่า DC-PER จากกลุ่มดังสมการต่อไปนี้ โดยเลือกกลุ่มที่ 3 ในการคำนวณ

กลุ่มที่ 1: DC-PER = 1.254-2.04932(Z)+1.30629(Z^2)

กลุ่มที่ 2: DC-PER = -4.08594+5.125(Z)-1.08398(Z^2)

กลุ่มที่ 3: DC-PER = 4.66406-2.29297(Z)+0.50586(Z^2)

กลุ่มที่ 4: DC-PER = 10.44141-5.93359(Z)+1.13281(Z^2)

ค.3 วิธีการวิเคราะห์ค่า PDCAAS

1. วิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนจำเป็น
2. คำนวณ uncorrected amino acid score โดย

$$\text{uncorrected essential amino acid ratio} = \frac{\text{มก. EAA ในโปรตีน 1 กรัม}}{\text{มก. EAA ในโปรตีนมาตรฐาน 1 กรัม}}$$

3. วิเคราะห์ค่า digestibility
4. คำนวณค่า PDCAAS โดย

PDCAAS = digestibility (%) x limting amino acid score

ผลการคำนวณแสดงดังตารางที่ ค. 7

ตารางที่ ค. 7 ค่า PDCAAS ของแสดงโปรตีนจากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน

โปรตีน	digestibility (%)	amino acid score	PDCAAS	PDCAAS
Casein	89.60	1.19	1.00	1.00
ไข่*	97.00	1.19	1.00	1.00
Wheat gluten	96.00	0.26	0.25	0.25
ปลายข้าว	58.03	0.16	0.09**	0.12***
รำข้าว	72.01	0.74	0.54**	0.62***
รำสกัดไขมัน	61.58	0.27	0.17**	0.19***

* ที่มา: FAO/WHO/UNU (1985)

**คะแนนกรดอะมิโนที่ใช้คำนวณคิดเทียบกับเคซีน

***คะแนนกรดอะมิโนที่ใช้คำนวณคิดเทียบกับโปรตีนจากไข่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่

ง. 1 วิธีวิเคราะห์สมบัติการเกิดฟอง ดัดแปลงจากวิธีของ Kato และคณะ (1989)

วิธีวิเคราะห์ค่า Foaming capacity และ Foaming stabiliy

1. เตรียมโปรตีนให้มีความเข้มข้น 0.2% ในสารละลาย phosphate buffer 0.05 M pH 7.4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
2. กวนด้วยเครื่อง hand homogenizer ที่ความเร็วรอบเบอร์ 5 เป็นเวลา 30 วินาที
3. วัดปริมาตรที่เวลา 0 นาที Foaming capacity มีหน่วยเป็นมิลลิลิตร
4. ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที วัดปริมาตร
5. คำนวณค่า Foaming stability จากสูตร

$$\text{Foaming stability} = V_0/(\Delta t/\Delta V)$$

ΔV = ปริมาตรที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที

Δt = เวลาที่เปลี่ยนแปลงไป (30 นาที)

V_0 = ปริมาตรที่เวลา 0 นาที

ง. 2 วิธีวิเคราะห์สมบัติการเกิดอิมัลชัน ดัดแปลงจากวิธีของ Pearce และ Kinsella (1978)

วิธีวิเคราะห์ค่า Emulsion activity และ Emulsifying stabiliy

1. เตรียมโปรตีนให้มีความเข้มข้น 1% ในน้ำกลั่น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7
2. เติมน้ำมันถั่วเหลือง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
3. กวนด้วยเครื่อง hand homogenizer ที่ความเร็วรอบเบอร์ 6 เป็นเวลา 1 นาที
4. ปิเปตสารละลายมา 50 ไมโครลิตร ที่เวลา 0 และ 10 นาที เติมสารละลาย SDS เข้มข้น 0.1% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร
6. คำนวณ Emulsifying stability จากสูตร

$$\text{Emulsifying stability} = T_0/(\Delta t/\Delta T)$$

ΔT = ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที

Δt = เวลาที่เปลี่ยนแปลงไป (10 นาที)

T_0 = ค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 0 นาที

ภาคผนวก จ
การวิเคราะห์สมบัติด้านความหนืดของแป้ง

ดัดแปลงจากวิธีของ Mazurs และคณะ (1957) โดยเปลี่ยนระยะเวลาในช่วงควบคุมให้อุณหภูมิคงที่ที่ 95 องศาเซลเซียส และ 50 องศาเซลเซียสให้สั้นลงจาก 60 นาทีเป็น 15 นาที

อุปกรณ์ Brabender Viscoamylograph รุ่น Viskograph PT100

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างแป้งโดยคิดเป็นน้ำหนักแห้ง 30 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นให้ได้น้ำหนักทั้งหมด 500 กรัม ใช้แท่งแก้วคนกวนไม่ให้แป้งตกตะกอน จากนั้นจึงเทน้ำแป้งใส่ลงในภาชนะใส่ตัวอย่าง (bowl) ของเครื่องซึ่งได้ประกอบกับตัวเครื่องแล้ว ใช้แท่งแก้วกวนให้เข้ากัน

2. ประกอบกับตัวเครื่อง Brabender และให้เครื่องเริ่มทำงาน

3. ปรับภาวะการทำงานของเครื่อง ดังนี้

3.1 ให้เครื่องกวนมีอัตราเร็ว 75 รอบต่อนาที

3.2 การตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิ ดังนี้ คือ

3.2.1 ให้อุณหภูมิสูงขึ้นในอัตราเร็ว 1.5 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนกระทั่งอุณหภูมิถึง 95 องศาเซลเซียส

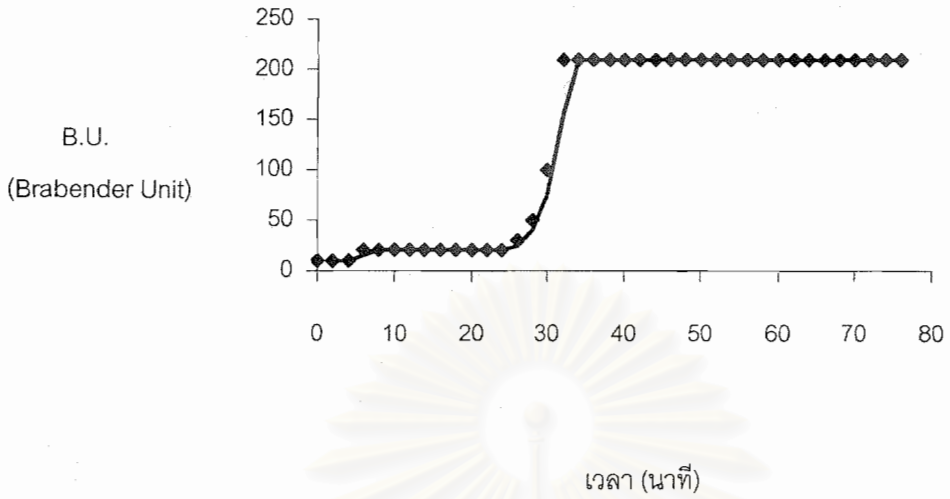
3.2.2 คงอุณหภูมิไว้ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.2.3 ให้อุณหภูมิลดลงในอัตราเร็ว 1.5 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนกระทั่งอุณหภูมิลดลงถึง 50 องศาเซลเซียส

3.2.4 คงอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. ถ้าขณะเดินเครื่องเส้นกราฟความหนืดเพิ่มขึ้นจนสุดสเกลให้ถ่วงด้วยตุ้มน้ำหนักขนาด 125 กรัม ซึ่งมีค่าเท่ากับความข้นหนืด 500 BU. หรือตุ้มน้ำหนักขนาด 250 กรัม ซึ่งมีค่าเท่ากับความข้นหนืด 1,000 BU.

5. นำกราฟการเปลี่ยนแปลงความข้นหนืดของตัวอย่างน้ำแป้งมาวิเคราะห์ผล



รูปที่ 1 จ Brabender Viscoamylograph ของแป้งจากปลายข้าว

1 ช่องเท่ากับ 1 นาที มีอุณหภูมิเท่ากับ 1.5 องศาเซลเซียส
ดังนั้น 30 ช่อง เท่ากับ 30 นาที มีอุณหภูมิเท่ากับ 30 X 1.5 เท่ากับ 45 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิที่ทำให้เกิดเจลเท่ากับ 50 + 45 เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการทำให้เกิดเจล 30 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ ฉ.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีนในส่วนน้ำใสเมื่อทำให้แป้งสุกและไม่ได้ทำให้แป้งสุกก่อนการบ่มด้วย α-amylase ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และ protease ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 6 เป็นเวลา 60 นาที

SOV	df	MS	
		α-amylase	protease
การเตรียมวัตถุดิบ	1	56.160*	22.005*
Error	10	0.236	0.044

*หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฉ. 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสเมื่อทำให้แป้งจากรำข้าวสุกและไม่ได้ทำให้แป้งรำข้าวสุกก่อนการบ่มด้วย α-amylase cellulase mixed enzymes และ protease ที่ภาวะการสกัดต่าง ๆ

SOV	df	MS			
		α-amylase	cellulase	mixed enzymes	protease
การเตรียมวัตถุดิบ	1	0.007**	0.047**	4.142**	0.770**
Error	10	2.058	1.154	1.839	0.407

**หมายถึงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ฉ. 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใสเมื่อทำให้แป้งจากรำสกัดไขมันสุกและไม่ได้ทำให้แป้งรำสกัดไขมันสุกก่อนการบ่มด้วย α-amylase cellulase mixed enzymes และ protease ที่ภาวะการสกัดต่าง ๆ

SOV	df	MS			
		α-amylase	cellulase	mixed enzymes	protease
การเตรียมวัตถุดิบ	1	0.314**	3.786**	1.527**	0.291**
Error	10	5.757	5.281	0.992	0.911

**หมายถึงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฉ. 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีนในส่วนน้ำใส และปริมาณโปรตีนในตะกอนเมื่อทำให้แป้งสุกก่อนการบ่มด้วย α-amylase ที่อุณหภูมิ 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

SOV	Df	MS		
		ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส	ปริมาณโปรตีนในตะกอน
อุณหภูมิ	2	1069.000*	0.004*	3541.000*
Error	9	0.767	0.000	33.890

*หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฉ. 5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อย่อยปลายข้าวที่ผ่านการทำให้สุกแล้ว บ่มด้วย α-amylase ความเข้มข้น 0.15 %v/w ที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่าง ๆ

SOV	df	MS		
		ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส	ปริมาณโปรตีนในตะกอน
เวลา	5	1636.000*	0.017*	0.014*
Error	12	0.729	0.001	0.001

*หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฉ. 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใส และโปรตีนในตะกอนเมื่อใช้ mixed enzymes ปริมาณเอนไซม์ต่าง ๆ ย่อยรำข้าวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 3.8 เป็นเวลา 60 นาที

SOV	df	MS		
		ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส	ปริมาณโปรตีนในตะกอน
ปริมาณเอนไซม์	8	3953.356*	919.297*	918.782*
Error	10	17.549	1.167	0.022

*หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฉ. 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อใช้ mixed enzymes ปริมาณเอนไซม์ต่าง ๆ ย่อยรำสกัดไขมันที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 3.8 เป็นเวลา 60 นาที

SOV	df	MS		
		ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส	ปริมาณโปรตีนในตะกอน
ปริมาณเอนไซม์	8	1961.854*	232.034*	233.842*
Error	10	9.117	7.995	5.152

*หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฉ. 8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อย่อยรำข้าวด้วย mixed enzymes ความเข้มข้น 0.10 %v/w ที่ภาวะการสกัดต่าง ๆ เป็นเวลา 60 นาที

SOV	df	MS		
		ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส	ปริมาณโปรตีนในตะกอน
อุณหภูมิ (A)	2	4.627*	1.485*	1.479*
pH (B)	2	3.337*	0.201*	1.978*
AB	4	2.370*	0.764*	0.775*
Error	9	0.003	0.001	0.001

*หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฉ. 9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใส และโปรตีนในตะกอนเมื่อย่อยรำสกัดไขมันด้วย mixed enzymes ความเข้มข้น 0.10% v/w ที่ภาวะการสกัดต่าง ๆ เป็นเวลา 60 นาที

SOV	df	MS		
		ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส	ปริมาณโปรตีนในตะกอน
อุณหภูมิ (A)	2	0.929*	0.268*	0.275*
pH (B)	2	2.812*	0.170*	0.197*
AB	4	1.209*	0.170*	0.155*
Error	9	0.016	0.000	0.001

*หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฉ. 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อใช้ mixed enzymes ความเข้มข้น 0.10 %v/w ย่อยรำข้าว ที่ pH 3.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่าง ๆ

SOV	df	MS		
		ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส	ปริมาณโปรตีนในตะกอน
เวลา	5	7.508*	1.802*	1.823*
Error	12	0.001	0.001	0.003

**หมายถึงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฉ. 11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีนในส่วนน้ำใสและโปรตีนในตะกอนเมื่อใช้ mixed enzymes ความเข้มข้น 0.10 % v/w ย่อยรำสกัดไขมันที่ pH 3.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่าง ๆ

SOV	df	MS		
		ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณโปรตีนในส่วนน้ำใส	ปริมาณโปรตีนในตะกอน
เวลา	5	3.478*	0.480*	0.479*
Error	12	0.002	0.001	0.000

*หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฉ. 12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ foaming capacity และ foaming stability ของโปรตีนที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันที่ภาวะที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับโปรตีนไข่ขาวและเคซีน

SOV	df	MS	
		foaming capacity	foaming stability
โปรตีนตัวอย่าง	4	104.219*	301.800*
Error	15	1.958	12.917

*หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฉ. 13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ emulsifying capacity และ emulsion stability ของโปรตีนที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมันที่ภาวะที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับ bovine serum albumin และเคซีน

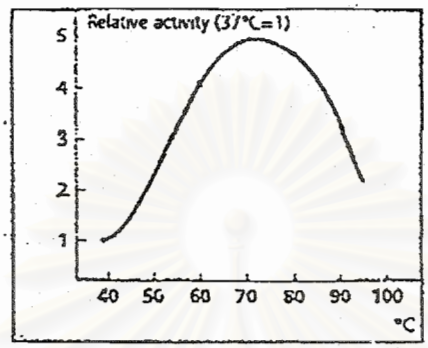
SOV	df	MS	
		emulsifying activity	emulsion stability
โปรตีนตัวอย่าง	4	0.180*	139.575*
Error	15	0.008	0.617

*หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ช

การทำงานของเอนไซม์ α-amylase ที่อุณหภูมิต่าง ๆ



รูปที่ 1 ช อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ α-amylase ชนิด S วิธีวิเคราะห์ใช้ Novo Nordisk method สับสเตรต คือ starch เข้มข้น 0.5% แคลเซียมอิออนเข้มข้น 12 ppm pH 5.7 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (Anon, 1991)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ช.

ภาพอุปกรณ์ วัตถุดิบและโปรตีนที่สกัดได้

รูปที่ 1 ช เครื่อง electrophoresis รุ่น Hoefer mini VE

รูปที่ 2 ช ปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน และโปรตีนที่สกัดได้จากปลายข้าว รำข้าวและรำสกัดไขมัน

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกันยารัตน์ เรียวกลาง เกิดวันที่ 16 กันยายน พ.ศ. 2520 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิตจากภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2541 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2542

ผลงานทางวิชาการ

กันยารัตน์ เรียวกลาง, เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์ และสุเมธ ตันตระเธียร. 2546. การสกัดโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากข้าวจ้าว. การเสนอผลงานวิชาการแบบบรรยาย. การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 11 ประจำปี 2546, 18-19 มีนาคม. กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย