ผลของการดัดแปลงโปรตีนรำข้าวต่อสมบัติเชิงหน้าที่และการต้านอนุมูลอิสระ

รจนา นพตะนา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

MODIFICATION OF RICE BRAN PROTEIN AFFECTS FUNCTIONAL PROPERTIES AND ANTIOXIDANT ACTIVITY

RODJANA NOPTANA

A THESIS SUPMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
MAJOR IN FOOD TECHNOLOGY
FACULTY OF AGRICULTURE
UBON RATCHATHANI UNIVERSITY
YEAR 2017

COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณา และความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วย ศาสตราจารย์ ดร. เอกสิทธิ์ อ่อนสอาดที่ ให้คำแนะนำ ตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่ รวมทั้งการเป็นแบบอย่างที่ดีแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด ตลอดจนให้คำปรึกษาและคำชี้แนะในการแก้ไขปัญหาตลอดระยะเวลาการทำวิจัยผู้วิจัย ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณที่นี้ขอกราบขอบพระคุณ ดร. วัลลภ ชนะสัตรู ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.ชุติมา ทองแก้ว ที่เป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ที่ให้คำแนะนำตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ โรงสีข้าวสินรุ่งเรือง อ.เดชอุดม จ.อุบลราชธานี ที่อนุเคราะห์รำข้าว เพื่อใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณ นักวิชาการ เทคโนโลยีการอาหาร และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ที่ช่วยเหลือทางด้านเครื่องมือและอำนวยความสะดวกในระหว่างการทำวิจัยขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่ช่วยเหลือทางด้านการทำวิจัย ทั้งให้คำแนะนำและให้กำลังใจตลอดมาขอขอบคุณคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยจนทำให้ประสบผลสำเร็จ

ท้ายสุดนี้ผู้วิจัย ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้กำลังใจ ส่งเสริมและสนับสนุนให้มีการศึกษาที่ดี คุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากการศึกษาครั้งนี้ ขอมอบแด่ผู้ที่อยู่เบื้องหลังในการส่งเสริมความสำเร็จ ทั้งที่ได้กล่าวนามถึงและมิได้กล่าวนามถึงทุกท่านและขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

รจนา นพตะนา

ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

เรื่อง : ผลของการดัดแปลงโปรตีนรำข้าวต่อสมบัติเชิงหน้าที่และการต้านอนุมูลอิสระ

ผู้วิจัย : รจนา นพตะนา

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา :เทคโนโลยีการอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษา:ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกสิทธิ์ อ่อนสอาด

คำสำคัญ : โปรตีนรำข้าว, โปรตีนรำข้าวดัดแปลง, สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน, สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

วิทยานิพนธ์นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการ ดัดแปลงสมบัติเชิงหน้าที่ ของโปรตีนรำข้าวศึกษาคุณลักษณะและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลง และศึกษาการ ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนรำข้าวดัดแปลง

ทดลองวิธีการดัดแปลงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนรำข้าว (RBP) แบ่งออก 2 แบบ คือ โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง(MRBP) (พีเอช9.0 อุณหภูมิ60° ซ นาน 60 นาที) พบว่าระดับการย่อย (DH) ของ MRBPมีค่าเท่ากับร้อยละ 0.43-1.98 และโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์จำนวน 2 ชนิดคือเอนไซม์อัลคาเลส (MRBP-A)ความเข้มข้นร้อยละ 0.3เป็นระยะเวลา 0, 3, 15, 60และ 180 นาที ให้ระดับการย่อย ประมาณร้อยละ 1.55 (DH0-5), 8.42 (DH6-10), 13.83 (DH11-15), 19.16 (DH16-20)และ21.47 (DH>20)ตามลำดับ และโปรตีนรำข้าว ดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์(MRBP-F) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 6 ที่ระยะเวลา 0, 30 และ 300 นาที ให้ระดับการย่อยประมาณร้อยละ 1.87 (DH0-5), 10.88 (DH6-10) และ 12.08 (DH11-15)ตามลำดับ ผลการตรวจสอบด้วยโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-PAGE)พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของ RBP มีน้ำหนักโมเลกุลช่วง 7-72 กิโลดาลตัน MRBPมีน้ำหนักโมเลกุล 8-62 กิโลดาลตัน และ MRBP-A/F มีน้ำหนักโมเลกุลลดลงเมื่อระยะเวลาการย่อยของเอนไซม์เพิ่มขึ้น

ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนรำข้าวได้แก่ การละลาย ความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ ความสามารถในการอุ้มน้ำและน้ำมัน และสมบัติการเกิดโฟมพบว่าโปรตีนรำข้าวมีการละลายต่ำสุดช่วงพีเอช 4 และ 5 เมื่อโปรตีนรำข้าวผ่านการดัดแปลงความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น การศึกษาขนาดอนุภาคการกระจายตัวและ ความต่างศักย์ไฟฟ้าของ เม็ดไขมัน ดัชนีการแยกชั้นครีมและโครงสร้างทางจุลภาค เป็นตัวบ่งชี้ถึงสมบัติเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลง พบว่าโปรตีนรำข้าวดัดแปลงจะมีความสามารถเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ดีกว่าโปรตีนรำข้าว โดยที่ MRBP ความเข้มข้นโปรตีนร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร MRBP-A ที่ระดับการย่อยร้อยละ 0-5 และ MRBP-F

ที่ระดับการย่อยร้อยละ 0-5 และ 6-10 สามารถช่วย การกระจายตัวของอนุภาคเม็ดไขมัน และทำให้ระบบอิมัลชันมีความคงตัว ส่วนความสามารถในการอุ้มน้ำ (WA) และน้ำมัน (FA) ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงเปรียบเทียบกับโปรตีนรำข้าวพบว่าโปรตีนรำข้าวดัดแปลง MRBPMRBP-Aและ MRBP-F มีค่า WA และFAสูงกว่า RBP ส่วนและสมบัติการเกิดโฟมของ RBP MRBP MRBP-A และ MRBP-F จะต่ำที่พีเอช5 และเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง โปรตีนรำข้าว และโปรตีนรำข้าวดัดแปลง พบว่า ความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟม ของ MRBP MRBP-A และ MRBP-F เพิ่มขึ้นมากกว่าโปรตีนรำข้าวไม่ดัดแปลง

การศึกษาการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนรำข้าวดัดแปลง พบว่า MRBP-Aระดับการย่อยร้อยละ 0-5 มีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS assay แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระเป็น EC_{50} สูงสุด (EC_{50}เท่ากับ 2.67mg/ml) และMRBP-A ระดับการย่อยร้อยละ 20 มีความสามารถในการจับโลหะไอออน ความสามารถในการรีดิวซ์ และความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกสูงสุดแต่ MRBP-F ระดับการย่อยร้อยละ 11-15 ให้ความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก ดีที่สุดดังนั้นโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการดัดแปลงทั้งที่ใช้ ความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) และ เอนไซม์ สามารถเพิ่มสมบัติเชิงหน้าที่และ การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาจใช้เป็นส่วนผสมอาหารได้

ABSTRACT

TITLE : MODIFICATION OF RICE BRAN PROTEIN AFFECTSFUNCTIONAL PROPERTIES AND ANTIOXIDANT ACTIVITY
AUTHOR : RODJANA NOPTANA
DEGREE : MASTER OF SCIENCE
MAJOR : FOOD TECHNOLOGY
ADVISOR : ASST. PROF. EKASIT ONSAARD, PhD.
KEYWORDS : RICE BRAN PROTEIN, MODIFIED RICE BRAN PROTEIN, FUNCTIONAL PROPERTIES OF PROTEIN, ANTIOXIDENTS OF PROTEIN

The thesis was aimed to modify a rice bran protein (RBP) using different modification methods in order to improve functional properties and investigate a characteristic of modified rice bran proteins (MRBP) and its antioxidant activity.

Two modification techniques were conducted, heat assisted alkaline treatment and enzymatic hydrolysis treatment. RBP sample was modified using heat assisted with alkaline treatment (MRBP) under pH 9 at 60 °C for 60 min. It was found that the degree of hydrolysis (DH) of MRBP was 0.43-1.98%. On the other hands, RBP sample was modified using 0.3% alkalase (MRBP-A) for 0, 3, 15, 60 and 180 min provided the degree of hydrolysis 1.55% (DH0-5), 8.42% (DH6-10), 13.83% (DH11-15), 19.16% (DH16-20) and 21.47% (DH>20), respectively. In addition, using 6.0% flavourzyme hydrolysis (MRBP-F) for 0, 30 and 300 min,the degree of hydrolysis were obtained at 1.87%(DH0-5), 10.88% (DH6-10), 12.08% (DH11-15) respectively. Moreover, the molecular weight of RBP was 7-72 kDa, while MRBP provided a molecular weight ranging from 8-62 kDa using SDS-PAGE. It was observed that molecular weight of MRBP-A/F decreased with increasing of hydrolysis time.

Functional properties of rice bran protein i.e. solubility, emulsifying properties, water absorption capacity (WA) and fat absorption capacity (FA) and foaming properties were investigated. MRBP exhibited minimum solubility at pH 4-5. The solubility of MRBP increased by using both heat assisted alkaline treatment and enzymatic treatment. Mean particle size, particle size distribution, zeta potential,

creaming index and microstructure were monitored as they are indicators for emulsifying properties of RBP. It was found that 0.4 %wtMRBP, MRBP-A at DH ranged 0-5% and MRBP-F at DH ranged 6-10% represented bimodal or multimodal distribution resulting of good emulsion stability. MRBP MRBP-A andMRBP-F provided higher water absorption capacity and fat absorption capacity than RBP. In addition, the lowest foaming properties of RBP MRBP MRBP-A and MRBP-F were observed at pH 5. Moreover, MRBP MRBP-A and MRBP-F provided higher foaming capacity and stability than RBP.

According to antioxidant capacity, MRBP-A at DH ranged 0-5% expressed the lowest EC_{50}(2.67mg/ml) using ABTS assay. On the other hand, the highest metal ions chelating activity and reducing powerwere obtained by MRBP-A at DH more than 20%provided as well as the highest antioxidant capacity of linoleic acid was observed. However, MRBP-F at degree of hydrolysis ranged 11-15% prevented the best linoleic acid autoxidation. Therefore, the functional properties and antioxidant activity of modified rice bran proteins usingheat assisted alkaline treatment and enzymatic treatment can improve and may be used as a food ingredient in food industry.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	**ก**
บทคัดย่อภาษาไทย ข	
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	**ง**
สารบัญตาราง	**ซ**
สารบัญภาพ	**ญ**
คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ	**ณ**
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3สมมุติฐานการวิจัย	2
1.4 ขอบเขตการวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	
2.1 ลักษณะทั่วไปของรำข้าว	4
2.2 องค์ประกอบของรำข้าว	5
2.3 การสกัดโปรตีนรำข้าว	9
2.4 วิธีการดัดแปลงโปรตีน	10
2.5 คุณลักษณะของโปรตีนรำข้าวหลังการดัดแปลง	11
2.6 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนดัดแปลง	12
2.7 สมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชัน	14
บทที่ 3วิธีการดำเนินการวิจัย	
3.1 วัตถุดิบ สารเคมี และอุปกรณ์	16
3.2 วิธีการดำเนินงาน	17
3.3 การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์เชิงสถิติ	25
บทที่ 4ผลการทดลองและอภิปรายผล	
4.1 องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว รำข้าวที่สกัดน้ำมัน โปรตีนรำข้าว และโปรตีนถั่วเหลือง และผลผลิตรำข้าวที่สกัดน้ำมัน และโปรตีนรำข้าว	26
4.2 ผลการดัดแปลงโปรตีนรำข้าวด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง	27

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3ผลการเตรียมโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ 29
4.4 คุณลักษณะของโปรตีน 34
4.5 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน 43
4.6 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลง 77
บทที่ 5สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ
5.1 สรุปผลการทดลอง 86
5.2 ข้อเสนอแนะ 86
เอกสารอ้างอิง 88
ภาคผนวก
ก การวิเคราะห์ทางด้านคุณลักษณะของโปรตีน 98
ข การวิเคราะห์ทางเคมี 103
ค การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 111
ประวัติผู้วิจัย 117

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 องค์ประกอบทางเคมี (ร้อยละ) ที่มีอยู่ในรำข้าวและส่วนต่างๆ ที่ได้จากการขัดสีข้าว 5
2.2 ชนิดและ ปริมาณกรดอะมิโนที่พบในรำข้าว 6
2.3 ชนิดและ ปริมาณกรดไขมันที่พบในรำข้าวและข้าวสาร 8
2.4 ชนิดและ ปริมาณวิตามิน และเกลือแร่ที่พบในรำข้าวและส่วนที่ได้จากการขัดสี 9
4.1 องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว รำข้าวที่สกัดน้ำมัน โปรตีนรำข้าว และโปรตีนถั่วเหลือง และผลผลิตรำข้าวที่สกัดน้ำมัน และโปรตีนรำข้าว 27
4.2 ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH) ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) และโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP) 28
4.3 เวลาที่ใช้ในการย่อย ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH) และปริมาณโปรตีนที่ละลายของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลสร้อยละ 0.3 32
4.4 เวลาที่ใช้ในการย่อย ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH) และปริมาณโปรตีนที่ละลายของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 6 32
4.5 ค่าสี (L* a* และ b*) ของโปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) โปรตีนถั่วเหลือง (SP) และโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP) 35
4.6 ค่าสี (L* a* และ b*) ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส(MRBP-A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์(MRBP-F) ที่ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH) ต่างๆ 35
4.7 ค่าความแตกต่างของสี (ΔE* และ ΔH*) ของโปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) โปรตีนถั่วเหลือง (SP) และโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP) 36
4.8 ความแตกต่างของสี (ΔE* และ ΔH*) ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส(MRBP-A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์(MRBP-F) ที่ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH) ต่างๆ 36
4.9 ความสามารถในการอุ้มน้ำและอุ้มน้ำมันของโปรตีนรำข้าว (RBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลือง (SP) 65

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.10 ความสามารถในการอุ้มน้ำและอุ้มน้ำมันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) และโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP) 66
4.11 ความสามารถในการอุ้มน้ำและอุ้มน้ำมันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับการย่อย (DH) ต่างๆ 68
4.12 ความสามารถในการอุ้มน้ำและอุ้มน้ำมันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ที่ระดับการย่อย (DH) ต่าง 68
4.13 ผลของฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS ที่ร้อยละ 50 (EC_{50}) ของโปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (MRBP-A) ที่ระดับการย่อย (DH) ร้อยละ 0-5, 6-10, 11-15, 16-20 และ >20 79
4.14 ผลของฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS ที่ร้อยละ 50 (EC_{50}) ของโปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) และโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์(MRBP-F) ที่ระดับการย่อย (DH) ร้อยละ 0-5, 6-10 และ 11-15 79
ก.1 ส่วนประกอบของเจลสำหรับ SDS-PAGE 101
ข.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน 110

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 โครงสร้างของรำข้าว 4
4.1 โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) และ โปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP) 27
4.2 ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH) ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วย เอนไซม์อัลคาเลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0-2 (ภาพ A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0-15(ภาพ B) 30
4.3 ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH) ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วย เอนไซม์อัลคาเลสร้อยละ 0.3 ที่ระยะเวลาการย่อย 0-180 นาที (ภาพ A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 6 ที่ระยะเวลาการย่อย 0-12 ชั่วโมง (ภาพ B) 31
4.4 โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (MRBP-A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (MRBP-F) ที่ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH) ต่างๆ 33
4.5 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่แยกด้วยวิธี SDS-PAGE ของรำข้าวที่สกัดน้ำมัน (DRB) โปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) โปรตีนถั่วเหลือง (SP) และโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อน ร่วมกับสารละลายด่าง (MSP) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (Standard: Std.) ภายใต้สภาวะ (ภาพ A) Non-reducing และ (ภาพ B) Reducing 3 8
4.6 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่แยกด้วยวิธี SDS-PAGE ของรำข้าวที่สกัดน้ำมัน (DRB) โปรตีนรำข้าว (RBP) และโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส(MRBP-A) ที่ระดับการย่อยต่างๆ เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (Standard: Std.) ภายใต้สภาวะ (ภาพ A) Non-reducing และ (ภาพ B) Reducing 40
4.7 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่แยกด้วยวิธี SDS-PAGE ของรำข้าวที่สกัดน้ำมัน (DRB) โปรตีนรำข้าว (RBP) และโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์(MRBP-F) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (Standard: Std.) ภายใต้สภาวะ (ภาพ A) Non-reducing และ (ภาพ B) Reducing 4 2
4.8 ความสามารถในการละลายของโปรตีนรำข้าว (RBP) เปรียบเทียบกับ โปรตีนถั่วเหลือง (SP) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับพีเอช3-9 44

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.9 ความสามารถในการละลายของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับพีเอช 3-9 44

4.10 ความสามารถในการละลายของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (ภาพ A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์(ภาพ B) ที่พีเอช 3-9 46

4.11 ขนาดอนุภาคของเม็ดไขมันของโปรตีนรำข้าว (RBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลือง (SP) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าว ร้อยละ 10พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง 48

4.12 การกระจายตัวของอนุภาคเม็ดไขมันของโปรตีนรำข้าว (ภาพ A) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลือง (ภาพ B) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าว ร้อยละ 10พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง 49

4.13 ขนาดอนุภาคของเม็ดไขมันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง 50

4.14 การกระจายตัวของอนุภาคเม็ดไขมันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) (ภาพ A) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลือดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP) (ภาพ B) ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.2-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง 52

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.15 ความต่างศักย์ไฟฟ้าของโปรตีนรำข้าว (RBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลือง (SP) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10 พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง 5 3

4.16 ความต่างศักย์ไฟฟ้าของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง 5 3

4.17 ดัชนีการเกิดครีมของโปรตีนรำข้าว (RBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลือง (SP) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง 5 5

4.18 ดัชนีการเกิดครีมของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10 พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง 5 5

4.19 โครงสร้างทางจุลภาคของอนุภาคเม็ดไขมันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) (ภาพ A) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลือดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP)(ภาพ B) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมงด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังการขยาย 100 เท่า) 56

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.20 ขนาดอนุภาคของเม็ดไขมันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (ภาพ A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์(ภาพ B) ที่ระดับการย่อย (DH) ต่างๆ ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10 พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง 58

4.21 การกระจายตัวของอนุภาคเม็ดไขมันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (ภาพ A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์(ภาพ B) ที่ระดับการย่อย (DH) ต่างๆ ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10 พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง 60

4.22 ความต่างศักย์ไฟฟ้าของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (ภาพ A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (ภาพ B) ที่ระดับการย่อย (DH) ต่างๆ ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10 พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง 61

4.23 ดัชนีการเกิดครีมของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส(ภาพ A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์(ภาพ B) ที่ระดับการย่อย (DH) ต่างๆ ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10 พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง 63

4.24 โครงสร้างจุลภาคของอนุภาคเม็ดไขมันของโปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส(MRBP-A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์(MRBP-F) ที่ระดับการย่อย (DH) ต่างๆ ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10 พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมงด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังการขยาย 100 เท่า) 64

4.25 ความสามารถในการเกิดโฟม(ภาพ A) และความคงตัวของโฟม(ภาพ B) ของโปรตีนรำข้าว (RBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลือง (SP) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ระดับพีเอช 3 5 7 และ 9 70

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.26 ความสามารถในการเกิดโฟม (ภาพ A) และความคงตัวของโฟม(ภาพ B) ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP) ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ระดับพีเอช 3 5 7 และ 9 72

4.27 ความสามารถในการเกิดโฟม (ภาพ A) และความคงตัวของโฟม (ภาพ B) ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับพีเอช 3 5 7 และ 9 7 4

4.28 ความสามารถในการเกิดโฟม (ภาพ A) และความคงตัวของโฟม (ภาพ B) ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับพีเอช 3 5 7 และ 9 76

4.29 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS ของโปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (MRBP-A) ที่ระดับการย่อย (DH) ร้อยละ 0-5, 6-10, 11-15, 16-20 และ >20(ภาพ A) และโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (MRBP-F) ที่ระดับการย่อย (DH) ร้อยละ 0-5, 6-10 และ 11-15 ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร(ภาพ B) 78

4.30 ความสามารถในการคีเลตโลหะด้วยวิธี Metal ions chelating activity ของโปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส(MRBP-A) ที่ระดับการย่อย (DH) ร้อยละ 0-5, 6-10, 11-15, 16-20 และ >20(ภาพ A) และโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (MRBP-F) ที่ระดับการย่อย (DH) ร้อยละ 0-5, 6-10 และ 11-15 ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร(ภาพ B) 81

4.31 ความสามารถในการรีดิวซ์ของโปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (MRBP-A) ที่ระดับการย่อย (DH) ร้อยละ 0-5, 6-10, 11-15, 16-20 และ >20(ภาพ A) และโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์(MRBP-F) ที่ระดับการย่อย (DH) ร้อยละ 0-5, 6-10 และ 11-15 ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร(ภาพ B) 83

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.32 ความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกด้วยวิธี linoleic acid peroxidation activity ของโปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (MRBP-A) ที่ระดับการย่อย (DH) ร้อยละ 0-5, 6-10, 11-15, 16-20 และ >20(ภาพ A) และโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์(MRBP-F) ที่ระดับการย่อย (DH) ร้อยละ 0-5, 6-10 และ 11-15 ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร(ภาพ B) 85

ก.1 การแยกโปรตีนโดย Gel electrophoresis 102

ข.1 กราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) 1 10

ค.1 กราฟมาตรฐาน Trolox (mg/ml) 1 13

ค.2 กราฟมาตรฐาน EDTA (mM) 11 4

คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ

คำย่อ คำเต็ม ความหมาย

BHA	Butylatedhydroxyanisole สารต้านอนุมูลอิสระ	
BHT	Butylatedhydroxytoluene	สารต้านอนุมูลอิสระ
BSA	Bovine serum albumin	โปรตีนมาตรฐาน
DH	Degree of hydrolysis	ระดับการย่อยโปรตีน
EC_{50}	50% Effective concentration	ความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์กระตุ้นได้ 50%
FA	Fat absorption	ความสามารถในการอุ้มน้ำมัน
WA	Water absorption	ความสามารถในการอุ้มน้ำ
FC	Foaming capacity	ความสามารถในการเกิดโฟม
FS	Foaming stability	ความคงตัวของโฟม
PER	Protein efficiency ratio	ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน
RB	Rice bran	รำข้าว
DRB	Defatted rice bran	รำข้าวที่สกัดน้ำมัน
RBP	Rice bran protein	โปรตีนรำข้าว
SP	Soy protein	โปรตีนถั่วเหลือง
MRBP	Modified rice bran protein	โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง
MSP	Modified soy protein	โปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง
MRBP-A	Modified RBP by alcalase	โปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส
MRBP-F	Modified RBP by flavourzyme ฟลาโวไซม์	โปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าว(*Oryza sativa* Linn.) เป็นพืชอาหารหลักที่สำคัญของคนทั้งโลก ในการผลิตข้าวปี 2559/2560 กระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา (USDA : United States Department of Agriculture) รายงานว่าผลผลิตข้าวทั่วโลกมีปริมาณทั้งสิ้น 483.48ล้านตันข้าวสาร ประเทศที่ผลิตข้าวอันดับที่ 1 คือ ประเทศจีน สามารถผลิตได้ 146.5 ล้านตันข้าวสาร รองลงมาคือ ประเทศอินเดีย ส่วนประเทศไทยมีผลผลิตข้าวเป็นอันดับที่ 6 ของโลก มีผลผลิตข้าวเปลือกทั้งสิ้น 31.8 ล้านตันข้าวเปลือก (ข้าวนาปีและข้าวนาปรัง) และสามารถส่งออกข้าวทั้งสิ้น 9.5 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่า 140,000 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร; กรมศุลกากรรวบรวมโดยสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร)

“รำข้าว” เป็นส่วนของคัพภะซึ่งรวมเยื่อหุ้มผล รวมเยื่อหุ้มเมล็ด นิวเซลลัส ชั้นแอลิวโรนและชั้นซับแอลิวโรน ได้จากการขัดข้าวกล้องให้เป็นข้าวสาร ในระหว่างกระบวนการสีในการขัดสีข้าวจะได้ข้าวสารปริมาณร้อยละ 40-55 ที่เหลือเป็นผลพลอยได้คือ แกลบร้อยละ 20 รำข้าวร้อยละ 10 และปลายข้าวร้อยละ 10-22 (Krachata et al., 1994) เมื่อคำนวณปริมาณรำข้าวที่ได้เปรียบเทียบกับผลผลิตข้าวที่ผลิตได้ทั้งประเทศพบว่าปริมาณรำข้าวที่เกิดขึ้นมีปริมาณ ไม่น้อยกว่า 2-3ล้านตันต่อปี รำข้าวอุดมไปด้วยคุณค่าทางอาหารสูงประกอบไปด้วย โปรตีนร้อยละ 13.3-15.14 ความชื้นร้อยละ 11.20 ไขมันร้อยละ 15.0-19.93 เยื่อใยร้อยละ 7.0-13.67 เถ้าร้อยละ 6.6-7.93 และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 18.74(จินตนา สังโสภา, 2551; Cao et al., 2009)แบ่งชนิดโปรตีนรำข้าวตามสมบัติการละลาย Osborne’s พบว่าอัลบูมิน (Alubumin) และโกลบูลิน (Globulin) สูง และมีปริมาณไลซีน (lysine)สูง แต่ กรดกลูตามิก (Glutamicacid) ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกรดอะมิโมธัญพืชอื่น (Lasztity, 1995)นอกจากนี้ยังพบว่า ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน(Protein efficiency ratio: PER) ที่กินเข้าไปต่อการเพิ่มน้ำหนักของมนุษย์หรือสัตว์ทดลอง มีค่าเป็น 2.0-2.5 และ สามารถย่อยได้ มากกว่า ร้อยละ 90 อีกทั้งเป็นแหล่งโปรตีนที่ไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้ เหมาะสำหรับเป็นส่วนผสมในสูตรอาหารสำหรับเด็กที่แพ้อาหาร (Wang et al., 1999)การใช้ประโยชน์ของรำข้าวส่วนใหญ่ใช้เป็นอาหารสัตว์ หรือใช้เป็นเป็นวัตถุดิบในการสกัดเป็นน้ำมันรำข้าวและสกัดโปรตีน

ปัจจุบันโปรตีนจากพืช เป็นที่นิยมและ มีความต้องการเพิ่มขึ้น ใช้ทดแทนแหล่งโปรตีนจากเนื้อสัตว์ นม และไข่ ที่มีราคาสูง เนื่องจากต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้น และใช้เวลานานในการเลี้ยงหรือการผลิต การใช้ รำข้าวซึ่งเป็น ผลพลอยได้จากสิ่งเหลือใช้ จากกระบวนการสีข้าว เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนจึงมีความน่าสนใจ เพราะนอกจากจะมีราคาถูกแล้วยังมีคุณค่าทางอาหารสูง รำข้าวถือว่า

เป็นแหล่งโปรตีนสูงอย่างไรก็ตามสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนรำข้าวยังมีข้อจำกัด เช่น ความสามารถในการละลาย สมบัติการเกิดฟอง และสมบัติการเป็นสารอิมัลซิ ไฟเออร์ต่ำ (Shih et al., 1999; Wang et al., 1999; Zhang et al., 2012) ดังนั้นควรมีการนำมาดัดแปลงโครงสร้างเพื่อให้เพิ่มสมบัติเชิงหน้าที่ โดยวิธีดัดแปลงโครงสร้างโปรตีนมีหลายวิธีและการ ไฮโดรไลซ์โปรตีนเป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ดัดแปลงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโดยทั่วไปแล้วการดัดแปลงมี 2 วิธี คือการใช้ความร้อน (Yeom et al., 2010)และการใช้เอนไซม์(Zhao et al., 2011) การปรับปรุงด้วยวิธีดังกล่าวจะส่งผลให้โปรตีนมีสมบัติการละลายของโปรตีน และการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์เพิ่มขึ้น(Makayay and Theerakulkiat, 2007; Yeom et al., 2010;Zhang et al., 2012; Tavano., 2013; Phongthal et al., 2016)แต่อย่างไรก็ตามการไฮโดรไลซ์โปรตีนนอกจากจะปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่บางประการ ยังสามารถปรับปรุงสมบัติทางชีวภาพของโปรตีนด้วย ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากพืชมีความสามารถใช้เป็นสารต้านออกซิเดชัน คือ การต้านอนุมูลอิสระ ABTS เป็นสารคีเลตหรือสารอินทรีย์ที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระ เพิ่มความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (สุภาวดี ทรัพย์สิริไพบูรณ์ , 2550; ลีนา หง้าฝา , 2556; Castro and Sato, 2015; Phongthai et al., 2016;Thammarathip et al.,2016)ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาวิธีการ ดัดแปลง สมบัติเชิงหน้าของ โปรตีนรำข้าว ด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่างและการใช้เอนไซม์ ศึกษาคุณลักษณะและ สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลง พร้อมทั้งศึกษาการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนรำข้าวดัดแปลง เพื่อเป็นแนวทางในการนำโปรตีนไฮโดรไลเสตจากรำข้าวไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1ศึกษาวิธีการดัดแปลงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนรำข้าว

1.2.2ศึกษาคุณลักษณะและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลง

1.2.3 ศึกษาการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนรำข้าวดัดแปลง

1.3 สมมุติฐานการวิจัย

โปรตีนรำข้าวที่ผ่านการดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่างและการใช้เอนไซม์ สามารถปรับปรุงคุณลักษณะ สมบัติเชิงหน้าที่ และการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1.4 ขอบเขตการวิจัย

1.4.1วิธีการดัดแปลงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนรำข้าว คือ ความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (ใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 °ซกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 9) และการใช้เอนไซม์ จำนวน 2 ชนิด คือ เอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase) ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0-2 โดย

น้ำหนักเอนไซม์ต่อน้ำหนักโปรตีน นาน 0-180 นาที และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (Flavourzyme)ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0-15 โดยน้ำหนักเอนไซม์ต่อน้ำหนักโปรตีนนาน 0-12 ชั่วโมง

1.4.2ตรวจสอบคุณลักษณะและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงได้แก่ระดับการย่อย สีน้ำหนักโมเลกุล การละลาย สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ความสามารถในการอุ้มน้ำ และน้ำมัน และสมบัติการเกิดโฟม

1.4.3 ตรวจสอบการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลง โดยวิเคราะห์กิจกรรมการจับอนุมูลอิสระ ABTS กิจกรรมการจับโลหะไอออน (Metal ion chelating activity) กิจกรรมการรีดิวซ์(Reducing power) และ Linoleic acid peroxidation test

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบวิธีการดัดแปลงโปรตีนรำข้าวที่ช่วยปรับปรุงคุณลักษณะและสมบัติเชิงหน้าที่สามารถใช้เป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหารได้

1.5.2ทราบข้อมูลการเป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลง

1.5.3ทำให้ได้แหล่งโปรตีนแหล่งใหม่และช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับสิ่งเหลือใช้ คือ รำข้าวให้มีมูลค่าเพิ่มมากขึ้น

บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

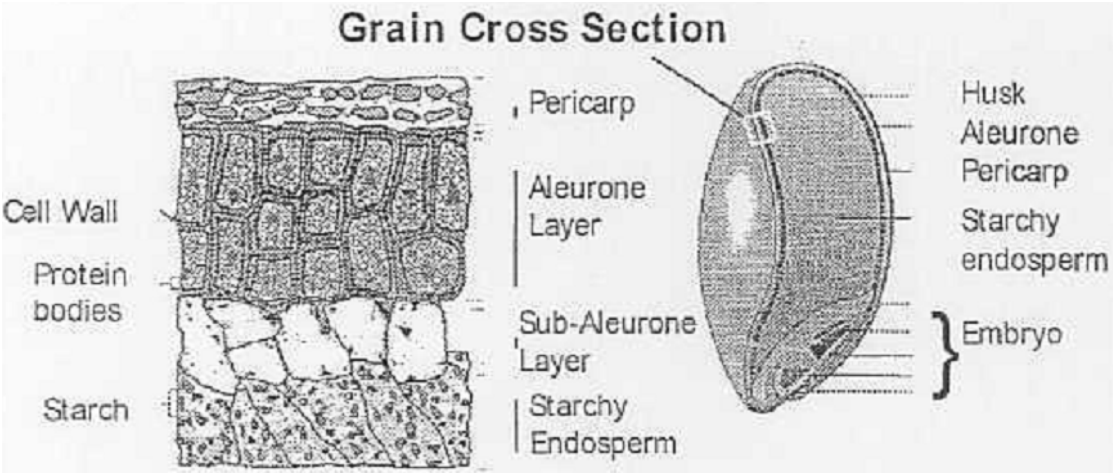
2.1 ลักษณะทั่วไปของรำข้าว

รำข้าว คือ ส่วนประกอบของเนื้อเยื่อชั้นนอกของเมล็ดข้าวที่ถูกขัดออกมาระหว่างการสี เป็นเนื้อเยื่อสีน้ำตาลที่อยู่ถัดจากเปลือกหุ้มเมล็ด (Hull) ประกอบด้วย เยื่อหุ้มผล (Pericarp) เยื่อหุ้มเมล็ด (Tegmen) เยื่ออัลลูโลส (Aleurone later)คัพภะ (Embryo) (ภาพที่ 2.1) และแป้งส่วนนอกของเอนโดสเปิร์มถ้ามีการขัดหนักเกิดการแตกหักหลุดปะปนออกมารวมกันกับรำข้าว (ขวัญหญิง คุ้มทองหลาง, 2546;จินตนา สังโสภา, 2551)รำข้าวที่ได้จากกระบวนการสีข้าวสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิดด้วยกัน(ชัยพฤกษ์หงส์ลัดดาพร, 2554) คือ

(1)รำปิ่นแก้วเป็นรำที่ ได้จากโรงสีขนาดกลางประกอบด้วยรำเป็นส่วนใหญ่และมีเศษแกลบชิ้นเล็กๆและคัพภะปะปนอยู่เล็กน้อย

(2) รำละเอียดเป็นรำ ข้าวที่ได้จากโรงสีข้าวมาตรฐานอุตสาหกรรมประกอบด้วยผิวหุ้มเมล็ดข้าวกล้อง และ คัพภะรวมทั้งอาจมีเศษแป้งที่ได้จากการขัดผิวเมล็ดข้าวสารปนอยู่เล็กน้อยมีลักษณะละเอียดเบาสีเหลือง นวลและไม่มีเศษแกลบปนใช้มากในการเป็นอาหารสัตว์และสกัดเอาน้ำมันออกจนกลายเป็นรำสกัดน้ำมัน

(3)รำข้าวขาวเป็นรำผสมแป้งที่ประกอบด้วย เยื่อหุ้มเมล็ดข้าวชั้นในและเศษแป้งที่ได้จากการขัดผิว เมล็ดข้าวสารให้เรียบและเงาลักษณะเป็นฝุ่นแป้งสีขาวและมีน้ำหนักมากกว่ารำละเอียด



ภาพที่ 2.1โครงสร้างของรำข้าว

ที่มา:จารุดา วิเศษสรรโชค (2545)

2.2 องค์ประกอบของรำข้าว

รำข้าวมีองค์ประกอบหลายชนิด ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และเส้นใย (ตารางที่ 2.1) ซึ่งองค์ประกอบของรำข้าวจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของข้าวเปลือก และข้าวชนิดเดียวกันก็อาจให้ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีในรำข้าวแตกต่างกันตามกระบวนการสีข้าว

ตารางที่2.1 องค์ประกอบทางเคมี (ร้อยละ) ที่มีอยู่ในรำข้าวและส่วนต่างๆ ที่ได้จากการขัดสีข้าว

ปริมาณองค์ประกอบทางเคมี	ข้าวเปลือก	ข้าวกล้อง	ข้าวสาร	รำข้าว	แกลบ
โปรตีน(กรัม)	5.8-7.7	7.1-8.3	6.3-7.1	11.3-14.9	2.0-2.8
ไขมัน(กรัม)	1.5-2.3	1.6-2.8	0.3-0.5	15.0-19.7	0.3-0.8
เส้นใย(กรัม)	7.2-10.4	0.6-1.0	0.2-0.5	7.0-11.4	34.5-45.9
เถ้า(กรัม)	2.9-5.2	1.0-1.5	0.3-0.8	6.6-9.9	13.2-21.0
คาร์โบไฮเดรต(กรัม)	64-73	73-87	77-89	34-62	22-34
เส้นใยอาหาร(กรัม)	16.4-19.2	2.9-3.9	0.7-2.3	24-29	66-74
พลังงาน (กิโลแคลอรี)	378	363-385	349-373	399-476	265-332

ที่มา:จินตนาสังโสภา(2551)

2.2.1 คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate)

คาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลักในรำข้าว ซึ่งมีปริมาณสูงถึง ร้อยละ 34-62(ตารางที่ 2.1) โดยสะสมอยู่ในรูปของแป้ง น้ำตาล เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส

2.2.2 โปรตีน (Protein)

รำข้าวมีองค์ประกอบของโปรตีนประมาณ ร้อยละ 11.3-14.9(Juliano, 1972)ซึ่งเป็นสารอาหารที่มีในรำข้าวรองลงมาจากคาร์โบไฮเดรตและไขมัน โดย โปรตีนจากรำข้าวมีคุณค่าทางโภชนาการสูง พบว่ารำข้าวมีค่า Protein efficiency ratio เท่ากับ 1.6-1.9 และหากเป็นโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวจะมีค่าเท่ากับ 2.0-2.5 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเคซีน(Casein)และโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวสามารถถูกย่อยสลายได้มากกว่า ร้อยละ90 (Saunders, 1990) โปรตีนในรำข้าวจะประกอบด้วยกรดอะมิโนจำเป็น และไม่จำเป็นต่อร่างกาย ดังตารางที่ 2.2โดยพบว่าในรำข้าวมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายทั้งสำหรับเด็ก และผู้ใหญ่ ครบทุกชนิดโดยเฉพาะไลซีน (Lysine) ที่จัดว่าเป็นกรดอะมิโนที่ไม่เพียงพอเป็นอันดับแรก

ตารางที่ 2.2 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่พบในรำข้าว

รายการ	รำข้าว		
	รำละเอียด	**รำปิ่นแก้ว**	**รำสกัดน้ำมัน**
กรดอะมิโนจำเป็น (มิลลิกรัมต่อกรัม)			
อาร์จินีน	1.02	0.84	1.25
ฮีสติดีน	0.35	0.30	0.44
ไอโซลิวซีน	0.45	0.38	0.58
ลิวซีน	0.89	0.76	1.14
ไลซีน	0.58	0.53	0.78
เมทไธโอนีน	0.26	0.22	0.32
ซีสตีน	0.27	0.23	0.34
เมทไธโอนีน+ซีสตีน	0.53	0.45	0.66
เฟนิวอะลานีน	0.59	0.50	0.77
ไทโรซีน	0.43	0.35	0.50
เฟนิลอะลานีน+ไทโรซีน	1.02	0.85	1.27
ทรีโอนีน	0.49	0.41	0.62
ทริบโตเฟน	0.10	0.09	0.16
วาลีน	0.67	0.57	0.85
กรดอะมิโนไม่จำเป็น(มิลลิกรัมต่อกรัม)			
อะลานีน	0.80	0.67	1.01
กรดแอสปาร์ติก	1.15	0.97	1.45
กรดกลูตามิก	1.79	1.51	2.16
ไกลซีน	0.71	0.59	0.89
โพรลีน	0.55	0.48	0.72
เซอรีน	0.59	0.49	0.73

ที่มา:สาโรชค้าเจริญ(2547)

จากรายงานการวิจัยการจำแนกชนิดของโปรตีนจากรำข้าว และการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน Juliano(1994) รายงานชนิดของโปรตีนจากรำข้าวสามารถจำแนกได้โดยใช้พื้นฐานในการละลายของโปรตีนแต่ละชนิดได้แก่ 1)อัลบูมิล(Albumin)พบประมาณร้อยละ 5เป็นโปรตีนที่ละลายได้ในน้ำ หรือละลายน้ำที่มีกรดอยู่เพียงเล็กน้อยและตกตะกอนทันทีเมื่อได้รับความร้อน 2)โกลบูลิน(Globulin)พบประมาณร้อยละ 12เป็นโปรตีนที่ละลายได้ในสารละลายเกลือเจือจางและเป็นกลาง (โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์) ไม่ค่อยละลายในน้ำและไม่ละลายในสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นสูง 3)โฟรลามิน (Prolamin) พบประมาณร้อยละ 3 เป็นโปรตีนที่ละลายได้ในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 60-80 โดยละลายได้ดีในสารละลายเอทานอล แต่ไม่ละลายในน้ำและสารละลายเกลือเจือจาง และ 4)กลูติลิน (Glutelin) พบประมาณร้อยละ 80 เป็นโปรตีนที่ละลายได้ดีในสารละลายด่าง หรือสารละลายกรดเจือจางได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยไม่ละลายในตัวทำละลายที่เป็นกลาง แอลกอฮอล์ น้ำ และสารละลายเกลือเจือจาง Kohler and Palter (1967) ได้วิเคราะห์กรดอะมิโนที่มีอยู่ในข้าวสาลีและรำข้าวสาลี ด้วยการใช้เครื่อง Phoenix automatic amino acid analyzer พบว่าในรำข้าวสาลีมีปริมาณไลซีนเป็นองค์ประกอบสูงกว่าข้าวสาลี โดยในรำข้าวสาลีมีปริมาณไลซีนเท่ากับ 3.70 กรัม ต่อ 16 กรัมไนโตรเจนและ Bradbury et al. (1980) พบว่าข้าวพันธุ์ IR-32 มีกรดอะมิโนไลซีน และทรีโอนีนมากในส่วนของเอมบริโอ รองลงมา คือ ส่วนของเยื่ออัลลูโลนที่อยู่รวมกับส่วนที่หุ้มเมล็ด และพบน้อยสุดในส่วนของเอนโดสเปิร์มที่มีสตาร์ชเป็นองค์ประกอบอยู่

2.2.3 ไขมัน (Fat)

รำข้าวมีไขมันเป็นองค์ประกอบสูง ประมาณ ร้อยละ 15.0-19.7 (ตารางที่ 2.1)สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการสกัดน้ำมันรำข้าว ประกอบด้วยกรดไขมันที่สำคัญ 3 ชนิด คือกรดปาร์มมิติก (Palmitic acid) กรดโอเลอิก(Oleic acid) และกรดลิโนเลอิก(Linoleic acid)อยู่ประมาณร้อยละ90 ของกรดไขมันทั้งหมด (ตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.3ชนิดและปริมาณกรดไขมันที่พบในรำข้าวและข้าวสาร

กรดไขมัน	ร้อยละ	
	รำข้าว	ข้าวสาร
Myristic acid	0.3	0.6
Palmitic acid	18.3	33.8
Palmitoleic acid	0.2	0.4
Stearicacid	1.4	2.7
Oleic acid	41.0	43.3
Linoleicacid	37.1	18.0
Linolenicacid	1.1	0.6
Arachidic acid	0.6	0.4

ที่มา: Lugay and Juliano(1964)

2.2.4 เยื่อใย (Crude fiber)

รำข้าวมีปริมาณเยื่อใยร้อยละ7.0-11.4(ตารางที่ 2.1)คือมีเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส (ทั้งแบบละลาย น้ำและไม่ละลายน้ำ) โดยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสจะดูดซับน้ำและช่วยให้ลำไส้ใหญ่ทำงานได้ราบรื่นขึ้น และช่วยให้ให้ของเสียในลำไส้รวมตัวเป็นก้อนและเคลื่อนผ่านลำไส้เร็วขึ้น ซึ่งไม่เพียงแต่จะช่วยป้องกันท้องผูก แต่ยังอาจช่วยป้องกันโรคติ่งเนื้ออักเสบในลำไส้ใหญ่และเส้นเลือดขอด

2.2.5 วิตามิน และเกลือแร่ (Vitamin and Mineral)

รำข้าวเป็นแหล่งของวิตามิน และเกลือแร่คือ วิตามินบี 1 (Thiamine) วิตามินบี 2 (Riboflavin) วิตามินบี 3 (Niacin) วิตามินอี (Tocophenol) ฟอสฟอรัส (Phosphorus)และโพแทสเซียม(Potassium)เป็นต้น(จารุดา วิเศษสรรโชค,2545) (ตารางที่ 2.4) ทั้งนี้ชนิดและปริมาณจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ข้าว สภาพในการเพาะปลูก และการขัดสีข้าว

ตารางที่ 2.4 ชนิดและปริมาณวิตามิน และเกลือแร่ที่พบในรำข้าวและส่วนที่ได้จากการขัดสี

ปริมาณวิตามิน และเกลือแร่	ข้าวเปลือก	ข้าวกล้อง	ข้าวสาร	รำข้าว	แกลบ
ไทอะมิน (มิลลิกรัม)	0.26-0.33	0.29-0.61	0.02-0.11	1.20-2.40	0.09-0.21
ไรโบฟลาวิน(มิลลิกรัม)	0.06-0.11	0.04-0.14	0.02-0.06	0.18-0.43	0.05-0.07
ไนอะซิน(มิลลิกรัม)	2.90-5.60	3.50-5.30	1.30-2.40	26.70-49.90	1.60-4.20
แคลเซียม(มิลลิกรัม)	10-80	10-50	10-30	30-120	60-130
ฟอสฟอรัส (กรัม)	0.17-0.39	0.17-0.43	0.08-0.15	1.10-2.50	0.03-0.07
เหล็ก (มิลลิกรัม)	1.40-6.00	0.20-5.20	0.20-2.80	8.60-43.00	3.90-9.50
สังกะสี (มิลลิกรัม)	1.70-3.10	0.60-2.80	0.60-2.30	4.30-25.80	0.90-4.00

ที่มา:จินตนาสังโสภา(2551)

2.3 การสกัดโปรตีนรำข้าว

โดยทั่วไปแล้วการสกัดโปรตีนจากรำข้าว นิยมสกัดหลังจากรำข้าวผ่านการสกัดน้ำมันที่หลงเหลือออกโดยการใช้เฮกเซนในการสกัด สารละลายที่ใช้ในการสกัดใช้สารละลายด่างหรือสารละลายเกลือ แล้วปรับพีเอชให้โปรตีนสามารถละลายออกมาได้มากที่สุด โดยปกติพีเอชที่โปรตีนสามารถละลายได้คือพีเอช 9 ถึง 10 (Wang et al., 1999) จากนั้นทำการแยกกากออกให้ได้แต่สารละลายโปรตีน แล้วทำการตกตะกอนโปรตีนโดยการปรับพีเอชให้มีค่าเข้าใกล้ค่าพีไอ (Isoelectric point) ของโปรตีนชนิดนั้นๆ โดยปกติโปรตีนรำข้าวมีค่าพีไอที่พีเอช 4.5 (Tsumura et al., 2005และ Cao et al., 2009) หลังจากการตกตะกอนของโปรตีนแล้วทำการไดอะไลซิส (Dialysis) เพื่อเอาสารละลายเกลือที่เกิดขึ้นในระหว่างการสกัดออก ซึ่งทำให้โปรตีนมีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น แล้วทำการปรับค่าพีเอชของโปรตีนให้เป็นกลาง ก่อนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง Lew et al. (1975) ศึกษาการสกัดโปรตีนจากรำข้าวไขมันเต็มที่พีเอช 8, 10, 11 และ 12 พบว่าผลผลิตที่ได้มีปริมาณร้อยละ 43, 57, 76 และ 70 ตามลำดับ โดยตกตะกอนโปรตีนที่พีเอช 4.5 และที่พีเอช 11 สามารถสกัดโปรตีนได้สูงถึง ร้อยละ 76 นอกจากนี้ Wang et al. (1999) อ้างโดยJiamyangyuen et al. (2005) พบว่าการสกัดโปรตีนที่พีเอชแตกต่างกันมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนแตกต่างกัน โดยการสกัดที่พีเอช 9.5 มีผลผลิตโปรตีนสูงสุดถึง ร้อยละ 72.63 แต่หากสกัดที่สภาวะพีเอชสูงเกินไปอาจมีผลทำให้ได้ปริมาณโปรตีนลดลงและอาจส่งผลให้ปริมาณโปรตีนเสียสภาพธรรมชาติและเกิดการสูญเสียน้ำส่งผลให้เกิดกลิ่นและรสที่ไม่พึงประสงค์ รวมทั้งคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนลดลง โดยเฉพาะกรดอะมิโนที่จำเป็น เช่น ไลซีนเป็นต้น เช่น การศึกษาของSereewatthanawut et al. (2008) พบว่าการสกัดโปรตีนที่สภาวะด่างที่มีความเข้มข้น

สูงมีผลทำให้โมเลกุลของโปรตีนเกิดการเรียงตัวใหม่ยึดเกาะกันเป็นร่างแหขึ้น เช่น เกิดปฏิกิริยา Racemization ของกรดอะมิโน โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจาก *L*-form ไปเป็น *D*-form ซึ่งร่างกายไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ นอกจากนี้ ไม่เพียงแค่ทำให้คุณภาพของโปรตีนลดลงแต่อาจก่อให้เกิดสารพิษอีกด้วยเช่น Lysinoalanine, Ornithinoalanineและ Lanthionineเป็นต้น

2.4 วิธีการดัดแปลงโปรตีน

การดัดแปลงโปรตีนจากพืชโดยทั่วไปจะประกอบด้วย 3 วิธี คือ 1) การใช้ความร้อน เป็นวิธีทางกายภาพที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน ทำให้โครงสร้างของโปรตีนเกิดการคลายตัว 2) การใช้สารเคมี ประกอบด้วยการใช้สารละลายกรด (กรดซัลฟูริก และกรดไฮโดรคลอริก) หรือสารละลายด่าง(โซเดียมไฮดรอกไซด์) และ 3) การใช้เอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่นิยมใช้ คือ เอนไซม์ อัลคาเลส หรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์(Jamdar et al., 2010และChen et al., 2014)

2.4.1 การดัดแปลงโปรตีนด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง

การดัดแปลงโปรตีนด้วยสารละลายด่างเป็นการทำให้โครงสร้างของโปรตีนเกิดการคลายตัวซึ่งอาศัยความแรงของประจุเป็นตัวแยก เป็นวิธีที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำ โดยสารละลายด่างที่นิยมใช้ในการย่อยโปรตีน คือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ลีนา หง้าฝา, 2556) ส่วนการใช้ความร้อนเป็นวิธีทางกายภาพที่นิยมใช้ในการดัดแปลงโปรตีน แต่อย่างไรก็ตามความร้อนที่ใช้ต้องอยู่ในระดับที่เหมาะสม เพราะความร้อนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55-70 °ซ โปรตีนจะเกิดการสูญเสียโครงสร้างทุติยภูมิ อุณหภูมิ 70-80 °ซ มีผลทำให้พันธะไดซัลไฟด์ถูกทำลาย และที่อุณหภูมิ 80-90 °ซ จะเกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ใหม่ระหว่างโมเลกุลของโปรตีน (Davis and Williams, 1998) จากการศึกษาการใช้ความร้อนในการดัดแปลงโปรตีนพบว่าความร้อนมีผลทำให้เกิดการคลายตัวของโมเลกุลโปรตีนที่มีขนาดใหญ่เกิดเป็นเพปไทด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กลง ส่งผลให้พื้นที่ผิวสัมผัสกับน้ำหรือพื้นที่ผิวส่วนที่ไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้น (Makayay and Theerakulkiat, 2007)ส่วนการใช้ความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง พบว่าโปรตีนมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากความร้อนช่วยให้โปรตีนเกิดการคลายตัวและสารละลายด่างช่วยเพิ่มความแรงของประจุ (สารละลายมีประจุเป็นลบเพิ่มขึ้น) ส่งผลให้มีแรงผลัก (Electrostatic repulsion)ระหว่างโมเลกุลเพิ่มขึ้นซึ่งแรงผลักที่เกิดขึ้นเกิดจากปฏิกิริยา Deamidationของโปรตีนกลูตามิน(Glutamine) และแอสพาราจีน (Asparagine)อีกทั้งการใช้ความร้อนร่วมกับสารละลายด่างยังเกิดปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนระหว่างซัลไฮดริกกับไดซัลไฟด์ (Sulfhydryl-Disulfide) และเกิดปฏิกิริยาไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) ของโปรตีน ซึ่งปฏิกิริยาเหล่านี้เป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน (Mine, 1997)ดังนั้นการใช้ความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง สามารถปรับปรุงสมบัติบางประการของโปรตีนได้

2.4.2 การดัดแปลงโปรตีนด้วยเอนไซม์

เอนไซม์ที่ใช้ในการดัดแปลงโปรตีนเป็นเอนไซม์กลุ่มโปรติเอส ประเภท ไฮโดรเลส (Hydrolase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะเพปไทด์ของโปรตีน โดยจะตัดพันธะเพปไทด์ของพอลิเพปไทด์ได้เป็นเพปไทด์และกรดอะมิโนอิสระนอกจากนี้เอนไซม์โปรติเอ สสามารถแบ่งเป็นประเภทต่างๆ ได้ หลายแบบ เช่นแบ่งตามลักษณะการตัดสายยาวของพอลิเพปไทด์ หรือแบ่งตาม กลไกการทำงาน เป็นต้น โดยลักษณะการตัดสายยาวของพอลิเพปไทด์ แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ เอกโซเปปติเดส (Exopeptidases) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเพปไทด์ด้านปลายโซ่ของโมเลกุลถ้าเป็นการตัดพันธะทางปลายด้านกลุ่มอะมิโน เรียกว่า Aminopeptidaseขณะที่การตัดพันธะทางปลายด้านกลุ่มคาร์บอกซิลเรียกว่า Carboxypeptidaseและเอนโดเปปติเดส (Endopeptidase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเพปไทด์อย่างอิสระภายในโซ่โมเลกุลของโปรตีนได้เป็นเพปไทด์สายสั้นๆ เอนโดเปปติเดสมีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนสูง เนื่องจากมีความจำเพาะต่อสับส เตรทที่เป็นเพปไทด์โมเลกุลใหญ่หลายชนิด ทำให้สามารถย่อยโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว(ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547)

นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมนิยมใช้เอนไซม์ทางการค้าในการย่อยโปรตีน โดยเอนไซม์เหล่านี้ส่วนใหญ่ได้มาจากเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติและสภาวะ ที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนแตกต่างกั น (Anonymous, 2000) ตัวอย่า งเอนไซม์ทางการค่า เช่น เอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase)เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Bacillus licheniformi*ทำหน้าที่เป็นเอนโดเปปติเ อสมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 55-60 °ซมีพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 8-8.5 (Jamdar et al., 2010)เป็นเอนไซม์ที่มีบริเวณเร่งที่กรดอะมิโนเซอรีน (Serine) ฮิสติดีน(Histidine) และแอสพาร์ติก (Aspartic acid)ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะต่อสับสเตรทค่อนข้างกว้าง และสามาถย่อยพันธะเพปไทด์ได้ดีโดยเฉพาะบริเวณหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนไม่มีขั้วเป็นหลัก (Adler-Nissen, 1986)และเอนไซม์ฟลาโวไซม์(Flavourzyme)เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Aspergillusoryzae*ทำหน้าที่เป็นทั้งเอนโดเปปติเดส และเอกโซเปปติเดส ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสต ที่ได้ไม่มีรสขม มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 50°ซ และมีพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง5-7 (Novozymes, 2000 อ้างอิงโดย ลีนาหง้าฝา, 2556)

2.5 คุณลักษณะของโปรตีนรำข้าวหลังการดัดแปลง

การจำแนกโปรตีนขึ้นอยู่กับกับวิธีการสกัดและความสามารถในการละลาย โดยโปรตีนหลักที่พบในรำข้าวแบ่งออกเป็น 4 ชนิด คือ อัลบูมินโกลบูลินโพรลามินและกลูติลิน(Onsaard, 2012 และWang et al., 1999)จากผลการทดลองของ Wang et al. (1999) พบว่าโปรตีนจากรำข้าวประกอบด้วยอัลบูมินร้อยละ 37 โกลบูลินร้อยละ 36 กลูติลินร้อยละ 22 และโพรลามินร้อยละ 5 แต่การทดลองของ Cao et al. (2009)พบอัลบูมินร้อยละ 42.71 โกลบูลินร้อยละ 12.5 กลูเตลินร้อยละ 40.25 และโพรลามินร้อยละ 3.24 และยังพบว่าสายเพปไทด์ 4 สายของโปรตีนจากรำข้าวมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 14-80 กิโลดาลตันเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Tang et al. (2003) พบสายเพปไทด์4 สาย มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 6.5-66.2 กิโลดาลตัน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำโปรตีนรำข้าวมาย่อยพบว่าน้ำหนัก

โมเลกุลของโปรตีนเล็กลง เช่นในงานวิจัยของ Ahmadifard et al. (2016) พบว่าโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีน้ำหนักโมเลกุล 19.58-35.57 กิโลดาลตันและโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์พบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเป็น 16-64 กิโลดาลตัน Phongthai et al. (2016) พบว่าโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 18.7-52.2 กิโลดาลตัน ทั้งนี้โปรตีนจากรำข้าวเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นและเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่งเมื่อเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองและเคซีน

2.6 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนดัดแปลง

สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนหมายถึง สมบัติของอาหารหรือส่วนผสมที่มีการนำไปใช้งานในอาหาร เช่น การละลาย (Solubility) ความสามารถในการอุ้มน้ำ (Water absorption capacity) ความสามารถในการอุ้มน้ำมัน (Oil absorption capacity) สมบัติการเกิดโฟม (Foaming properties) ความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifying properties) และการเกิดเจล (Gelling properties) เป็นต้นซึ่งเป็นสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่มีผลต่อพฤติกรรมทางโปรตีนในอาหารระหว่างการแปรรูป การเก็บรักษา การเตรียมอาหาร และการบริโภค

การละลายเป็นสมบัติเบื้องต้นที่สำคัญเนื่องจากจะมีอิทธิพลต่อสมบัติเชิงหน้าที่อื่นๆ มีความสัมพันธ์กับส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) โดยส่วนที่ชอบน้ำจะอยู่บริเวณพื้นที่ผิวของโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ และส่วนที่ไม่ชอบน้ำมักจะอยู่บริเวณภายในโมเลกุลของโปรตีน ดังนั้นหากโปรตีนมีส่วนที่ชอบน้ำมาก และมีส่วนที่ไม่ชอบน้ำน้อย โปรตีนจะมีสมบัติในการละลายที่ดี (วราทิพย์ วงษ์เอี่ยม , 2552) จากรายงานการวิจัยความสามารถในการละลายของโปรตีนที่ผ่านการย่อยหรือดัดแปลง เช่น Makayay and Theerakulkiat (2007) พบว่าความสามารถในการละลายของโปรตีนรำข้าวเพิ่มขึ้นเมื่อโปรตีนได้รับความร้อนร่วมกับสารเคมี เพราะความร้อนมีผลทำให้เกิดการแยกสลายโมเลกุลของโปรตีนที่มีขนาดใหญ่เกิดเป็นเพปไทด์ที่มีโมเลกุลต่ำ ส่งผลให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสกับน้ำได้มากขึ้นClemente et al. (1999) ศึกษาการละลายของโปรตีนถั่ว Chickpea ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่าโปรตีนถั่ว Chickpea มีการละลายดีขึ้น มีค่าการละลายร้อยละ 100 ที่พีเอช 7-8 ในขณะที่ย่อยด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีค่าการละลายร้อยละ 90 ที่ พีเอช7 Zhang et al. (2012) ศึกษาความสามารถในการละลายได้ของไนโตรเจนจากโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่พีเอชในช่วง 3-11 พบว่าโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีค่าการละลายเพิ่มขึ้น และ Phongthai et al. (2016) พบว่าโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีค่าการละลายเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับโปรตีนรำข้าวที่ไม่ผ่านการย่อย โดยโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีค่าการละลายร้อยละ 88-91

อิมัลชันคือระบบที่ประกอบด้วยอนุภาคที่เป็นของเหลวชนิดหนึ่งที่กระจายตัวเป็นหยดอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งของเหลวทั้งสองชนิดที่ผสมกันอยู่มีลักษณะไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ส่วน

ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน พบว่าเกี่ยวข้องกับกรดอะมิโนไม่มีขั้วบนผิวของโมเลกุล โดยการเกิดอิมัลชันเป็นผลมาจากการดูดซับโมเลกุลโปรตีนไว้บนผิวของเม็ดไขมัน กรดอะมิโนชนิดไม่มีขั้วจะทำให้โปรตีนสามารถเกาะตัวอยู่บนผิวของเม็ดไขมัน โดยจะแทรกตัวเข้าไปอยู่บนผิวของเม็ดไขมันและหันส่วนที่มีขั้วออกมาสัมผัสกับน้ำ (วราทิพย์ วงเอี่ยม,2552) Guan et al. (2007) พบว่าการย่อยจะช่วยเพิ่มความสมดุลระหว่างโปรตีนส่วนที่ชอบน้ำกับโปรตีนส่วนที่ชอบน้ำมัน (hydrophilic-lipophilic balance) ทำให้โปรตีนมีคุณสมบัติในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ที่ดี ช่วยให้ระบบอิมัลชันคงตัว Kim et al. (2005)และ Chen et al. (2014) รายงานว่าการใช้ความร้อนและสารเคมีสามารถช่วยปรับปรุงสมบัติการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนได้ เพราะการย่อยหรือการดัดแปลงโดยวิธีการใช้ความร้อนส่งผลให้โปรตีนเกิดการคลายตัวและเพิ่มพื้นที่ผิวส่วนที่ไม่ชอบน้ำ จึงทำให้อิมัลชันมีความคงตัว Chabanon et al. (2007) ศึกษาความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์และความคงตัวของการเกิดอิมัลชันของโปรตีนเมล็ดเรปซีดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่าโปรตีนเมล็ดเรปซีดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ดีกว่าโปรตีนเมล็ดเรปซีดที่ไม่ผ่านการย่อย นอกจากนี้ยังศึกษาโปรตีนเมล็ดเรปซีดที่ผ่านการย่อยโดยการแยกประเภทของโปรตีน คือ โกลบูลินและอัลบูมิล พบว่าโกลบูลินมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชันร้อยละ 50 และร้อยละ 45 ตามลำดับ ส่วนโปรตีนอัลบูมิลมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชันร้อยละ 54 และร้อยละ 69

ความสามารถในการอุ้มน้ำเป็นความสามารถของโมเลกุลที่สามารถรักษาน้ำเอาไว้ในโครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่มีอยู่ในอาหาร เกิดจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของน้ำกับส่วนที่ชอบน้ำของโปรตีน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการมีขั้วและไม่มีขั้วของกรดอะมิโน โดยที่กรดอะมิโนที่มีขั้วสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้ 2-3 โมเลกุล แต่กรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้ 1 โมเลกุล ส่วนความสามารถในการดูดซับน้ำมันเกิดจากน้ำมันกระจายตัวเข้าสู่ส่วนของโปรตีน โดยโปรตีนที่ไม่มีประจุจะจับตัวกับไขมันได้ดีจากการทดลองของ Zhang et al. (2012) พบว่าการเตรียมตัวอย่างโปรตีนได้ใช้ความร้อนร่วมกับสารเคมี โดยใช้สภาวะพีเอช 9.5 ที่อุณหภูมิ 50 °ซ พบว่าความสามารถในการอุ้มน้ำและความสามารถในการอุ้มน้ำมันเป็น 3.71 กรัมของน้ำต่อกรัมของโปรตีน และ 4.24 กรัมของน้ำมันต่อกรัมของโปรตีน ตามลำดับอีกทั้งยังพบว่าโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการอุ้มน้ำเป็น 4.4 กรัมของน้ำต่อกรัมของโปรตีน และมีความสามารถในการอุ้มน้ำมันเท่ากับ 5.13 กรัมของน้ำมันต่อกรัมของโปรตีน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการดัดแปลงโปรตีนช่วยทำให้สมบัติการอุ้มน้ำและอุ้มน้ำมันเพิ่มขึ้น

โฟมเป็นระบบที่ประกอบด้วยฟองอากาศหรือแก๊สกระจายตัวอยู่ในของแข็งหรือของเหลวที่มีความหนืดสูง ซึ่งการเกิดโฟมของโปรตีนมีความสัมพันธ์กับการละลายของโปรตีน ถ้าโปรตีนละลายได้มากหรือเกิดการกระจายตัวของโปรตีนในน้ำได้ดี ส่งผลให้โปรตีนแพร่กระจายไปยังผิวหน้าระหว่างน้ำและอากาศได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้เกิดการจับอากาศของโปรตีนเกิดเป็นโครงสร้างฟิล์มล้อมรอบ

ฟองอากาศ และโมเลกุลของโปรตีนจะต้องมีลักษณะที่เหนียวและยืดหยุ่น เพราะเป็นส่วนสำคัญที่จะทำให้โฟมคงตัว (Tang et al., 2003) โดยโปรตีนที่ผ่านการดัดแปลงจะช่วยเพิ่มความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟม(Zhao et al., 2012;Phongthai et al., 2016;Yust et al., 2010;Chabanon et al., 2007และJamdar et al., 2010)You et al. (2009) ได้ทำการศึกษาการดัดแปลงโปรตีนรำข้าวโดยใช้ความร้อนแบบ autoclaved ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เวลา 30 นาที พบว่าโปรตีนรำข้าวมีความสามารถในการเกิดโฟมเพิ่มขึ้น เพราะการใช้ความร้อนแบบวิธี autoclaved ส่งผลให้โครงสร้างของโปรตีนเกิดการคลายตัว ได้โมเลกุลของเพปไทด์ที่มีขนาดเล็กลงเช่นกัน

2.7 สมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชัน

ปัจจุบันมีการศึกษาประโยชน์ในเชิงสุขภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากพืชมากขึ้น ยกตัวอย่างเช่น ช่วยต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดความดัน หรือช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Li et al., 2005) โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตนั้นเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติที่เหมาะจะนำมาเป็นองค์ประกอบในอาหาร โดยเฉพาะคุณสมบัติด้านการเป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชัน ซึ่งสามารถนำมาทดแทนสารต้านการเกิดออกซิเดชันแบบสังเคราะห์ในผลิตภัณฑ์อาหารของมนุษย์ เช่น Butylatedhydroxyanisole(BHA)และ Butylatedhydroxytoluene(BHT)เป็นต้น วิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันมีหลายวิธี ดังนี้

ความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS radical scavenging activityซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุบวกเกิดจากสาร ABTS (2,2’-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) ทำปฏิกิริยากับเปอร์ออกซิเดชันของ metmyoglobinทำให้ได้สารละลายสีน้ำเงินแกมเขียว ที่สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTSอัตราการเกิดสารละลายสีน้ำเงินแกมเขียวจะช้าลง (Re et al., 1999)

ความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธี Metal ions chelating activity เป็นการทดสอบความสามารถในการคีเลตไอออนของโลหะ หรือความสามารถในการจับโลหะไอออน ซึ่งโลหะไอออนโดยเฉพาะ Fe^{2+} เป็นตัวสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระ โดยโลหะไอออน Fe^{2+} จะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนในอากาศ เกิดเป็นสารอนุมูล superoxide anion ซึ่งตัวอย่างที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสามารถไปจับกับโลหะไอออน (Fe^{2+}) เพื่อหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระได้ (Dinis et al., 1994)

ความสามารถในการรีดิวซ์ (Reducing power)เป็นการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์หรือให้อิเล็กตรอนของสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบแก่สารอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้นภายในระบบ โดยสารที่ต้องการทดสอบจะเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระแล้วทำให้เปลี่ยนเป็นสารที่คงตัว โดยอาศัยจากการวัดปฏิกิริยาการรีดิวซ์ของ Fe^{3+}เป็น Fe^{2+}ซึ่งจะทำให้มีสีน้ำเงิน (Yildirim et al., 2001)

ความสามารถต้านการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (Linoleic acid autoxidation)ซึ่งกรดลิโนเลอิกเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ไม่แข็งแรงและไวต่อปฏิกิริยา ทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระ จากนั้นทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศได้เป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ถ้าสารต้านอนุมูลอิสระมีพันธะคู่เป็นองค์ประกอบ ทำให้สามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระได้ จึงลด การเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก(Castro and Sato, 2015)

จากรายงานการวิจัยของ Zhu et al. (2006)พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากจมูกข้าวสาลีที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส มีความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกใกล้เคียงกับ α-tocopherolมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)ได้ดีเทียบเท่ากับ BHT และมีความสามารถในการจับโลหะไอออนได้ดี เนื่องจากโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ทำให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง มีสายเพปไทด์สั้นขึ้น การละลายเพิ่มขึ้น และมีประจุเพิ่มขึ้น ส่งผลให้สายเพปไทด์มีกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เป็น Prooxidantsเพิ่มขึ้นนำไปสู่การลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน สุภาวดีทรัพย์สิริไพบูรณ์ (2550)พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลส มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTSและสามารถต้านการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการย่อยหรือดัดแปลง Phongthaiet al. (2016) รายงานว่าโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับการย่อยร้อยละ5.04 มีความสามารถในการจับโลหะไอออนน้อย แต่เมื่อระดับการย่อยเพิ่มขึ้นมีความสามารถในการจับโลหะไอออนได้ดีและ Castro and Sato (2015) พบว่าโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการรีดิวซ์เพิ่มขึ้น (ค่าการดูดกลืนแสง0.399 นาโนเมตร) แต่โปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีความสามารถในการรีดิวซ์ต่ำ (ค่าการดูดกลืนแสง0.176 นาโนเมตร)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ สารเคมี และอุปกรณ์

3.1.1วัตถุดิบ

3.1.1.1 รำข้าวชนิดละเอียดจากโรงสีข้าวสินรุ่งเรือง จำกัด อำเภอเดชอุดม จังหวัดอุบลราชธานี

3.1.1.2 โปรตีนถั่วเหลือง จาก บริษัท ไทยฟูดแอนเคมิคอล จำกัด

3.1.1.3เอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase) จาก *Bacilluslicheniformis* บริษัท SIGMA-ALDRICHประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.1.4เอนไซม์ฟลาโวไซม์ (Flavourzyme) จาก *Aspergillusoryzae*บริษัท SIGMA-ALDRICH ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.2สารเคมี

3.1.2.1 n-Hexane food grade (C_6H_{14}) ยี่ห้อFisher ประเทศไทย

3.1.2.2 Sodium hydroxide analysis grade ยี่ห้อ Carlo Erbaประเทศฝรั่งเศส

3.1.2.3 Sodium chloride analytical grade ยี่ห้อ Ajax Finechemประเทศออสเตรเลีย

3.1.2.4 Hydrochloric acid Analytical gradeยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมนี

3.1.2.5 Sodium Dodecyl Sulfate Analytical grade ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมนี

3.1.3อุปกรณ์

3.1.3.1 ตู้อบแบบสุญญากาศ ยี่ห้อ WTBbinder รุ่น VD 115 S/N940048 ประเทศเยอรมนี

3.1.3.2 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert S/NE601.0265 รุ่น BE600 ประเทศเยอรมนี

3.1.3.3 เครื่องบด ยี่ห้อ Moulinex รุ่น 643 ประเทศเม็กซิโก

3.1.3.4 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ UV-VIS SPECTROMETRE ยี่ห้อ PG Instruments Limited รุ่น T60UV/Visible ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.3.5 ตู้อบลมร้อน ยี่ห้อ Memmertรุ่น UN10 ประเทศเยอรมนี

3.1.3.6 เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ยี่ห้อ HetoLabEquipment รุ่น FD 8 ประเทศเดนมาร์ก

3.1.3.7 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ NewBrunswickScientific รุ่น Innova ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.3.8 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP2215 ประเทศเยอรมนี

3.1.3.9 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิต่ำ ยี่ห้อ Universal รุ่น 32R ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.3.10 เครื่อง Miniprotein 3 cells ยี่ห้อ BIO-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.3.11 ตะแกรงร่อนขนาด 100 เมช ยี่ห้อ RETSCH ประเทศเยอรมนี

3.1.3.12 เครื่องกวนแม่เหล็ก ยี่ห้อ VORTEX-2GENIE รุ่น G56OE ประเทศไทย

3.1.3.13 เครื่องโฮโมจิไนเซอร์ยี่ห้อ POLY TRONรุ่น PT MR-2100ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.1.3.14 เครื่องZetasizerยี่ห้อMalvern Instrumentรุ่น ZEN3600 ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.3.15 เครื่องวัดสีอาหารยี่ห้อ Hunter Lab รุ่น Color Flexประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.3.16 กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Nikon Microscope Eclipse รุ่น E-400 ประเทศญี่ปุ่น

3.1.3.17 เครื่องโฮโมจิไนเซอร์ความดันสูง ยี่ห้อ SPX Lab Homogenizer รุ่น APV-2000 ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2วิธีการดำเนินงาน

การทดลองจะแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1ศึกษาวิธีการดัดแปลงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนรำข้าวแบ่งออก 2 วิธี คือ

1.1 การดัดแปลงโปรตีนรำข้าวด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง

1.2 การดัดแปลงโปรตีนรำข้าวด้วยเอนไซม์

ส่วนที่ 2 ศึกษาคุณลักษณะและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลง

ส่วนที่ 3 ศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลง

ส่วนที่ 1ศึกษาวิธีการดัดแปลงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนรำข้าว

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนรำข้าวเข้มข้น

นำรำข้าวมาทำแห้งด้วยเครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 °ซ จนมีความชื้นสุดท้ายมีค่าน้อยกว่าร้อยละ 10 ทำการสกัดน้ำมันส่วนที่เหลือออกด้วยเฮกเซน ในอัตราส่วน 1:9จนมีน้ำมันส่วนที่เหลือไม่เกินร้อยละ 5 ทำการระเหยเฮกเซนออกด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 °ซนาน 2 ชั่วโมง นำรำข้าวปราศจากน้ำมันที่ได้มาเติม น้ำกลั่นในอัตราส่วนระหว่างรำข้าวต่อน้ำกลั่นเป็น 1 :10 โดยน้ำหนักต่อ

ปริมาตร แล้วปรับพีเอชเป็น 9 ด้วยสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 4.0 โมลาร์ กวนทิ้งไว้นาน 1 ชม. นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่28,313 x g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นำสารละลายที่ได้ไปตกตะกอนที่พีเอช 4.5 ด้วยสารละลาย ไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 4.0 โมลาร์กวนสารละลายอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แยกตะกอนโปรตีนรำข้าวที่ได้ด้วยการเหวี่ยงแยก ที่28,313 x g ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 10 นาที จากนั้นทำให้เป็นกลางด้วย การปรับให้มีพีเอช 7 แล้วทำการไดอะไลซิส(Dialysis)ก่อนนำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) (ดัดแปลงจากChandiK.G. และ Sogi. S.D., 2007) กำหนดให้โปรตีนรำข้าว คือ RBPวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบรำข้าวเริ่มต้นและ โปรตีนรำข้าวเข้มข้น และตรวจสอบคุณลักษณะและสมบัติเชิงหน้าที่ต่อไป

3.2.2 การเตรียมโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง

นำโปรตีนรำข้าวเข้มข้นที่สกัดได้ จากข้อ 3.2.1 และโปรตีนถั่วเหลือง (ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ) ผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วนระหว่างโปรตีนกับน้ำกลั่นเป็น 1:10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปรับพีเอชเป็น 9.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0โมลาร์กวนทิ้งไว้นาน 30 นาที แล้วนำไปให้ความร้อนโดยใช้อุณหภูมิ 60 °ซ นาน 60 นาที ทำให้เย็นโดยมีอุณหภูมิเท่ากับ30 °ซนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกที่28,313 x g นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 °ซ นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปตกตะกอนที่พีเอช 4.5 ด้วยสารละลาย ไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1.0โมลาร์ ทำการเหวี่ยงแยกเพื่อเอาตะกอนโปรตีน จากนั้น ทำให้เป็นกลางด้วย การปรับให้มี พีเอช 7นำไป ทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแช่เยือกแข็ง (Freeze dry)กำหนดให้โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (Modified Rice Bran Protein)คือ MRBPจากนั้นนำไปตรวจสอบคุณลักษณะและสมบัติเชิงหน้าที่ต่อไป

3.2.3 การเตรียมโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์

3.2.3.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อระดับการย่อยของโปรตีน

เตรียมสารละลายโปรตีน ระดับความเข้มข้น ร้อยละ 1 ทำการย่อยด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ เอนไซม์อัลคาเลส(534Unit/g) และ เอนไซม์ฟลาโวไซม์(522 Unit/g)

1) การย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0-2 โดยน้ำหนักเอนไซม์ต่อน้ำหนักโปรตีน ด้วยสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์พีเอช8 ใน อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60 °ซ นาน 60 นาที (Jamdar et al., 2010)

2) การย่อยด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0- 15 โดยน้ำหนักเอนไซม์ต่อน้ำหนักโปรตีน ในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์พีเอช7 ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 °ซนาน 60 นาที(ดัดแปลงจาก Novozymes, 2000;อ้างอิงจาก ลีนาหง้าฝา, 2556)

จากนั้นทำการหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 90 °ซ นาน15 นาที และทำให้เย็นทันทีด้วยน้ำธรรมดา นำไปเหวี่ยงแยกที่14,156 x g นาน 15 นาที ก่อนนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ระดับการย่อยต่อไป

3.2.3.2 ศึกษาระยะเวลาการย่อยต่อระดับการย่อยของโปรตีน

เลือกความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ให้ระดับการย่อยที่เหมาะสมจากผลการทดลองข้อ 3.2.3.1 มาทำการเตรียม สารละลายโปรตีนรำ ข้าวทำการเตรียมเหมือนกับข้อ3.2.3.1 จากนั้นทำการย่อยด้วย เอนไซม์อัลคาเลส นาน 0-180 นาที และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ นาน 0-12 ชั่วโมง ทำการหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 90 °ซนาน10 นาที และทำให้เย็นทันทีนำไปเหวี่ยงแยกที่ 14,156 x g นาน 15 นาที ก่อนนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ระดับการย่อยต่อไป

3.2.3.3การเตรียมโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์

เลือกความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยจากการทดลองข้อ 3.2.3.1-3.2.3.2 เพื่อเตรียม โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ ที่ระดับการย่อย ของเอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ร้อยละ 0-5, 6-10, 11-15, 16-20 และ >20 นำไปทำแห้ง แบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) และตรวจคุณลักษณะและสมบัติเชิงหน้าที่ ต่อไป ทั้งนี้กำหนดให้โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (Modified Rice Bran Protein by Alcalase) คือ MRBP-A และโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (Modified Rice Bran Protein by Flavourzyme) คือ MRBP-F

3.2.4 ตรวจสอบผลผลิต องค์ประกอบทางเคมีและการวิเคราะห์ระดับการย่อย

3.2.4.1 ปริมาณผลผลิตที่ได้

ปริมาณผลผลิตที่ได้ (yield) ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงคำนวณจากสูตร

$$\text{ปริมาณผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนัก โปรตีนดัดแปลง} \times 100}{\text{น้ำหนักโปรตีนรำข้าวเริ่มต้น}}$$

3.2.4.2 องค์ประกอบทางเคมี

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวและโปรตีนรำข้าวเข้มข้นได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า เยื่อใย และคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีการของ AOAC (1999) ส่วนคาร์โบไฮเดรตคำนวณดังนี้

คาร์โบไฮเดรต = 100 – (ความชื้น + ไขมัน + เถ้า + โปรตีน)

3.2.4.3การวิเคราะห์ระดับการย่อย

การวิเคราะห์ ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis; DH)(MRBPทำการวิเคราะห์ระดับการย่อยที่ความเข้มข้นโปรตีนแตกต่างกันในช่วง 0.2-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ด้วยวิธีการวัดโปรตีนภายหลังตกตะกอนด้วย กรดไตรคลอโรอะซีติก(Trichloroacetic acid; TCA) ร้อยละ 10ตามวิธีของ Qi et al. (1997) ใช้สารละลายโปรตีน 15 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก(ร้อยละ 20) 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่7,600 x g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำสารละลายโปรตีนส่วนใสไปวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Biuret (Robinson andHodgen, 1940)สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด ทำโดยนำโปรตีนรำข้าวมาย่อยด้วยสารละลาย SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 จากนั้นนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 85 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นทันที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7 ,600 x g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำสารละลายโปรตีนส่วนใสไปวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Biuret (Robinson and Hodgen, 1940)

DH (%) = (ปริมาณโปรตีนหลังจากตกตะกอน/ปริมาณโปรตีนทั้งหมด) x 100

ส่วนที่ 2 ศึกษาคุณลักษณะและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

3.2.5 คุณลักษณะของโปรตีน

3.2.5.1 ค่าสี

วิเคราะห์ค่าสีของโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ด้วยเครื่องวัดสีอาหารในระบบฮันเตอร์ (Hunter Lab) โดยค่า L* เป็นค่าความสว่าง (Lightness) ค่า a* เป็นค่าสีแดง-สีเขียว (Redness-Greeness) และค่า b* เป็นค่าสีเหลือง-น้ำเงิน(Yellowness-Blueness) ดัดแปลงตามวิธีของ Kaur and Singh (2007) ส่วนค่า ΔE*และ ΔH* (HunterLab, 2007)คือ คำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

$$\Delta H^* = \sqrt{\Delta E^{*2} + \Delta L^{*2} + \Delta C^{*2}}$$

3.2.5.2 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนดัดแปลงด้วยโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล (Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE) ตามวิธีของ Laemmli (1970) ตัวอย่างจะทำการปรับปริมาณความเข้มข้นโปรตีนสุดท้าย 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งที่ใช้และไม่ใช้ เบตาเมอร์แคปโตเอธานอล (β-mercaptoethanol) ใส่ใน

เจลสแตกกิ้ง (Stacking gel) ร้อยละ 4 และเจลแยก (Separating gel) ร้อยละ 12 ใน Tris running buffer (พีเอช 8.3) ที่ความต่างศักดิ์ 180 โวลต์ ทำการย้อมสีด้วย Coomassiebrillian blue R-250 ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 และล้างออกด้วย Destaining solution 1 (50% methanol: 7.5% acetic acid: 42.5% distilled water)นาน 30 นาที แล้วล้างด้วย Destaining solution 2 (5% methanol: 7.5% acetic acid: 87.5% distilled water) นาน 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานขนาด 5-245 กิโลดาลตัน(ยี่ห้อ BLUelfPrestained Ladder)

3.2.6สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

3.2.6.1 การละลายของโปรตีน

การวิเคราะห์คุณสมบัติการละลายของโปรตีน (Protein solubility) ดัดแปลงจาก Onsaard et al. (2010) และSumura et al. (2005)เตรียมสารละลายโปรตีนความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำโปรตีนละลายน้ำกลั่นแล้วปรับพีเอชในช่วงระหว่าง 3 ถึง 9 กวนสารละลายโปรตีนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่14,156 x g นาน 10 นาที วัดปริมาตรส่วนใสที่วัดได้ แล้วนำไปวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Biuret (Robinson and Hodgen, 1940) โดยใช้โบวินซีรัมแอลบูมิน (Bovine Serum Albumin: BSA) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน โปรตีนที่ละลายได้คำนวณจาก

$$\text{Protein solubility (\%)} = 100 \times (P_s/P_t)$$

เมื่อP_s = ปริมาณโปรตีนในสารละลายหลังจากทำการเหวี่ยงแยก

P_t = ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในตัวอย่าง

3.2.6.2 สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์

ทดสอบสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifying properties)ดัดแปลงจากวิธีของOnsaardet al. (2006) การเตรียมสารละลายโปรตีนแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (1) RBPและ MRBP ใช้ความเข้มข้นโปรตีนร้อยละ 0.2-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ (2) MRBP-A และ MRBP-F ใช้สารละลายโปรตีนความเข้มข้นร้อยละ 0.4 เตรียมโดยละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์พีเอช6.5 (สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีส่วนผสมของโซเดียมเอไซด์ (Sodium azide)0.02 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) กวนสารละลายที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที แล้วผสมสารละลายโปรตีนร้อยละ 90 กับน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10 ด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ที่ความเร็ว 12 ,000 รอบต่อนาทีนาน 2 นาที และนำไปเข้าเครื่องโฮโมจิไนเซอร์แรงดันสูงที่ความดัน 3 ,000 psiจำนวน 3 รอบนำตัวอย่างอิมัลชันที่ได้ไปตรวจสอบคุณสมบัติดังนี้

1) การกระจายตัวและขนาดอนุภาคเม็ดไขมัน

การวัดการกระจายตัว (Particle distribution)และขนาดอนุภาคเม็ดไขมัน (Particle size)ด้วยเครื่อง Zetasizerโดยใช้หลักการกระเจิงของแสงนำ ตัวอย่างอิมัลชัน มาเจือจาง 1,000 เท่าด้วยสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช6.5เพื่อหลีกเลี่ยงการกระเจิงหลายครั้ง จากนั้นทำการวัดตัวอย่างอิมัลชันของแต่ละความเข้มข้นของโปรตีนผลลัพธ์ที่ได้จะแสดงเป็นการกระจายตัว และค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาคเม็ดไขมัน ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2) ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าของอนุภาคเม็ดไขมัน

ตัวอย่างอิมัลชัน ทำการ การเจือจาง 1 ,000 เท่าด้วยสารละลาย ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 6.5 การวัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (Zeta-potential)ในตัวอย่างอิมัลชันด้วยเครื่องZetasizerมีหน่วยเป็นมิลลิโวลต์ (mV)

3) ดัชนีการเกิดครีม

นำตัวอย่างอิมัลชันที่ได้จากการเตรียมลงในหลอดทดลอง (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร และมีความสูง 125 มิลลิเมตร) โดยทำการชั่งน้ำหนักตัวอย่างอิมัลชันให้ได้ 10 กรัม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดความสูงของการแยกชั้น 2 ส่วน คือ ส่วนทึบแสง (Opaque layer) จะอยู่ส่วนบนของหลอดเรียกว่า ครีม และส่วนโปร่งแสง (Transparent layer) จะอยู่ส่วนล่างของหลอดเรียกว่า ซีรัม คำนวณดัชนีการเกิดครีม(Creaming index)ดังนี้

$$\text{Creaming index} = 100 \times (H_S/H_E)$$

เมื่อ H_S= ความสูงทั้งหมดของตัวอย่างอิมัลชัน

H_E= ความสูงของชั้นซีรัมของตัวอย่างอิมัลชัน

4) โครงสร้างทางจุลภาคของอนุภาคเม็ดไขมัน

การวัดโครงสร้างของขนาดอนุภาคของอิมัลชัน ใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (conventional optical microscope) กำลังขยาย 100 เท่า บันทึกภาพโดยกล้องดิจิตอลที่เชื่อมต่อกับซอฟต์แวร์ภาพ(ACDsee Pro 5) ที่ติดตั้งบนเครื่องคอมพิวเตอร์

3.2.6.3 ความสามารถในการอุ้มน้ำ

ความสามารถในการอุ้มน้ำ(Water absorption; WA) ของโปรตีนดัดแปลงตามวิธีของSosulski (1962)ใช้ตัวอย่างโปรตีน 1 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,156 x g เป็นเวลา 10 นาที ทำการแยกส่วนใสออก ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำจะแสดงเป็นกรัมน้ำต่อกรัมโปรตีน คำนวณได้ดังสมการ

$$WA\ (g/g) = (W_2-W_1)/W_0$$

เมื่อ W_0= น้ำหนักแห้งตัวอย่าง (กรัม)

W_1 = น้ำหนักหลอดรวมน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (กรัม)

W_2 = น้ำหนักหลอดรวมกับน้ำหนักตะกอน (กรัม)

3.2.6.4ความสามารถในการอุ้มน้ำมัน

ความสามารถในการอุ้มน้ำมัน (Fat absorption; FA)ของโปรตีนดัดแปลง ตามวิธีของ Lin et al. (1974) ใช้โปรตีนรำข้าว 1 กรัม แล้วเติมน้ำมันถั่วเหลือง 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,156 x g เป็นเวลา 10 นาที ทำการแยกส่วนใสออก ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำมันจะแสดงเป็นกรัมน้ำมันต่อกรัมโปรตีน คำนวณได้ดังสมการ

$$FA\ (g/g) = (F_2-F_1)/F_0$$

เมื่อ F_0 = น้ำหนักแห้งตัวอย่าง (กรัม)

F_1 = น้ำหนักหลอดรวมน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (กรัม)

F_2 = น้ำหนักหลอดรวมกับน้ำหนักตะกอน (กรัม)

3.2.6.5สมบัติการเกิดโฟม

ทดสอบสมบัติการเกิดโฟม ดูความสามารถในการเกิดโฟม (Foaming capacity; FC) และความคงตัวของโฟม(Foaming stability; FS) ดัดแปลงตามวิธีของ Jamdaret al. (2010) นำโปรตีนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ละลายน้ำกลั่นแล้วปรับพีเอชเป็น 3 , 5, 7 และ 9 จากนั้นทำการปั่นผสมที่ความเร็ว 12 ,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที แล้วรีบเทใส่กระบอกตวงขนาด 25 มิลลิลิตร อ่านปริมาตรอย่างรวดเร็วภายใน 30 วินาที จากนั้นตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วอ่านปริมาตรอีกรอบ คำนวณค่าได้ดังสมการ

$$FC\ (\%) = [(A-B)/B] \times 100$$

$$FS\ (\%) = [(A_{10\ min}-B)/(A-B)] \times 100$$

เมื่อ B = ปริมาตรก่อนการตีโฟม (มิลลิลิตร)

A = ปริมาตรหลังจากตีโฟม(มิลลิลิตร)

$A_{10\ min}$ = ปริมาตรหลังจากตั้งทิ้งไว้ 10 นาที (มิลลิลิตร)

ส่วนที่ 3 ศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลง

3.2.7 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลง

3.2.7.1 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity ดัดแปลงจากวิธีThamnarathip et al. (2016) และ Re et.al (1999)ทำโดยปิเปตสารละลายตัวอย่างโปรตีน (0-8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (Blank: ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง) ลงในหลอดทดลองที่หุ้มด้วยฟอยด์แล้วเติมสารละลาย $ABTS^{+}$ ที่เจือจางแล้วปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 6 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตรจากนั้นทำการเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Troloxและคำนวณค่า EC_{50} (50% Effective Concentration)

3.2.7.2 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี Metal ions chelating activity ตามวิธีของPhongthai et al. (2016) ทำโดยปิเปตสารละลายโปรตีนที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (Blank: ใช้น้ำกลั่น)เติมน้ำ DI(Deionized water) 3.7 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลาย Ferrous chlorideความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรแล้วเติมสารละลาย Ferrozineความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน EDTA(Ethylene diamine tetra-acetic acid)

3.2.7.3 ความสามารถในการรีดิวซ์ (Reducing power)ตามวิธีของ Castro and Sato (2015) และ Yildirim et al. (2001)ปิเปตสารละลายโปรตีนที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม Phosphate buffer (พีเอช 6.6) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เติม Potassium ferricyanideความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 50 °ซ นาน 30 นาทีในที่มืด จากนั้นเติม TCA (Trichloroacetic acid)ความเข้มข้นร้อยละ 10ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 x g นาน 10 นาที จากนั้นใช้สารละลายส่วนใส 1 มิลลิลิตร เติมน้ำ DI(Deionized water) 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย Ferric chloride ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ผลการทดลองแสดงในรูปของการดูดกลืนแสงโดยพิจารณาว่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความสามารถในการรีดิวซ์

3.2.7.4 ความสามารถต้านออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (Linoleic acid autoxidation) ตามวิธีของ Castro and Sato (2015)ปิเปตสารละลายโปรตีนที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยใช้ Phosphate buffer (pH 7)ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ในการเจือจาง (Blank: ใช้น้ำกลั่น) จากนั้นเติมสารละลาย Linoleic acid ปริมาตร 130 ไมโครลิตร เติมเอทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันปิดฝา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °ซ นาน 24 ชั่วโมง ในที่มืด จากนั้นนำมาวิเคราะห์ระดับการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธี Ferric thiocyanateโดยการดูดสารละลายตัวอย่างมา 0.1 มิลลิลิตร เติมเอทานอลร้อยละ 75 ปริมาตร 4.7 มิลลิลิตร เติม Ammonium thiocyanateร้อยละ 30 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และเติม Ferrous chloride เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่

อุณหภูมิห้อง 3 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร บันทึกค่า และคำนวณค่ากิจกรรม(Inhibition) ในหน่วยร้อยละ (%)

$$\text{Inhibition (\%)} = [(\text{Abs.blank-Abs.sample})/\text{Abs.blank}] \times 100$$

3.3การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์เชิงสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มภายในบล็อกสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) และนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างทรี ทเมนต์โดยใช้ Duncan’s Multiple Rage Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

ส่วนที่ 1 ผลของวิธีการดัดแปลงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนรำข้าว

4.1 องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวรำข้าวที่สกัดน้ำมัน โปรตีนรำข้าว และโปรตีนถั่วเหลือง และผลผลิตรำข้าวที่สกัดน้ำมัน และโปรตีนรำข้าว

องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว (RB) รำข้าวที่สกัดน้ำมัน (DRB) โปรตีนรำข้าว (RBP)และโปรตีนถั่วเหลือง (SP)และผลผลิตของ รำข้าวที่สกัดน้ำมัน (DRB) และโปรตีนรำข้าว (RBP) แสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่ารำข้าวมีปริมาณไขมัน และโปรตีน เท่ากับร้อยละ 14.99 และ 12.49 ตามลำดับ เมื่อนำรำข้าวไปผ่านการสกัดน้ำมันออก พบว่ามีปริมาณไขมันลดลง (ร้อยละ 2.15) และโปรตีนสูงขึ้น (ร้อยละ 18.46) และเมื่อนำรำข้าวที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกไปสกัดโปรตีนรำข้าว พบว่าองค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนรำข้าวเท่ากับ โปรตีนร้อยละ 78.20 ไขมันร้อยละ 2.06 ความชื้นร้อยละ 4.87 เถ้าร้อยละ 0.63 และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 11.50 เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลือง พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองจะมีปริมาณโปรตีนสูงกว่า (ร้อยละ 80.52) และปริมาณไขมันต่ำกว่า (ร้อยละ 0.10)โปรตีนรำข้าว Jiamyangyuen et al. (2005) รายงานว่าองค์ประกอบของรำข้าวประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 12.6 ไขมันร้อยละ 21.30 เยื่อใยร้อยละ 5.59 เถ้าร้อยละ 8.97 และความชื้นร้อยละ 8.50 และองค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวที่สกัดน้ำมันออกมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 13.89 ไขมันร้อยละ 1.92 ทั้งนี้องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวและรำข้าวที่สกัดน้ำมันออกที่แตกต่างกัน อาจเนื่องจากกระบวนการสีข้าวซึ่งเป็นผลมาจากการขัดผิวเมล็ดข้าวและกระบวนการสกัดไขมันออกจากรำข้าวที่แตกต่างกันทำให้องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวและรำข้าวสกัดไขมันออกแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนรำข้าวจะมีค่าใกล้เคียงกับ Yeom et al. (2010) รายงานว่าองค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนรำข้าวผ่านการล้างด้วย เอทานอลร้อยละ 30 จำนวน 2 ครั้ง จะมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 77.62 และไขมันร้อยละ 0.75

ส่วนผลผลิต (Yield) โปรตีนรำข้าวที่ผ่านการสกัดที่พีเอช 9 นาน 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปตกตะกอนที่พีเอช 4.5 มีค่าเท่ากับร้อยละ 18.39 (ตารางที่ 4.1)ปริมาณผลผลิตของ โปรตีนรำข้าวเข้มข้น ที่ได้มีค่าน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณโปรตีนรำข้าวส่วนใหญ่ร้อยละ 75 เป็นโปรตีนที่ละลายได้ดีในน้ำ คือ อัลบูมิน (Albumin) และ ละลายได้ใน สารละลายกรดและด่าง คือ กลูเตลิน (Glutelins) ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการสกัดคือ พีเอช ระยะเวลาในการสกัด มีผลต่อปริมาณผลผลิตของโปรตีนที่ได้ ถึงแม้ว่าผลผลิตโปรตีนรำข้าวที่สกัดได้จะต่ำ แต่ปริมาณโปรตีนของโปรตีนรำข้าวสูงถึงร้อยละ 78.20 จึงมีความ

เป็นไปได้และเหมาะสม ในการนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนรำข้าวดัดแปลงให้มีสมบัติเชิงหน้าที่ที่เหมาะสมในการเป็นส่วนผสมอาหารต่อไป

ตารางที่ 4.1องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวรำข้าวที่สกัดน้ำมัน โปรตีนรำข้าวและโปรตีนถั่วเหลือง และผลผลิตรำข้าวที่สกัดน้ำมัน และโปรตีนรำข้าว

องค์ประกอบเคมี (ร้อยละฐานแห้ง)	รำข้าว	รำข้าวที่สกัดน้ำมัน	โปรตีนรำข้าว	โปรตีนถั่วเหลือง
ความชื้น	4.30±0.08[b]	5.53±0.48[b]	4.87±1.76[b]	14.14±0.04[a]
โปรตีน[1]	12.49±0.22[c]	18.46±0.26[b]	78.20±2.30[a]	80.52±0.26[a]
ไขมัน	14.99±0.07[a]	2.15±0.06[b]	2.06±0.33[b]	0.10±0.02[c]
เถ้า	6.81±0.16[b]	11.09±0.23[a]	3.37±0.01[c]	4.25±0.03[c]
เยื่อใย	5.41±0.33[b]	8.52±0.15[a]	0.63±0.14[c]	0.48±0.18[c]
คาร์โบไฮเดรต[2]	61.58±0.15[a]	62.76±0.36[a]	11.50±3.47[b]	0.51±0.11[c]
ผลผลิต (Yield) ร้อยละ	-	66.23±1.15	18.39±0.40	-

หมายเหตุ:ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a,b,c]อักษรกำกับที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

[1]factor ที่ใช้ในการคำนวณคือ 6.25

[2] ประเมินค่าความแตกต่างคาร์โบไฮเดรต = 100 – (ความชื้น + ไขมัน + เถ้า + โปรตีน)

4.2 ผลการดัดแปลงโปรตีนรำข้าวด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง

โปรตีนรำข้าว (MRBP) และโปรตีนถั่วเหลือง (MSP) ที่ผ่านการ ดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่างแสดงดังภาพที่4.1

MRBP MSP

ภาพที่4.1โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) และโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง(MSP)

ผลของระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH)ของMRBPและ MSP แสดงดังตารางที่ 4.2 พบว่าระดับการย่อยของ MRBPและ MSP มีค่าประมาณร้อยละ 0.43-1.98 และร้อยละ 0.22-0.64 ตามลำดับ โดยผลของความเข้มข้นของโปรตีนรำข้าวช่วงร้อยละ 0.2-0.6 ระดับการย่อยมีค่าสูงขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นของโปรตีนรำข้าวช่วงร้อยละ 0.8-1.0 เริ่มคงที่ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ ($p \geq 0.05$) ส่วนความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองช่วงร้อยละ 0.2-1.0ไม่แตกต่างทางสถิติ ($p \geq 0.05$)ระดับการย่อยของโปรตีนรำข้าวดัดแปลง และ โปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลง ที่แตกต่างกัน อาจเนื่องจากสัมพันธ์กับความสามารถในการละลายของโปรตีนที่แตกต่างทำให้ผลค่าระดับการย่อยของโปรตีนทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกัน จาก ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็น ว่าการใช้ความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง มีผลต่อการย่อยหรือทำลายพันธะเพปไทด์ภายในโครงสร้างของโปรตีน

ตารางที่ 4.2ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH) ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง(MRBP) และโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง(MSP)

ความเข้มข้นของโปรตีน (ร้อยละ)	ระดับการย่อย (ร้อยละ)	
	MRBP	MSP
0.2	0.43 ± 0.17^{b}	0.22 ± 0.17^{a}
0.4	0.63 ± 0.30^{b}	0.42 ± 0.34^{a}
0.6	0.92 ± 0.52^{b}	0.64 ± 0.21^{a}
0.8	2.16 ± 0.96^{a}	0.53 ± 0.18^{a}
1.0	1.98 ± 0.25^{a}	0.24 ± 0.15^{a}

หมายเหตุ:ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยที่ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

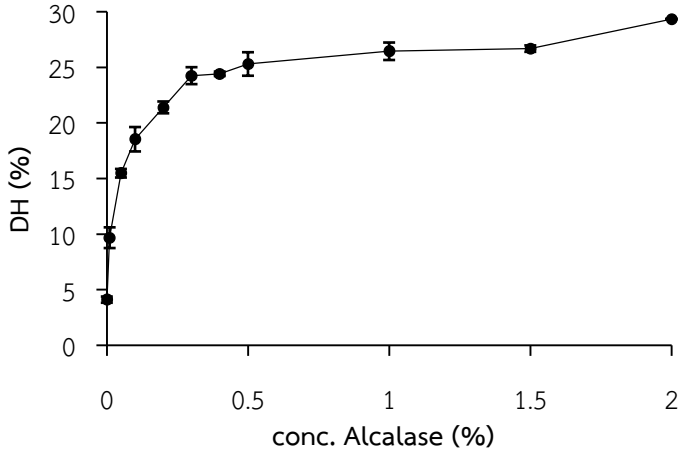
$^{a-c}$อักษรกำกับที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่$p \leq 0.05$

4.3 ผลการเตรียมโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์

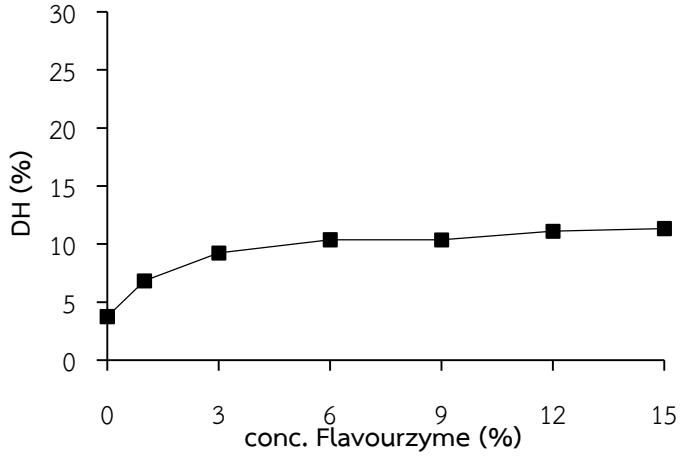
4.3.1 ผลของปริมาณเอนไซม์ต่อระดับการย่อยของโปรตีน

ผลของระดับการย่อยของโปรตีนรำข้าว ดัดแปลง ด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (MRBP-A)ความเข้มข้นร้อยละ 0-2 และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (MRBP-F) ความเข้มข้นร้อยละ 0- 15 โดยน้ำหนักเอนไซม์ต่อน้ำหนักโปรตีนทั้งหมดในสารละลาย นาน 60 นาที แสดงดังภาพที่ 4.2 พบว่าระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH)ของ MRBP-A และ MRBP-F เพิ่มขึ้นเมื่อ ความเข้มข้นของ เอนไซม์เพิ่มขึ้น โดยที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาการย่อยของ MRBP-A ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 ถึง 0.3 จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว และคงที่ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.4-2.0 (DH ร้อยละ 25) (ภาพที่ 4.2A) ส่วนอัตราการเกิดปฏิกิริยาการย่อยของ MRBP-F ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 ถึง 6 จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและคงที่ที่ความเข้มข้นร้อยละ 9 ถึง 15(DH ร้อยละ 10) (ภาพที่ 4.2B) ทั้งนี้เนื่องจากการลดลงของอัตราการย่อยอาจเนื่องมาจากการลดลงของ โมเลกุลของสารตั้งต้นหรือซับสเตรท(Substrate)ที่จำเพาะสำหรับการทำงานของเอนไซม์ เมื่อเปรียบเทียบระดับการย่อยและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ พบว่าระดับการย่อยของMRBP-A สูงกว่า (DH ร้อยละ 25) และใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำกว่า MRBP-F (DH ร้อยละ 10) อาจเนื่องจาก เอนไซม์อัลคาเลส มีความเหมาะสมและจำเพาะกับ ซับสเตรทของโปรตีนรำข้าวมากกว่า เอนไซม์ฟลาโวไซม์ จากการทดลองจึงเลือกความเข้มข้นของ เอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ที่ร้อยละ 0.3 และ 6 เพื่อใช้ในการ ศึกษาระยะเวลาต่อระดับการย่อยของโปรตีนต่อไป

(A)



(B)

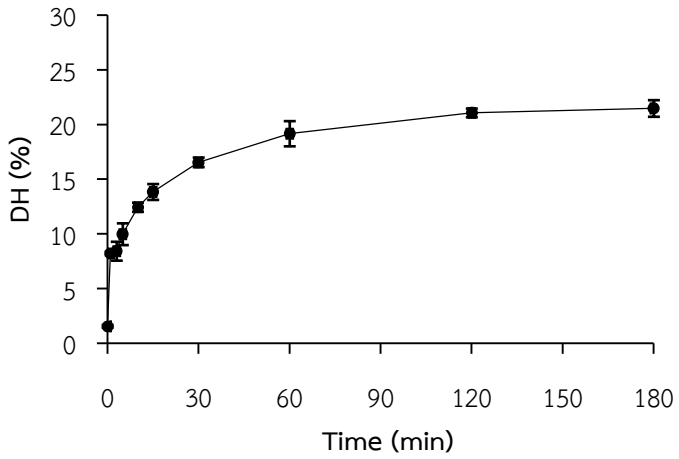


ภาพที่ 4.2 ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH) ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0-2 (ภาพ A)และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0-15(ภาพ B)

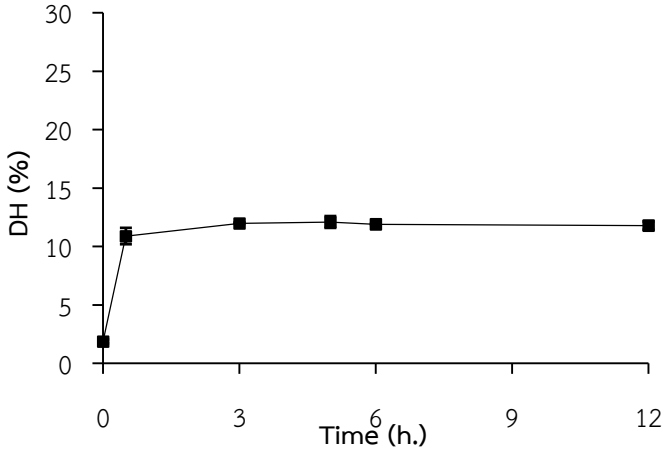
4.3.2 ผลระยะเวลาการย่อยต่อระดับการย่อยของโปรตีน

ผลของระยะเวลาการย่อยต่อระดับการย่อย(Degree of hydrolysis: DH)ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (MRBP-A)ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 นาน 180 นาที และเอนไซม์ฟลาโวไซม์(MRBP-F)ความเข้มข้นร้อยละ 6 นาน12ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 4.3 พบว่าระยะเวลามีผลต่อระดับการย่อย โดยระดับการย่อยจะเพิ่มขึ้นรวดเร็วที่ 30 นาทีทั้งMRBP-A (DHร้อยละ 17) และMRBP-F(DH ร้อยละ 11)จากนั้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาของการย่อย ลดลงและคงที่ (DH ร้อยละ 19 และร้อยละ 12 ตามลำดับ) ทั้งนี้เนื่องจากเกิดการแข่งขันระหว่างโปรตีนที่เป็นสารตั้งต้นและเพปไทด์ที่เป็นผลิตภัณฑ์ในการเข้าจับกับเอนไซม์ ซึ่งมีความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการย่อยต่อระดับการย่อยของโปรตีน

(A)



(B)



ภาพที่ 4.3ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH) ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลสร้อยละ 0.3 ที่ระยะเวลาการย่อย 0-180 นาที (ภาพ A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 6 ที่ระยะเวลาการย่อย 0-12 ชั่วโมง(ภาพ B)

4.3.3ระดับการย่อยของโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์

จากผลการทดลองข้อ 4.3.1-4.3.2 เลือกความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยเพื่อให้ได้ระดับการย่อยต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.3 และ 4.4

ผลการทดลองพบว่า โปรตีนรำข้าว ดัดแปลง ด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (MRBP-A) ที่ความเข้มข้นร้อยละ0.3 ระยะเวลาการย่อยนาน 0, 3, 15, 60และ 180 นาที ให้ระดับการย่อย(Degree of hydrolysis: DH)ประมาณร้อยละ 1.55, 8.42, 13.83, 19.16และ 21.47ตามลำดับและให้การละลายของโปรตีนที่ร้อยละ 61.28, 64.85, 59.00, 55.12และ 55.78ตามลำดับ(ตารางที่ 4.3)

ส่วนโปรตีนรำข้าว ดัดแปลง ด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (MRBP-F) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 6 ระยะเวลาการย่อยนาน 0 , 30 และ 300 นาที ให้ระดับการย่อย (DH) ประมาณร้อยละ 1.87,10.88

และ 12.08 ตามลำดับ และให้การละลายของโปรตีน ที่ร้อยละ 38.21, 35.12 และ31.99ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4)จะเห็นได้ว่าการไฮโดรไลซ์โปรตีนรำข้าวด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ให้ระดับการย่อยและการละลายของโปรตีนที่สูงกว่าการใช้ เอนไซม์ฟลาโวไซม์ แม้ว่าเอนไซม์ฟลาโวไซม์ เป็นเอนไซม์ชนิด เอนโดโปรติเอส-เอกโซโปรติเอส (Endo-exo protease) ที่สามารถตัดทั้งปลายคาร์บอกซิลิก(คาร์บอกซิเปปติเดส) หรือปลายของกรดอะมิโน (อะมิโนซิเปปติเดส) และตัดภายในของสายพันธะ โพลีเพปไทด์ได้ ส่วนเอนไซม์อัลคาเลส เป็นเอนไซม์ชนิดเอนโดโปรติเอส (Endoprotease) จะตัดพันธะเอไมด์ในสายโปรตีนเท่านั้น อย่างไรก็ตามอาจเนื่องจาก เอนไซม์อัลคาเลส มีความจำเพาะต่อ ซับสเตรท (Substrate) ที่มากกว่าทำให้ระดับการย่อยที่ได้สูงกว่าและส่งผลให้การละลายสูงกว่าด้วย

ตารางที่4.3 เวลาที่ใช้ในการย่อย ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH) และปริมาณโปรตีนที่ละลายของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลสร้อยละ 0.3

ช่วงระดับการย่อย (DH)	เวลา (นาที)	DH (ร้อยละ)	ปริมาณโปรตีนที่ละลาย (ร้อยละ)
DH0-5	0	1.55 ± 0.13^{e}	61.28 ± 3.39^{ab}
DH6-10	3	8.42 ± 0.86^{d}	64.85 ± 3.26^{a}
DH11-15	15	13.83 ± 0.73^{c}	59.00 ± 2.19^{abc}
DH16-20	60	19.16 ± 1.15^{b}	55.12 ± 4.51^{c}
DH>20	180	21.47 ± 0.76^{a}	55.78 ± 0.88^{bc}

หมายเหตุ: ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

^{a,b,c}อักษรกำกับที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\leq0.05$

ตารางที่4.4 เวลาที่ใช้ในการย่อย ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH) และปริมาณโปรตีนที่ละลายของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 6

ช่วงระดับการย่อย (DH)	เวลา (นาที)	DH (ร้อยละ)	ปริมาณโปรตีนที่ละลาย (ร้อยละ)
DH0-5	0	1.87 ± 0.17^{c}	38.21 ± 1.36^{a}
DH6-10	30	10.88 ± 0.70^{b}	35.12 ± 0.25^{b}
DH11-15	300	12.08 ± 0.51^{a}	31.99 ± 2.24^{c}

หมายเหตุ: ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

^{a,b,c}อักษรกำกับที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\leq0.05$

ภาพที่ 4.4 โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (MRBP-A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (MRBP-F) ที่ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH) ต่างๆ

ส่วนที่ 2 ศึกษาคุณลักษณะและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

4.4 คุณลักษณะของโปรตีน

4.4.1ค่าสีของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง

ผลการตรวจสอบค่าสี L* a* และ b* ของโปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) โปรตีนถั่วเหลือง (SP) และโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP) แสดงดังตารางที่ 4.5 และค่าสี (L* a* และ b*) ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (MRBP-A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (MRBP-F) ที่ระดับการย่อย (degree of hydrolysis: DH) ต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.6

ค่า L* เป็นค่าความสว่างและมืด ค่า a* เป็นค่าความเป็นสีแดง (+a) หรือเขียว (-a) และค่า b* เป็นค่าความเป็นสีเหลือง (+b) หรือน้ำเงิน (-b) ใช้แสดงค่าสีของตัวอย่าง พบว่าค่าสีเริ่มต้นของ RBP มีค่าความสว่าง (L*) 71.17 ค่าสีแดง -เขียว (a*) 1.70 และมีค่าสีเหลือง -น้ำเงิน (b*) 12.60 ส่วนค่าสีเริ่มต้นของ SP มีค่าความสว่าง (L*) 86.25 ค่าสีแดง-เขียว (a*) 0.71 และมีค่าสีเหลือง-น้ำเงิน (b*) 17.83 (ตารางที่ 4.5) เมื่อโปรตีนรำข้าวและโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่างหรือเอนไซม์ พบว่าค่าความสว่าง (L*) มีค่าลดลงแสดงถึงสีเข้มขึ้น แต่ค่าสีแดง-เขียว (a*) และค่าสีเหลือง-น้ำเงิน (b*) มีค่าเพิ่มซึ่งแสดงถึงค่าสีออกเป็นสีแดงและเหลืองเพิ่มขึ้น เนื่องจากระยะเวลาที่ให้ความร้อนหรือการย่อยนานขึ้น ส่งผลการเพิ่มการผลิตเพปไทด์มากขึ้น สามารถเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดร่วมกับน้ำตาลที่มีอยู่ในองค์ประกอบของวัตถุดิบได้ เมื่อเปรียบเทียบค่าสีของ MRBP-A กับ MRBP-F ที่ระดับการย่อยต่างๆ พบว่า MRBP-A มีค่าความสว่าง (L*) และค่าสีเหลือง-น้ำเงิน (b*) น้อยกว่า MRBP-F แสดงถึงความมืดและค่าสีน้ำเงินของตัวอย่างMRBP-A อาจเนื่องมาจากสภาวะที่ใช้ในการย่อยได้แก่ อุณหภูมิ ระยะเวลาการย่อย และพีเอชที่แตกต่างกันทำให้ปริมาณเพปไทด์ที่ได้รับระหว่างการย่อยแตกต่างกันส่งผลให้ค่าสีแตกต่างกัน

เมื่อตรวจสอบค่าความแตกต่างของสี (ΔE* และ ΔH*)ของ RBPMRBP SP MSP และ MRBP-A/Fที่ระดับการย่อยต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4. 8 พบว่าค่าRBPมีค่า ΔE* และ ΔH*เริ่มต้นเป็น 25.41 และ 6.19 ตามลำดับ ส่วน SP มีค่าΔE* เป็น 19.26 และค่า ΔH*เป็น 7.06 (ตารางที่ 4.7) เมื่อโปรตีนรำข้าวและโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่างหรือเอนไซม์ พบว่าค่าΔE* และ ΔH*มีค่าเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นไปตามค่าสี L* a* และ b* ดังที่กล่าวมาแล้ว

ตารางที่4.5 ค่าสี (L* a* และ b*) ของโปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) โปรตีนถั่วเหลือง (SP) และโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP)

ตัวอย่าง	L*	a*	b*
RBP	71.17±0.04^{b}	1.70±0.05^{c}	12.60±0.09^{c}
MRBP	42.37±1.03^{d}	6.72±0.10^{a}	17.44±0.22^{b}
SP	86.25±0.09^{a}	0.71±0.11^{d}	17.83±0.14^{b}
MSP	74.67±0.38^{c}	2.42±0.14^{b}	23.21±0.69^{a}

หมายเหตุ:ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

^{a,b,c}อักษรกำกับที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

ตารางที่4.6 ค่าสี (L* a* และ b*)ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส(MRBP-A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์(MRBP-F) ที่ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH) ต่างๆ

ตัวอย่าง	MRBP-A			MRBP-F		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
DH0-5	45.53±0.16^{a}	5.87±0.17^{c}	15.39±0.19^{a}	48.22±0.04^{a}	5.88±0.06^{b}	16.95±0.08^{a}
DH6-10	36.70±0.10^{b}	6.61±0.30^{b}	14.07±0.26^{b}	46.31±0.04^{b}	6.27±0.06^{ab}	16.40±0.14^{ab}
DH11-15	37.49±0.12^{c}	6.40±0.36^{b}	13.28±0.27^{c}	43.97±0.02^{c}	6.37±0.03^{a}	16.96±0.10^{a}
DH16-20	33.71±0.10^{d}	7.20±0.38^{a}	13.82±0.28^{bc}	-	-	-
DH>20	30.31±0.05^{e}	6.88±0.14^{ab}	11.59±0.57^{d}	-	-	-

หมายเหตุ:ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

^{a,b,c}อักษรกำกับที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

ตารางที่4.7 ค่าความแตกต่างของสี(ΔE* และ ΔH*) ของโปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) โปรตีนถั่วเหลือง (SP) และโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP)

ตัวอย่าง	ΔE*	ΔH*
RBP	25.41±0.04[c]	6.19±0.02[d]
MRBP	54.09±0.99[a]	8.14±0.04[b]
SP	19.26±0.14[d]	7.06±0.03[c]
MSP	29.85±0.78[b]	8.29±0.13[a]

หมายเหตุ:ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a,b,c]อักษรกำกับที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

ตารางที่ 4.8 ค่าความแตกต่างของสี (ΔE* และ ΔH*)ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส(MRBP-A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์(MRBP-F) ที่ระดับการย่อย (degree of hydrolysis: DH) ต่างๆ

ตัวอย่าง	MRBP-A		MRBP-F	
	ΔE*	ΔH*	ΔE*	ΔH*
DH0-5	50.32±0.09[e]	7.43±0.10[a]	50.13±0.01[b]	7.89±0.01[b]
DH6-10	58.47±0.01[c]	7.40±0.21[a]	52.19±0.07[a]	7.88±0.01[b]
DH11-15	57.49±0.03[d]	7.22±0.28[ab]	48.44±0.05[c]	7.99±0.01[a]
DH16-20	61.37±0.07[b]	7.49±0.04[a]	-	-
DH>20	64.17±0.13[a]	7.08±0.05[b]	-	-

หมายเหตุ:ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a,b,c]อักษรกำกับที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

4.4.2 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

4.4.2.1 โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง

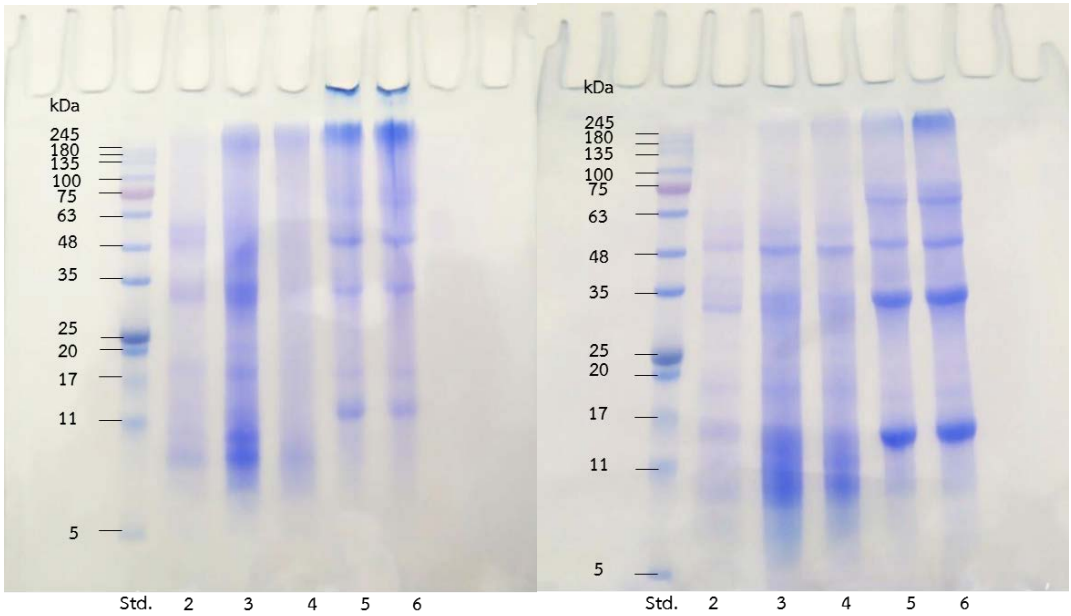
ผลการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากรำข้าวที่สกัดน้ำมัน (DRB) โปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) โปรตีนถั่วเหลือง (SP) และโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง(MSP) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ด้วยเทคนิคโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Sodium Dodecyl SulphatePolyacrylamine Gel Electrophoresis: SDS-PAGE) ภายใต้สภาวะนอนรีดิวซ์ (Non-reducing) และสภาวะรีดิวซ์(Reducing) แสดงดังภาพที่ 4.5

ภายใต้สภาวะ Non-reducing พบว่า DRB RBP MRBP SP และ MSP มีน้ำหนักโมเลกุล คือ 7-70, 7-151, 8-145, 12-165 และ 12-159 กิโลดาลตัน ตามลำดับ โดย DRB จะปรากฏแถบสีโปรตีนหลักอยู่ 2 แถบ คือ 60-68 และ 36-41 กิโลดาลตัน RBP ปรากฏแถบสีโปรตีนหลัก 2 แถบ คือ 34-39 และ 8-10 กิโลดาลตัน ส่วน MRBP SP และ MSP ปรากฏแถบสีโปรตีนหลักแถบเดียว คือ 8 159 และ 159 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (ภาพที่ 4.5 A)

ภายใต้สภาวะ reducing พบว่าDRBRBP MRBP SP และ MSP มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 6-80, 7-72, 8-67, 12-97 และ 12-159กิโลดาลตัน ซึ่งปรากฏแทบโปรตีนหลัก คือ 8-12 , 8-9, 13-39, 14-40และ 14-40 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (ภาพที่ 4.5 B) จากผลการทดลองภายใต้สภาวะ Reducing แสดงให้เห็นว่าการเติมสารเบตาเมอร์แคปโตเอทธานอล จะปรากฏแถบสีโปรตีนที่ชัดขึ้นและปรากฏช่วงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเล็กลง นอกจากนี้ยังชี้ให้เห็นว่าโปรตีนมีการเชื่อมต่อกันด้วยสายโพลีเพปไทด์ที่ประกอบไปด้วยหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งด้วยพันธะไดซัลไฟล์

Phongthai et al. (2017) รายงานว่ากลูเตลิน (Glutelins) เป็นโปรตีนหลักของโปรตีนรำข้าวประมาณร้อยละ 22.7-40.25 มีข้อจำกัดในด้านความสามารถในการละลายน้ำ เนื่องจากโมเลกุลเชื่อมต่อกันและเกิดอันตรกิริยา (Interaction) ระหว่างพันธะไดซัลไฟล์และไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) ทำให้ยากในการสกัดโปรตีน น้ำหนักโมเลกุลของกลูเตลินประกอบด้วย acidic subunit (30-39 กิโลดาลตัน) และ basic subunit (19-25 กิโลดาลตัน)มาจากสายพันธะโพลีเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 57 กิโลดาลตัน ทั้ง 2 subunit ถูกเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ภายในระหว่างโมเลกุลถูกเชื่อมต่อด้วยพันธะไดซัลไฟล์โดยที่น้ำหนักโมเลกุลกลูเตลินอยู่ในช่วง 64 ถึง 500 กิโลดาลตัน (Lasztity, 1996; Cao et al., 2009) Hamada (1997) รายงานว่าน้ำหนักโมเลกุลของกลูเตลินในรำข้าวประมาณ 45 ถึง 150 กิโลดาลตัน ระหว่างที่ Chanput et al. (2009) และ Xia et al. (2012) รายงานว่าน้ำหนักโมเลกุลของกลูเตลินในรำข้าวประมาณ 10 ถึง 60 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ Tang et al. (2003) พบว่าโปรตีนรำข้าวมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 6.5-66.2 กิโลดาลตัน และ Ahmadifard et al. (2016) พบว่าโปรตีนรำข้าวมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 15.08-69.47 กิโลดาลตัน

(A) (B)



ภาพที่4.5 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่แยกด้วยวิธี SDS-PAGE ของรำข้าวที่สกัดน้ำมัน (DRB) โปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) โปรตีนถั่วเหลือง (SP) และโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (Standard: Std.) ภายใต้สภาวะ (ภาพ A) Non-reducing และ (ภาพ B) Reducing

แถบที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน (Standard: Std.)

แถบที่ 2 คือ DRB

แถบที่ 3 คือ RBP

แถบที่ 4 คือ MRBP

แถบที่ 5 คือ SP

แถบที่ 6 คือ MSP

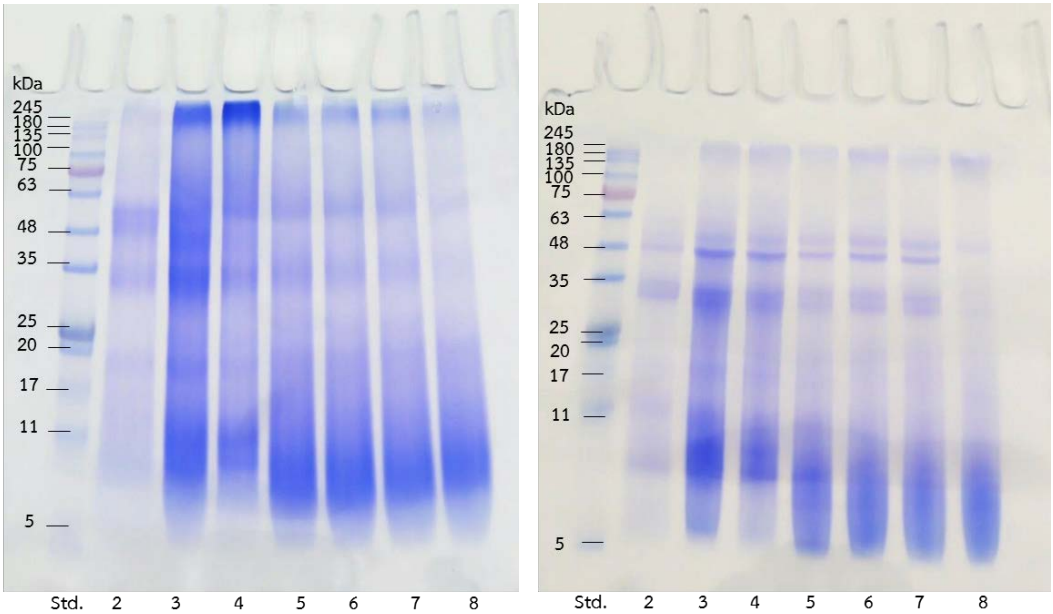
4.4.2.2น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

ผลการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากรำข้าวที่สกัดน้ำมัน (DRB) โปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (MRBP-A) ที่ระดับการย่อย 5 ช่วงระดับ คือ ร้อยละ 0-5, 6-10,11-15,16-20 และ >20 เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานด้วยเทคนิคโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Sodium Dodecyl SulphatePolyacrylamineGel Electrophoresis: SDS-PAGE) ภายใต้สภาวะนอนรีดิวซ์ (Non-reducing) และสภาวะรีดิวซ์(Reducing) แสดงดังภาพที่ 4.6

จากการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนภายใต้สภาวะ Non-reducing พบว่าDRBและRBP จะมีแถบสีโปรตีนอยู่ 6 และ 7 แถบ (7-70และ 7-151 กิโลดาลตัน) ตามลำดับ ส่วนMRBP-A ที่ระดับการย่อยร้อยละ 0-5 มีแถบสีโปรตีน 5 แถบ (9-151 กิโลดาลตัน) และเมื่อระดับการย่อยเพิ่มขึ้นปรากฏแถบสีของโปรตีนจะจางลง แสดงให้เห็นว่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนรำข้าวมีขนาดเล็กลงภายหลังจากถูกย่อยด้วยเอนไซม์ อัลคาเลส โดยจะปรากฏแถบสีโปรตีนหลักที่ระดับการย่อยร้อยละ0-5 คือ 9-12 กิโลดาลตัน และที่ระดับการย่อยร้อยละ 6-10, 11-15,16-20 และ >20คือ 8 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 4.6A)

ภายใต้สภาวะ Reducing พบว่าDRB, RBP และMRBP-A ทุกระดับการย่อย มีแถบสีโปรตีนจางลงที่ช่วงมากกว่า 151 กิโลดาลตัน เมื่อพิจารณาแถบสีโปรตีนหลักของ DRBที่ 57-65 และ 38-41 กิโลดาลตันRBP ที่ 33-38, และ 9-14 กิโลดาลตัน และMRBP-A ระดับการย่อยร้อยละ 0-5 ที่ 32-35 และ 7-9 กิโลดาลตันแต่เมื่อระดับการย่อยเพิ่มขึ้นร้อยละ 6-10, 11-15,16-20 และ >20 พบแถบสีโปรตีนหลักแถบเดียวคือ น้ำหนักโมเลกุลเป็น 7, 6, 5 และ 5 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (ภาพที่ 4.6B) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนรำข้าวจะเชื่อมต่อด้วยสายโพลีเพปไทด์ที่ประกอบไปด้วยหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งด้วยพันธะไดซัลไฟล์

(A) (B)



ภาพที่4.6 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่แยกด้วยวิธี SDS-PAGE ของรำข้าวที่สกัดน้ำมัน(DRB) โปรตีนรำข้าว(RBP) และโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส(MRBP-A) ที่ระดับการย่อยต่างๆ เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (Standard: Std.) ภายใต้สภาวะ (ภาพ A) Non-reducing และ (ภาพ B) Reducing

แถบที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน (Standard: Std.)

แถบที่ 2 คือ DRB

แถบที่ 3 คือ RBP

แถบที่ 4 คือ MRBP-A ที่ระดับการย่อยร้อยละ 0-5

แถบที่ 5 คือ MRBP-A ที่ระดับการย่อยร้อยละ 6-10

แถบที่ 6 คือ MRBP-A ที่ระดับการย่อยร้อยละ 11-15

แถบที่ 7 คือ MRBP-A ที่ระดับการย่อยร้อยละ 16-20

แถบที่ 8 คือ MRBP-A ที่ระดับการย่อยมากกว่าร้อยละ 20

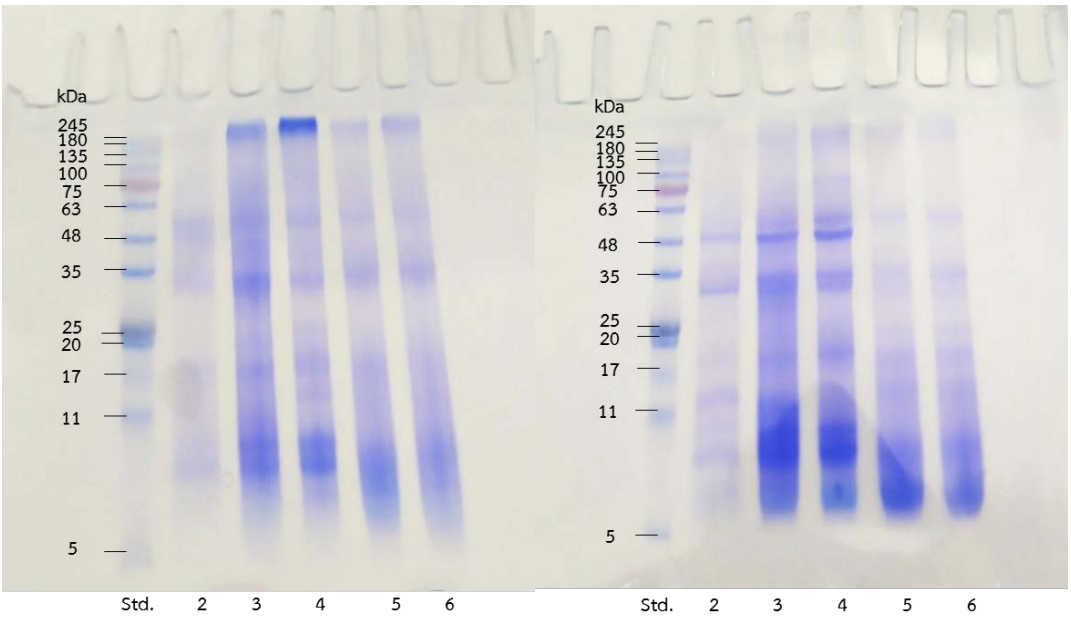
4.4.2.3น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์

ผลการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากรำข้าวที่สกัดน้ำมัน (DRB) โปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (MRBP-F) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานด้วยเทคนิคโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Sodium Dodecyl SulphatePolyacrylamine Gel Electrophoresis: SDS-PAGE) ภายใต้สภาวะนอนรีดิวซ์ (Non-reducing) และสภาวะรีดิวซ์(Reducing) แสดงดังภาพที่ 4.7

จากการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนภายใต้สภาวะ Non-reducing พบว่าDRB และRBP จะปรากฏแถบสีโปรตีนหลัก 2 แถบ โดย DRBมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 60-70 และ 41 กิโลดาลตัน ส่วน RBP มีน้ำหนักโมเลกุล 40-70 และ 8-11 กิโลดาลตัน สำหรับ MRBP-F พบว่าที่ระดับการย่อยร้อยละ 0-5 ปรากฏแถบโปรตีนหลัก 2 แถบ คือ 158 และ 7-10 กิโลดาลตัน และที่ระดับการย่อยร้อยละ 6-10 และ11-15 ปรากฏแถบโปรตีนหลักแถบเดียว คือ 6-7 และ 6 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (ภาพที่ 4.7A)

ภายใต้สภาวะ reducing พบว่าแถบสีหลักของ DRB ที่น้ำหนักโมเลกุล คือ 57-65 และ 38-41 กิโลดาลตัน ส่วนRBP ที่น้ำหนักโมเลกุล คือ 33-38-65 และ 9-14 กิโลดาลตัน ส่วน MRBP-F ที่ระดับการย่อยร้อยละ 0-5 ที่น้ำหนักโมเลกุล คือ 63 และ 8-10 กิโลดาลตัน และเมื่อระดับการย่อยร้อยละ 6-10 และ 11-15 พบแถบสีโปรตีนหลักแถบเดียว คือ 5-8 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 4.7 B) ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Thamnarathip et al. (2016) พบว่าโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยร้อยละ 4, 5 และ 7 ปรากฏแถบสีของโปรตีน 11 แถบ (16-64 กิโลดาลตัน) และพบแถบสีโปรตีนหลักอยู่ในช่วง 16 กิโลดาลตัน แสดงให้เห็นว่าโปรตีนรำข้าวจะเชื่อมต่อด้วยสายโพลีเพปไทด์ที่ประกอบไปด้วยหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งด้วยพันธะไดซัลไฟล์ เช่นเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบแถบสีของโปรตีนรำข้าวระหว่างที่ถูกย่อยด้วย เอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์ ฟลาโวไซม์ พบว่าแถบสีที่ปรากฏภายหลังจากถูกย่อยจะแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง MRBP-A กับ MRBP-Fจะแตกต่างกัน ทั้งนี้ MRBP-A จะใช้ปริมาณเอนไซม์น้อยกว่าและระยะเวลาการย่อยที่สั้นกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์สอดคล้องกับ Zhang et al. (2014) ที่รายงานว่าการใช้เอนไซม์ต่างชนิดกันในการย่อยโปรตีน ทำให้ได้น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแตกต่างกัน เพราะเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนหรือสารตั้งต้นไม่เท่ากัน

(A) (B)



ภาพที่4.7 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่แยกด้วยวิธี SDS-PAGE ของรำข้าวที่สกัดน้ำมัน(DRB) โปรตีนรำข้าว(RBP) และโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์(MRBP-F) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (Standard: Std.) ภายใต้สภาวะ (ภาพ A) Non-reducing และ (ภาพ B) Reducing

แถบที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน (Standard: Std.)

แถบที่ 2 คือ DRB

แถบที่ 3 คือ RBP

แถบที่ 4 คือ MRBP-F ที่ระดับการย่อยร้อยละ 0-5

แถบที่ 5 คือ MRBP-F ที่ระดับการย่อยร้อยละ 6-10

แถบที่ 6 คือ MRBP-F ที่ระดับการย่อยร้อยละ 11-15

4.5สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

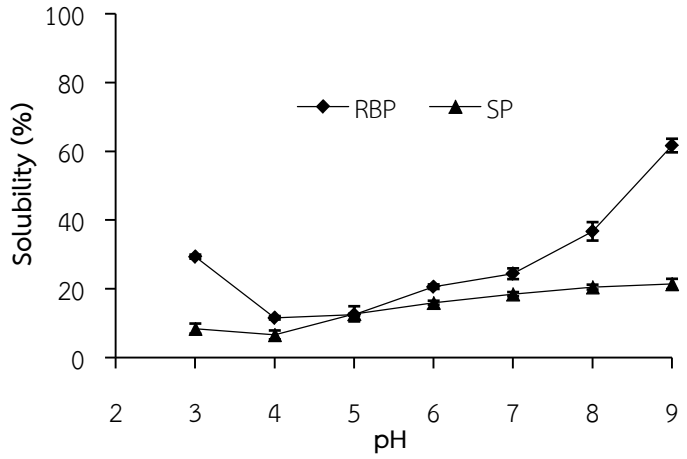
4.5.1 สมบัติการละลายของโปรตีน

4.5.1.1 สมบัติการละลายของโปรตีนรำข้าว

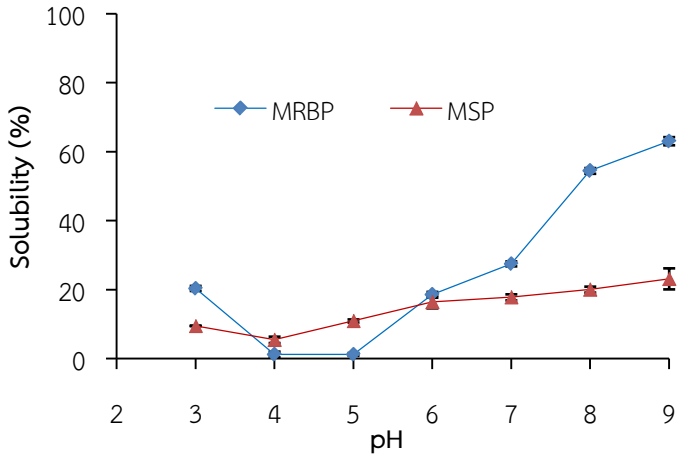
จากการศึกษาสมบัติการละลายของโปรตีนรำข้าว (RBP)และโปรตีนถั่วเหลือง(SP) แสดงดังภาพที่ 4.8 พบว่าสมบัติการละลายของ RBP และ SPสามารถละลายได้ดีทั้งในสภาวะที่เป็นกรดและด่าง คือ ที่พีเอชน้อยกว่า 4 และพีเอชมากกว่า 5 แต่ความสามารถในการละลายของโปรตีนทั้งสองน้อยสุดที่พีเอช 4 อาจเนื่องจาก ที่พีเอช4 ใกล้จุดไอโซอิเล็กทริก(Isoelectric point; pI)ของโปรตีนเหล่านี้ จึงทำให้ความสามารถในการละลาย ของ RBP และ SPมีการละลายน้อย (Tsumura et al.,2005 และ Cao et al.,2009) และที่จุด pIอาจเกิดจากการเพิ่มขึ้นของ ส่วน ที่ไม่มีขั้ว (Hydrophobic) ของโมเลกุลของกรดอะมิโนหรือโปรตีน นำไปสู่การ เกิดปฏิกิริยาของส่วนที่ไม่มีขั้วกับพื้นผิวที่ไม่มีประจุเพิ่มสูงขึ้น หรือกรดอะมิโนหรือโปรตีนมีประจุบวกและปรุจุลบเท่ากัน ทำให้โมเลกุลของโปรตีนที่ค่าพีเอชนี้มีแรงดึงดูดกันเพิ่มขึ้น เนื่องจากแรงอิเล็กโตรสแตติก (Electrostaticforces) และแรงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของน้ำน้อย จึงทำให้โมเลกุลของโปรตีนรวมตัวกันและตกตะกอนในที่สุด (Damodaran, 1997) ในทางกลับกันเมื่อพีเอชมีค่ามากกว่าหรือน้อยกว่า 4 การละลายของโปรตีนจะเพิ่มขึ้น เพราะที่พีเอชเพิ่มขึ้นหรือพีเอชลดลงทำให้สาร ละลายของโปรตีน มีสภาวะเป็นกรดและเป็นด่าง หรือโปรตีนมีประจุเป็นบวกและลบมากขึ้นตามลำดับ เกิดแรงผลักกันระหว่างโมเลกุลของโปรตีนจึงเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการละลายของโปรตีน(Yeom et al., 2010) แต่อย่างไรก็ตาม RBP มีความสามารถในการละลายดีกว่า SP ที่พีเอชน้อยกว่า 4 และพีเอชมากกว่า 5 เนื่องจากมีโครงสร้างที่แตกต่างกันของโปรตีนจึงมีความสามารถในการ ละลาย ต่างกัน และความสามารถในการละลายเป็นหนึ่งในลักษณะที่สำคัญของโปรตีนเนื่องจากมีผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่อื่นๆ (Lawalet al., 2007)

4.5.1.2 สมบัติการละลายของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง

ผลการศึกษาการละลายของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง(MRBP)เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP) ดังภาพที่ 4.9 พบว่า MRBP มีค่าการละลายอยู่ในช่วงร้อยละ 18-63 ที่พีเอชกรดและด่าง ค่าการละลายของ MRBP จะแปรผันไปตามค่าพีเอชของการละลาย โดย MRBP มีค่าการละลายต่ำสุดที่พีเอชเท่ากับ 4 และ 5 ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่ใกล้กับจุดไอโซอิเล็คตริก (Isoelectric point; pI)ของโปรตีน (Tsumura et al.,2005) และพบว่าการละลายของ MRBP เพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชของสารละลายน้อยกว่าหรือมากกว่าจุดไอโซอิเล็คตริก และมีค่าการละลายสูงสุดที่พีเอช 9 ซึ่งมีค่าการละลายเท่ากับร้อยละ 63 เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่าง MRBP กับ MSP พบว่า MRBP มีค่าการละลายดีกว่า MSP ทั้งพีเอชที่เป็นกรดและด่าง ยกเว้นที่พีเอช 5 มีค่าการละลายต่ำกว่า MSP อาจเนื่องจากกรดอะมิโนที่แตกต่างกันส่งผลให้สมบัติการละลายที่ได้แตกต่างกัน



ภาพที่4.8 ความสามารถในการละลายของโปรตีนรำข้าว (RBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลือง (SP) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับพีเอช3-9



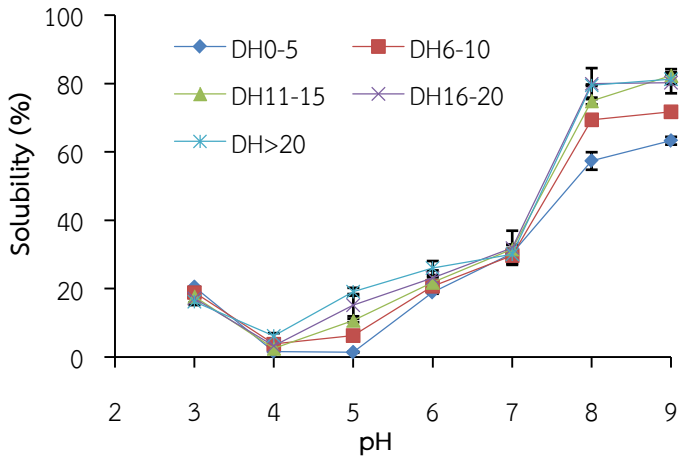
ภาพที่4.9 ความสามารถในการละลายของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับพีเอช 3-9

4.5.1.3 สมบัติการละลายของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์

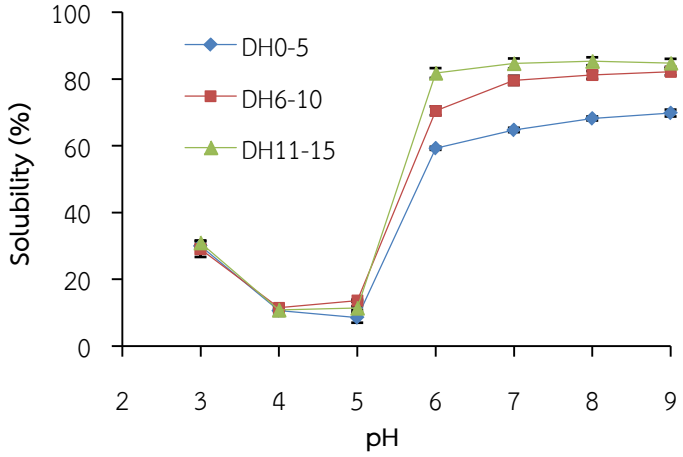
ผลการศึกษาด้านสมบัติการละลายของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส(MRBP-A)ที่ระดับการย่อย(Degree of hydrolysis: DH) ร้อยละ 0-5, 6-10, 11-15,16-20 และ >20และโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์(MRBP-F)ที่ระดับการย่อยร้อยละ 0-5, 6-

10 และ 11-15พบว่าค่าการละลายของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะผันแปรไปตามค่าพีเอชของการละลาย โดยมีค่าการละลายต่ำสุดเมื่อพีเอชของสารละลายเท่ากับ 4 ถึง 5 ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่ใกล้จุดไอโซอิเล็คตริก(Isoelectric point; pI)ของโปรตีนรำข้าว แต่เมื่อพีเอชของสารละลายมีค่าพีเอชห่างจากจุดไอโซอิเล็คตริก (น้อยกว่า 4 หรือมากกว่า 5) โปรตีนมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น และมีค่าการละลายสูงสุดที่พีเอช 8 และ 9 สำหรับ MRBP-A(ภาพที่ 4.10A) หรือที่พีเอช 7-9 สำหรับ MRBP-F (ภาพที่ 4.10B) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลของระดับการย่อยต่อค่าการละลายของโปรตีน พบว่า MRBP-A และ MRBP-F มีค่าการละลายเพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยสูงขึ้น อาจเนื่องมาจากโปรตีนที่ผ่านการย่อย ทำให้โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลเล็กลง อีกทั้งยังส่งเสริมให้โครงสร้างของเพปไทด์มีความเป็นขั้วเพิ่มมากขึ้นทำให้เพปไทด์สามารถจับกับน้ำได้มากขึ้น ดังนั้นระดับการย่อยของโปรตีนมีผลต่อค่าการละลายของโปรตีน สอดคล้องกับการศึกษาของ Phongthai et al. (2016) ที่ศึกษาผลการละลายของโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่าค่าการละลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยของโปรตีนเพิ่มขึ้นโดยมีค่าการละลายเท่ากับร้อยละ 89 , 90 และ 91 ที่ระดับการย่อยร้อยละ 5.04 ,10.37 และ 15.04 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าการละลายกับโปรตีนจากพืช เช่นการทดลองของ ลีนา หง้าฝา (2556) พบว่าโปรตีนถั่วหรั่งที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีค่าการละลายอยู่ในช่วงร้อยละ 87.10-99.75 ที่ระดับการย่อยร้อยละ 10-30 และโปรตีนถั่วหรั่งที่ย่อยด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีค่าการละลายอยู่ในช่วงร้อยละ 81.31-95.75 ที่ระดับการย่อยร้อยละ 5-15 ซึ่งมีค่าการละลายเพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยของโปรตีนเพิ่มขึ้นเช่นกันโดยทั่วไปแล้วการย่อยโปรตีนรำข้าวด้วยเอนไซม์ทำให้โมเลกุลของเพปไทด์มีสายสั้นหรือมีขนาดโมเลกุลเล็กลง ส่งผลให้โปรตีนมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น เพราะโปรตีนสามารถกระจายตัวอยู่ในน้ำได้ดีเมื่อมีโมเลกุลเล็ก (Zhang et al., 2012) อีกทั้งโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เกิดการคลายตัวเอากรดอะมิโนที่ชอบน้ำออกมาได้มาก ทำให้พื้นที่ผิวของโมเลกุลโปรตีนแสดงความมีขั้วได้มาก (Tavano, 2013) และเมื่อเปรียบเทียบผลการละลายกับ RBP พบว่าโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีค่าการละลายเพิ่มขึ้น

(A)



(B)



ภาพที่4.10ความสามารถในการละลายของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (ภาพ A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์(ภาพ B) ที่พีเอช 3-9

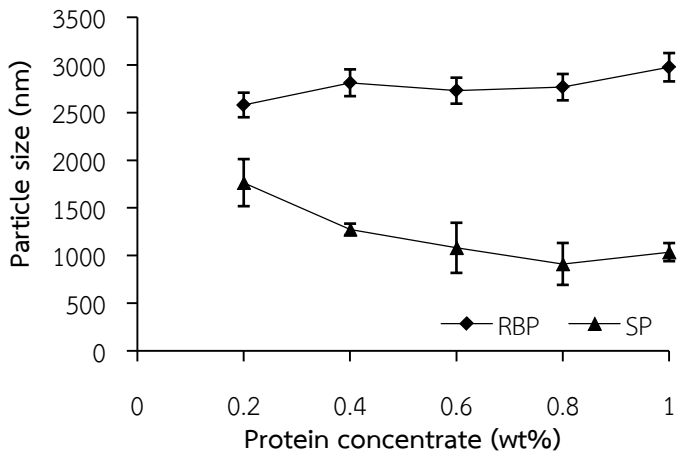
4.5.2สมบัติการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์

4.5.2.1 สมบัติการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนรำข้าว และโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง

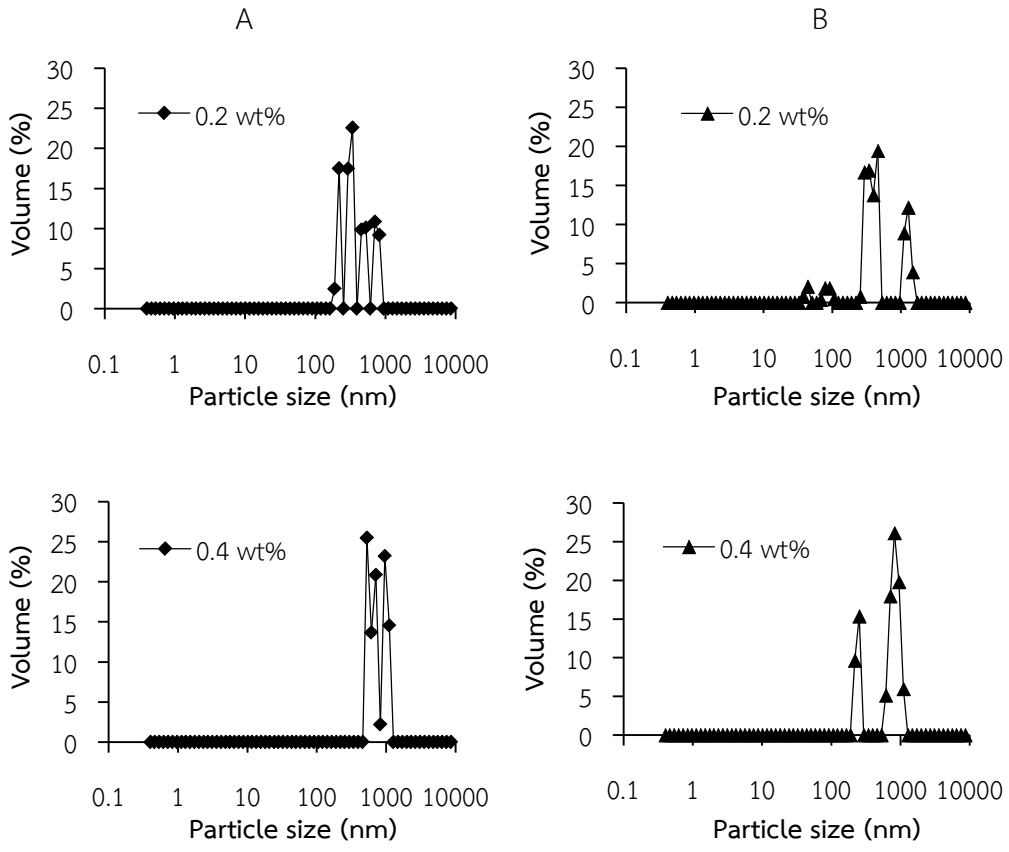
ตรวจสอบสมบัติการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์เปรียบเทียบระหว่างโปรตีนรำข้าว (RBP)กับโปรตีนถั่วเหลือง(SP)และเปรียบเทียบระหว่างโปรตีนรำข้าว (MRBP) และโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP)ทำการตรวจสอบความคงตัวของอิมัลชันโดยวัดขนาดอนุภาคของเม็ดไขมัน (Particle size) การกระจายตัวของอนุภาคเม็ดไขมัน (Particle distribution) ความต่างศักย์ไฟฟ้า (Zeta-potential) ดัชนีการเกิดครีม (Creaming index)และโครงสร้างทางจุลภาคของอนุภาคเม็ดไขมัน (Photomicrographs) ที่ความเข้มข้นของโปรตีนร้อยละ 0.2-1.0โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (Oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง

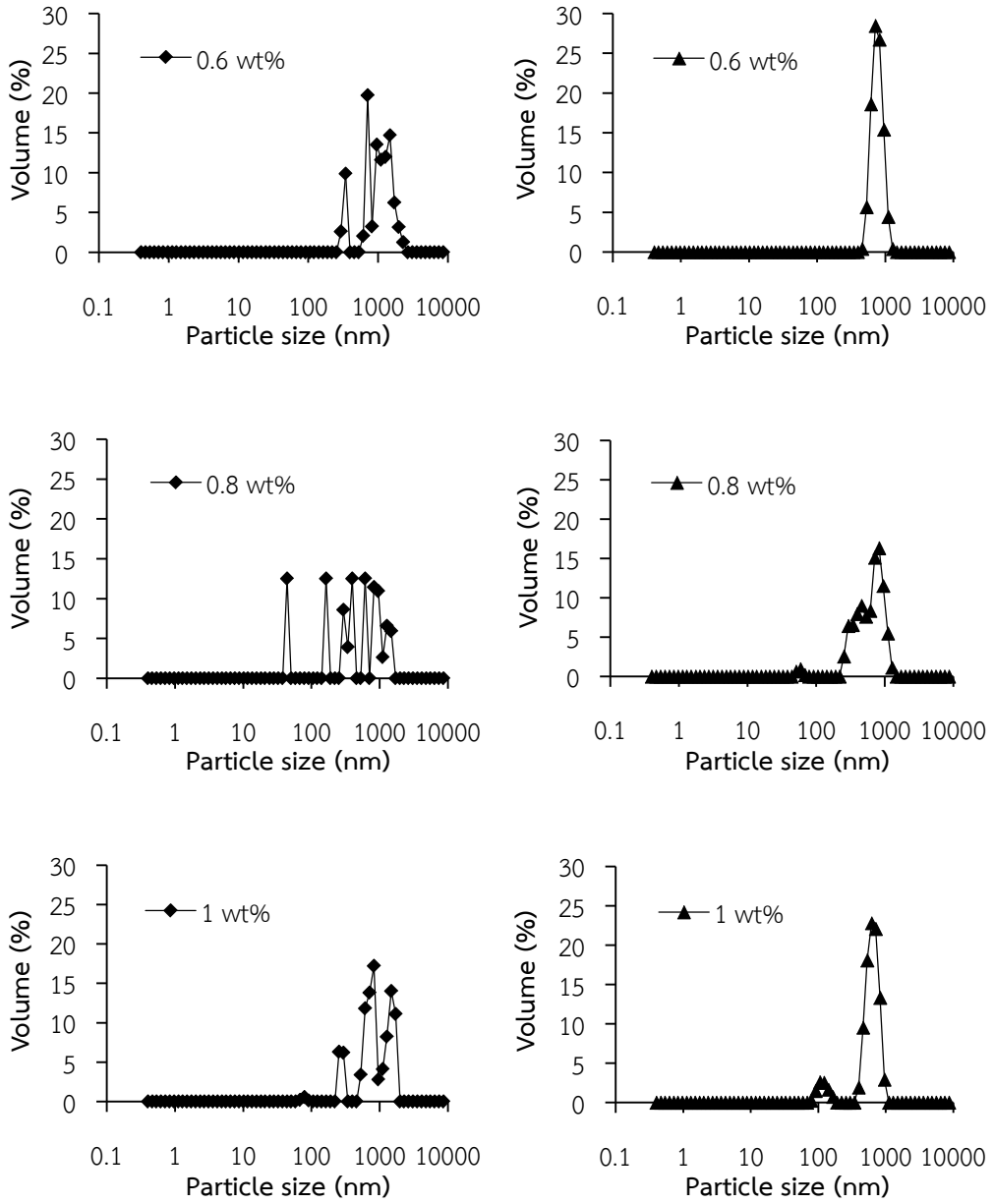
1) การกระจายตัวและขนาดอนุภาคเม็ดไขมัน

ส่วนการกระจายของอนุภาคเม็ดไขมันของ อิมัลชันที่มีส่วนผสมของ RBPไม่สม่ำเสมอมีรูปร่างแบบ multimodal และขนาดอนุภาคเม็ดไขมันเฉลี่ยค่อนข้างใหญ่(ภาพที่ 4.11 และ 4.12 A) ส่วนอิมัลชันที่มีส่วนผสมของ SP มีการกระจายตัวของอนุภาคเม็ดไขมันมีรูปร่างแบบ bimodleและ multimodal(ภาพที่ 4.12 B)ขนาดอนุภาค น้อยกว่า 2,000 นาโนเมตรทุกความเข้มข้นของโปรตีน(ภาพที่ 4.1 1) แสดงให้เห็นว่า สมบัติการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีน ถั่วเหลืองดีกว่าโปรตีนรำข้าว อาจเนื่องจากSP มีปริมาณกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วหรือมีประจุลบในโมเลกุลของโปรตีนมากว่าRBP ทำให้สามารถจับกับเม็ดไขมันและเกิดแรงผลักระหว่างโมเลกุลที่ดี ส่งผลให้ขนาดอนุภาคของเม็ดไขมันมีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับอิมัลชันที่มีส่วนผสมของ RBP เพราะโดยทั่วไปแล้วการเกิดอิมัลชันเป็นผลมาจากการดูดซับโมเลกุลโปรตีนไว้บนผิวของเม็ดไขมัน กรดอะมิโนชนิดไม่มีขั้วจะทำให้โปรตีนสามารถเกาะตัวอยู่บนผิวของเม็ดไขมัน โดยจะแทรกตัวเข้าไปอยู่บนผิวของเม็ดไขมันและหันส่วนที่มีขั้วออกมาสัมผัสกับน้ำ (วราทิพย์ วงเอี่ยม, 2552)



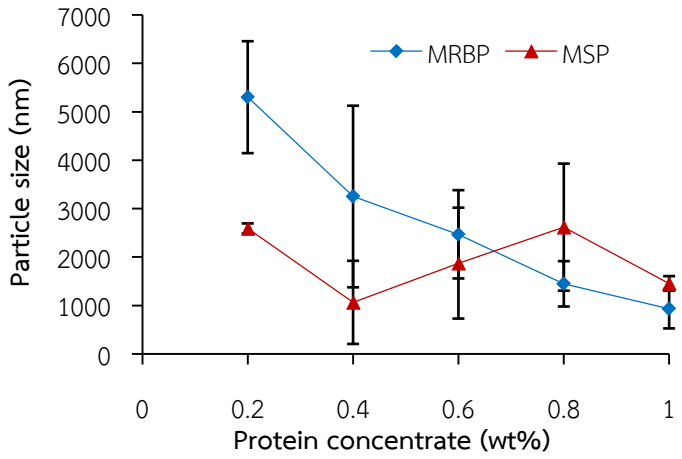
ภาพที่ 4.11 ขนาดอนุภาคของเม็ดไขมันของโปรตีนรำข้าว (RBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลือง (SP) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water)มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10พีเอช 6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง



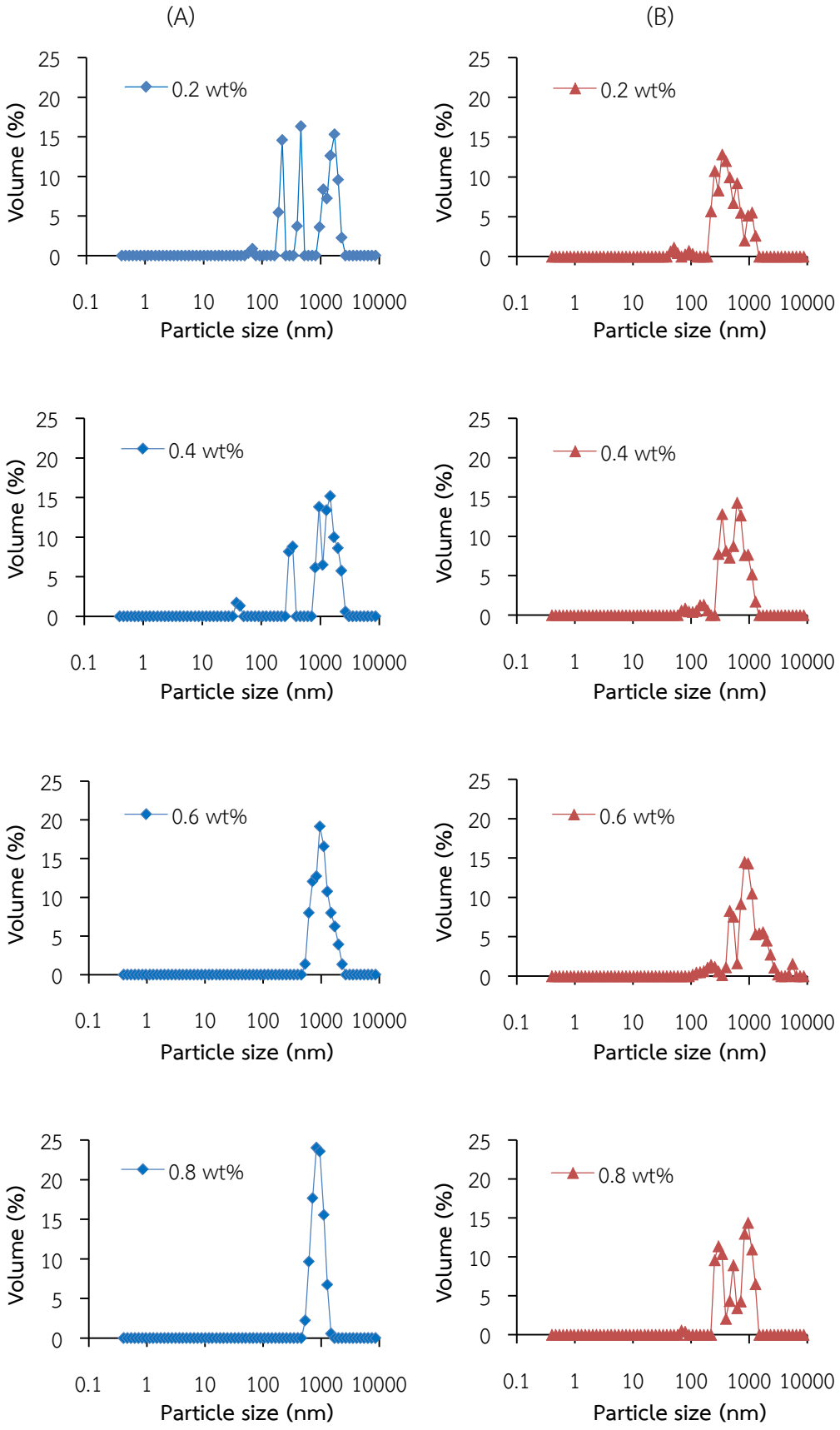


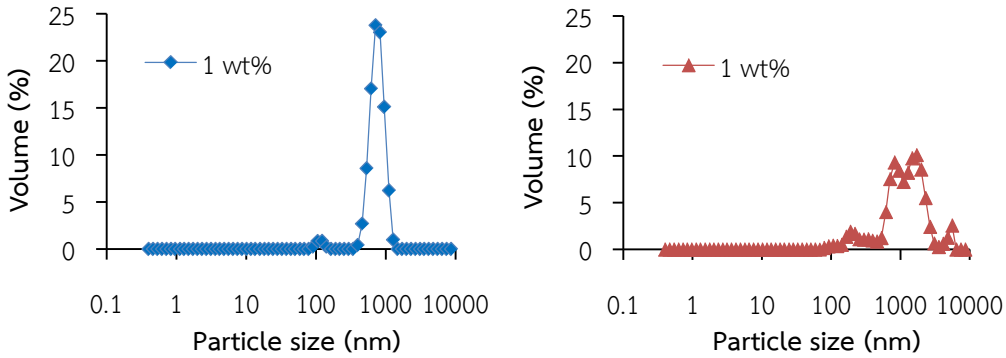
ภาพที่4.12 การกระจายตัวของอนุภาคเม็ดไขมันของโปรตีนรำข้าว (◆ภาพ A) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลือง (▲ภาพ B) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง

เปรียบเทียบระหว่างขนาดอนุภาคของเม็ดไขมันของ MRBP และ MSPที่ความเข้มข้นโปรตีนร้อยละ 0.2-0.6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าเมื่อความเข้มข้นโปรตีน MRBP และ MSP สูงขึ้นขนาดอนุภาคเม็ดไขมันเล็กลง (ภาพที่ 4.13) ส่วนการกระจายตัวของอนุภาคเม็ดไขมันของโปรตีนในภาพที่ 4.14 พบว่าอิมัลชันที่มีส่วนผสมของ MRBP มีการกระจายตัวของอนุภาคเม็ดไขมันไม่สม่ำเสมอมี รูปร่างแบบ multimodalที่ความเข้มข้นโปรตีนร้อยละ 0.2-0.4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และการกระจายตัวของอนุภาคเม็ดไขมันสม่ำเสมอทั้งแบบ mono-di-modal เมื่อความเข้มข้นโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 0.6-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยมีขนาดอนุภาคของเม็ดไขมันเฉลี่ยน้อยกว่า 2,000นาโนเมตร (ภาพที่ 4.14A) ส่วนอิมัลชันที่มีส่วนผสมของ MSP พบว่าการกระจายไม่สม่ำเสมอและมีรูปร่างแบบ multi-modal และมีขนาดอนุภาคเม็ดไขมันใหญ่ ทุกความเข้มข้นโปรตีน (ภาพที่ 4.14B)



ภาพที่4.13 ขนาดอนุภาคของเม็ดไขมันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง

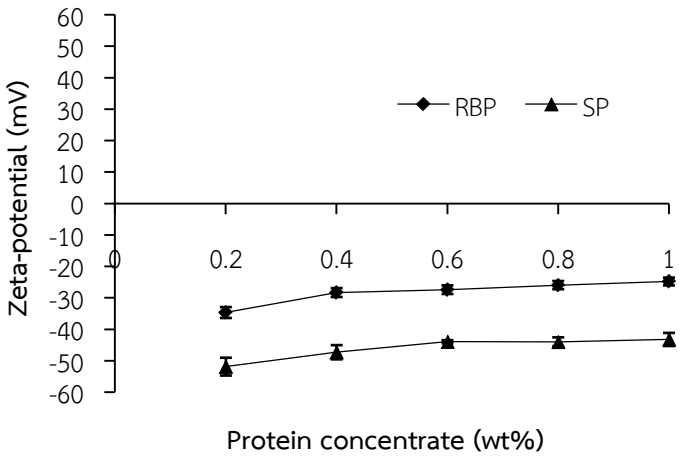

(A)
(B)
0.2 wt%
0.4 wt%
0.6 wt%
0.8 wt%
Volume (%)
Particle size (nm)
0
5
10
15
20
25
0.1
1
10
100
1000
10000



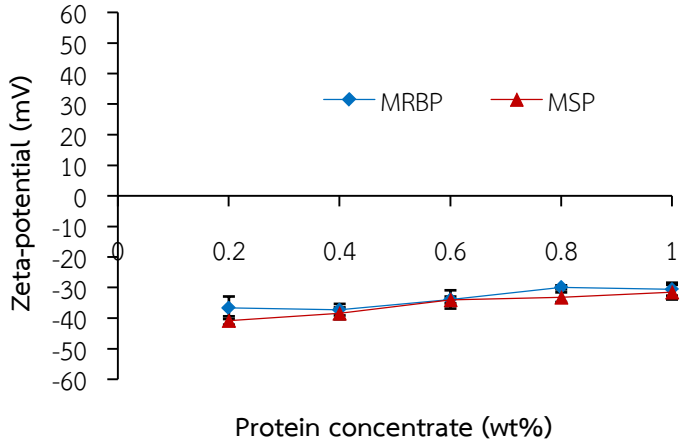
ภาพที่4.14การกระจายตัวของอนุภาคเม็ดไขมันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP)(ภาพ A)เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP)(ภาพ B) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง

2) ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าของอิมัลชัน

ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าของอนุภาคเม็ดไขมันระหว่างอิมัลชันที่มีส่วนผสมของ RBP กับ SPและ MRBP กับ MSP แสดงดังภาพที่ 4.15-4.16 พบว่าค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าของอนุภาคเม็ดไขมันอิมัลชันที่มีส่วนผสมของRBPSP MRBP และ MSP มีค่าเท่ากับต่ำกว่า -30 มิลลิโวลต์ ทุกความเข้มข้นของโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง RBP กับ SP และ MRBP กับ MSP พบว่าค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าของอนุภาคเม็ดไขมัน ของSP และ MSP จะมีค่าต่ำกว่า RBP และ MRBP ทั้งนี้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าของอนุภาคเม็ดไขมัน ใช้บ่งบอกแนวโน้มว่าอนุภาคจะเกาะตัวกันเป็นก้อนหรือไม่ โดยอนุภาคแขวนลอยจะเสถียรเมื่อศักย์ซีตามีค่ามากกว่า +30 หรือน้อยกว่า -30 มิลลิโวลต์ (Onsaardet al., 2006)



ภาพที่4.15ความต่างศักย์ไฟฟ้าของโปรตีนรำข้าว (RBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลือง (SP) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง



ภาพที่4.16ความต่างศักย์ไฟฟ้าของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10พีเอช 6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง

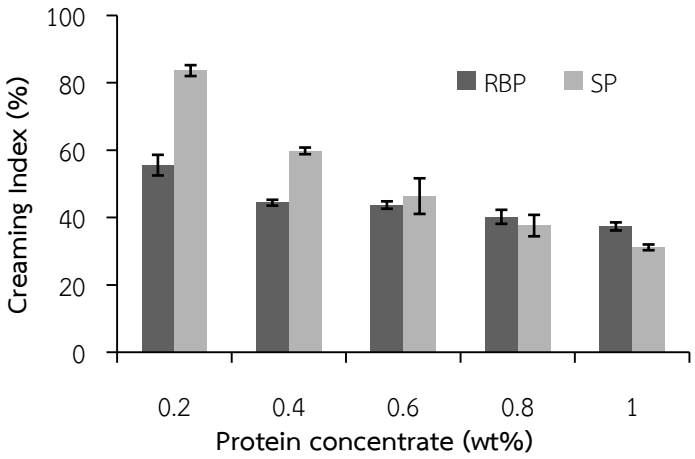
3) ดัชนีการเกิดครีม

ผลการตรวจสอบดัชนีการเกิดครีมของอิมัลชัน พบว่าอิมัลชันที่มีส่วนผสมของ RBP มีดัชนีการเกิดครีมน้อยกว่าอิมัลชันที่มีส่วนผสมของ SP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2-0.4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเมื่อความเข้มข้นโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 0.6-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ดัชนีการเกิดครีมไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 4.17) แต่อย่างไรก็ตามอิมัลชันจากโปรตีนทั้ง 2 ชนิด ไม่สามารถคงตัวของครีมได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า RBP และ SPไม่มีความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ เพราะอิมัลชันไม่คงตัวและเกิดการรวมตัวกันของเม็ดไขมัน ซึ่งการรวมตัวกันของเม็ดไขมันอาจเกิดจากหมู่ฟังก์ชันของโมเลกุลโปรตีนเหล่านี้ที่มีประจุน้อย ทำให้เกิดแรงผลักระหว่างโมเลกุลของโปรตีนน้อย จึงไม่สามารถป้องกันความคงตัวของครีมได้

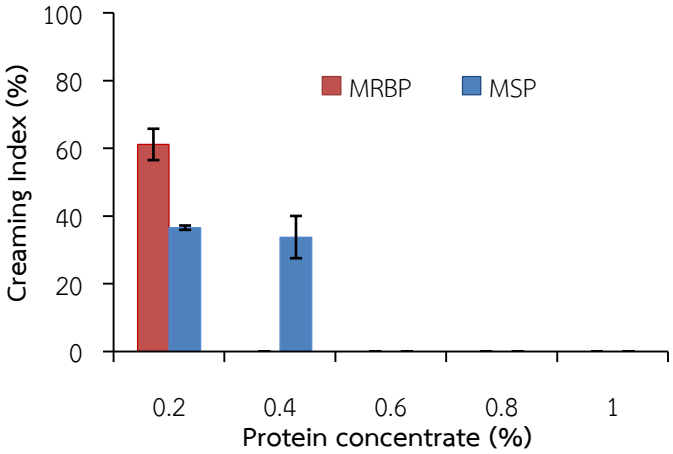
ส่วนอิมัลชันที่มีส่วนผสมของ MRBP เกิดการรวมตัวกันของอนุภาคไขมันและเกิดการแยกชั้นครีมที่ความเข้มข้นของโปรตีนเป็นร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แต่เมื่อความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.2 เป็น 0.4-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรทำให้ครีมเกิดความคงตัว ส่วนอิมัลชันที่มีส่วนผสมของ MSP เกิดการรวมตัวของอนุภาคเม็ดไขมันและเกิดชั้นครีมที่ความเข้มข้นของโปรตีนร้อยละ 0.2-0.4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 0.6-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระบบอิมัลชันและครีมมีความคงตัว (ภาพที่ 4.18)แสดงให้เห็นว่าความสามารถของทั้ง MRBP ที่ความเข้มข้นโปรตีนร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ MSP ที่ความเข้มข้นโปรตีนร้อยละ 0.6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพียงพอต่อการห่อหุ้มเม็ดไขมัน ส่งผลให้มีความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์มากกว่าโปรตีนที่ยังไม่ดัดแปลง (RBP และ SP) ชี้ให้เห็นว่าการใช้ความร้อนและสารเคมีสามารถช่วยปรับปรุงสมบัติการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีน โดยวิธีการใช้ความร้อนส่งผลให้โปรตีนเกิดการคลายตัว และเพิ่มพื้นที่ผิวส่วนที่ไม่ชอบน้ำ จึงทำให้อิมัลชันมีความคงตัว (Kim et al., 2005; Onsaard et al., 2006; Molina et al., 2011 และ Chen et al., 2014)

4) โครงสร้างทางจุลภาคของอนุภาคเม็ดไขมัน

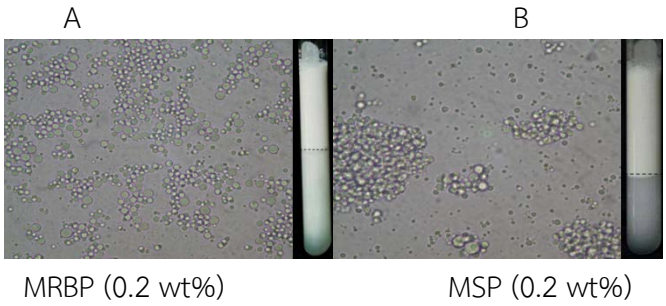
ผลการศึกษาโครงสร้างทางจุลภาคของอนุภาคเม็ดไขมันของอิมัลชันที่มีส่วนผสมของ MRBP (ภาพที่ 4.19 A) พบว่าโครงสร้างทางจุลภาคของอนุภาคเม็ดไขมันจากระบบอิมัลชันที่มีส่วนผสมของ MRBP ที่ความเข้มข้นโปรตีนร้อยละ 0.4-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีการกระจายตัวของอนุภาคเม็ดไขมันที่แขวนลอยได้ดี ทำให้ระบบอิมัลชันมีความคงตัวและไม่เกิดการแยกชั้นครีม ส่วนโครงสร้างทางจุลภาคของอิมัลชันที่มีส่วนผสมของ MSP (ภาพที่ 4.19 B) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.6-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีการกระจายตัวของอนุภาคขนาดเล็กที่แขวนลอยอยู่ในระบบ ทำให้ระบบอิมัลชันมีความคงตัวและไม่แยกชั้นครีมเช่นเดียวกัน แต่ยังคงมีเม็ดไขมันบางส่วนเกิดการเกาะกลุ่มกันและเกิดการรวมตัวกัน ส่งผลให้เม็ดไขมันบางส่วนมีขนาดใหญ่

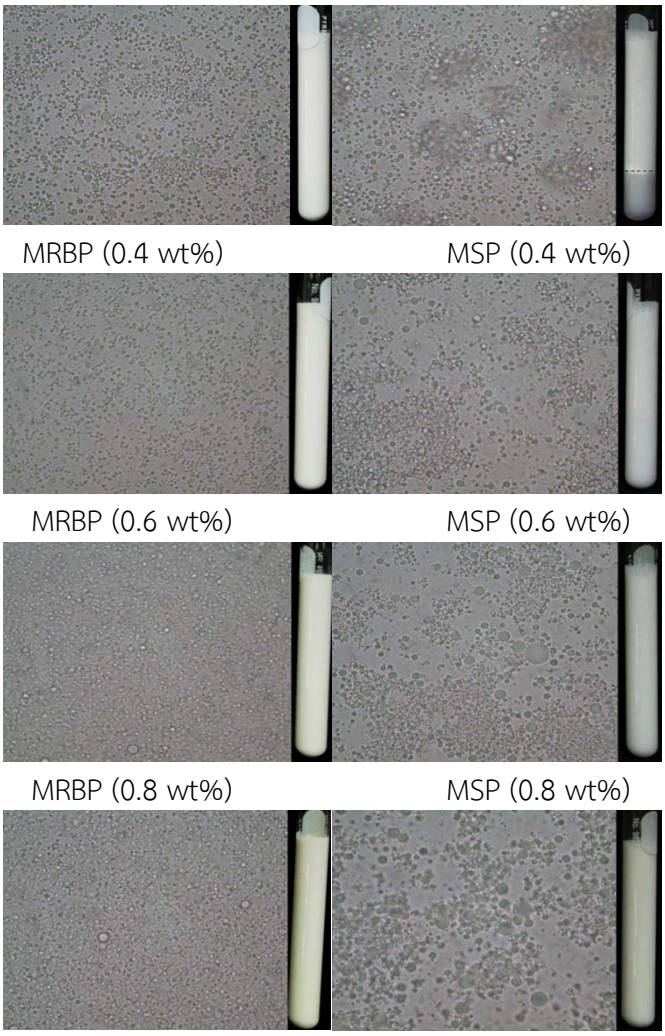


ภาพที่4.17ดัชนีการเกิดครีมของโปรตีนรำข้าว (RBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลือง (SP) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water)มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง



ภาพที่4.18ดัชนีการเกิดครีมของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10พีเอช 6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง





ภาพที่4.19 โครงสร้างทางจุลภาคของอนุภาคเม็ดไขมันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความ ร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) (ภาพ A) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลือง ดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP)(ภาพ B) ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.2-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in- water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10 พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บ นาน 24 ชั่วโมงด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังการขยาย 100 เท่า)

4.5.2.1 สมบัติการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์

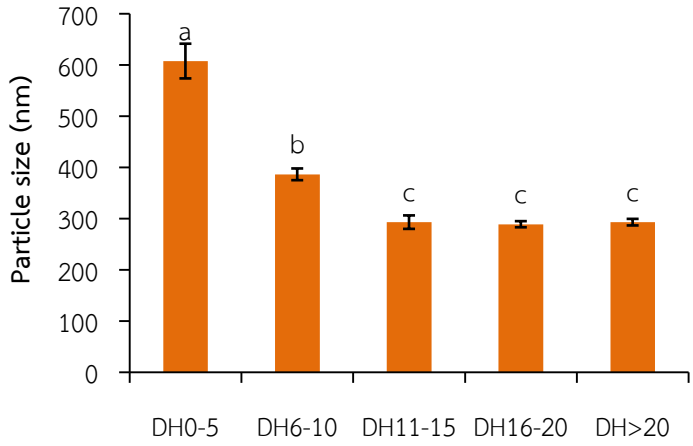
สมบัติการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (MRBP-A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (MRBP-F) ที่ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH) ต่างๆ ทำการตรวจสอบความคงตัวของอิมัลชันโดยวัดขนาดอนุภาคของเม็ดไขมัน (Particle size) การกระจายตัวของอนุภาคเม็ดไขมัน (Particle distribution) ความต่างศักย์ไฟฟ้า (Zeta-potential) ดัชนีการเกิดครีม (Creaming index) และโครงสร้างทางจุลภาคของอนุภาคเม็ดไขมัน

(Photomicrographs) ที่ความเข้มข้นของโปรตีนร้อยละ 0.4โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง

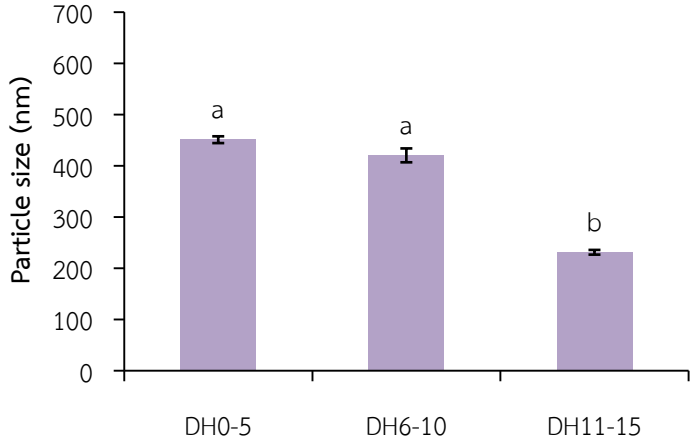
1) ขนาดอนุภาคเม็ดไขมันและการกระจายตัว

ตรวจสอบขนาดอนุภาคของเม็ดไขมันของอิมัลชันที่มีส่วนผสมของ โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (MRBP-A) และ เอนไซม์ฟลาโวไซม์ (MRBP-F)ที่ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH) ต่างๆ แสดงดังภาพที่ 4.2 0A-Bพบว่าขนาดอนุภาคของเม็ดไขมันของอิมัลชันที่มีส่วนผสมของ MRBP-Aลดลงที่ระดับการย่อยร้อยละ 0-5 ถึง 6-10 และขนาดอนุภาคของเม็ดไขมันคงที่ที่ระดับการย่อยร้อยละ 11-15 , 16-20 และมากกว่า 20 (~400 นาโนเมตร)ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ภาพที่ 4.20A) ส่วนขนาดอนุภาคของเม็ดไขมันของ MRBP-F ที่ระดับการย่อยร้อยละ 0-5 และ 6-10มีขนาดใหญ่ (ประมาณ 450 นาโนเมตร) และมีขนาดอนุภาคเล็ดสุดที่ระดับการย่อยร้อยละ 11-15 (~200 นาโนเมตร) (ภาพที่ 4.20 B) เมื่อพิจารณาการกระจายตัวของอนุภาคเม็ดไขมันของโปรตีนMRBP-A ที่ทุกระดับการย่อย พบว่าการกระจายตัวของอนุภาคเม็ดไขมันของทั้งสองตัวอย่างไม่สม่ำเสมอมีรูปร่างแบบ multimodal ยกเว้นที่ระดับการย่อยมากกว่าร้อยละ 20 ที่มีความสม่ำเสมอแบบ mono-modal (ประมาณ68.1-531 นาโนเมตร) (ภาพ 4.21 A) ส่วนการกระจายตัวของอนุภาคเม็ดไขมันของโปรตีนMRBP-F พบว่าที่ระดับการย่อยร้อยละ 6-10 และ 11-15 จะมีการกระจายตัวของอนุภาคเม็ดไขมัน แบบ di-modal (ประมาณ 500-600นาโนเมตร) (ภาพ 4.21 B)

(A)



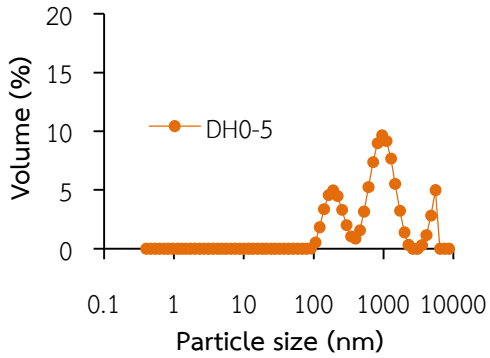
(B)

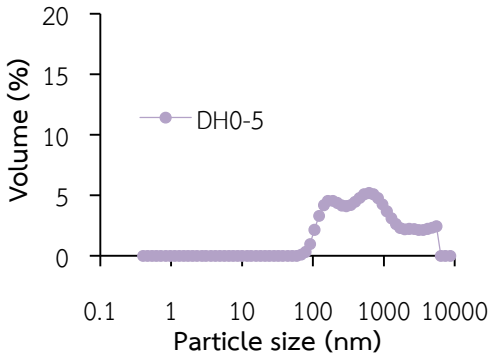


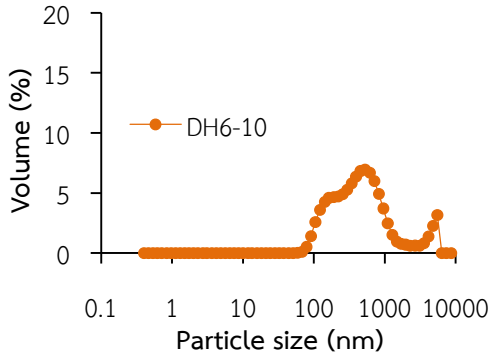
หมายเหตุ: [a,b]อักษรกำกับที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

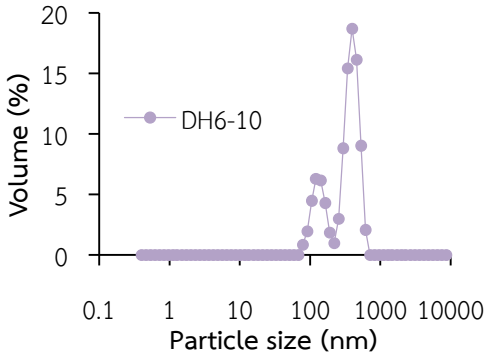
ภาพที่ 4.20ขนาดอนุภาคของเม็ดไขมันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (ภาพ A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์(ภาพ B) ที่ระดับการย่อย (DH) ต่างๆ ความ เข้มข้นร้อญละ 0.4โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in- water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10 พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บ นาน 24 ชั่วโมง

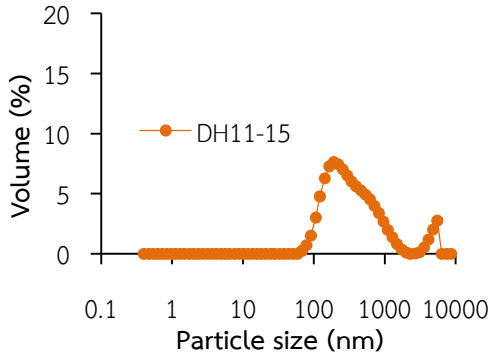
(A) (B)

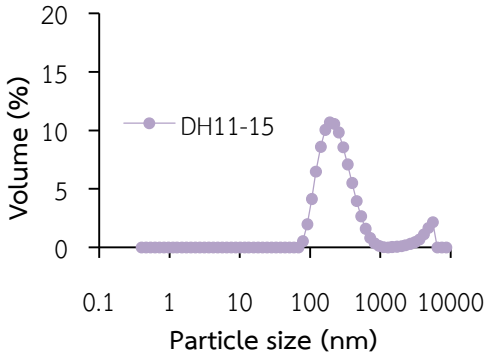

20
15
10
5
0
Volume (%)
DH0-5
0.1
1
10
100
1000
10000
Particle size (nm)

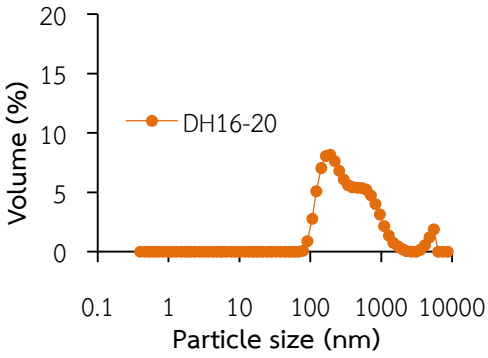

20
15
10
5
0
Volume (%)
DH0-5
0.1
1
10
100
1000
10000
Particle size (nm)

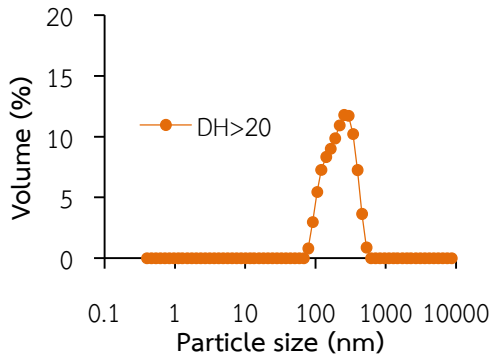

20
15
10
5
0
Volume (%)
DH6-10
0.1
1
10
100
1000
10000
Particle size (nm)


20
15
10
5
0
Volume (%)
DH6-10
0.1
1
10
100
1000
10000
Particle size (nm)


20
15
10
5
0
Volume (%)
DH11-15
0.1
1
10
100
1000
10000
Particle size (nm)


20
15
10
5
0
Volume (%)
DH11-15
0.1
1
10
100
1000
10000
Particle size (nm)


20
15
10
5
0
Volume (%)
DH16-20
0.1
1
10
100
1000
10000
Particle size (nm)

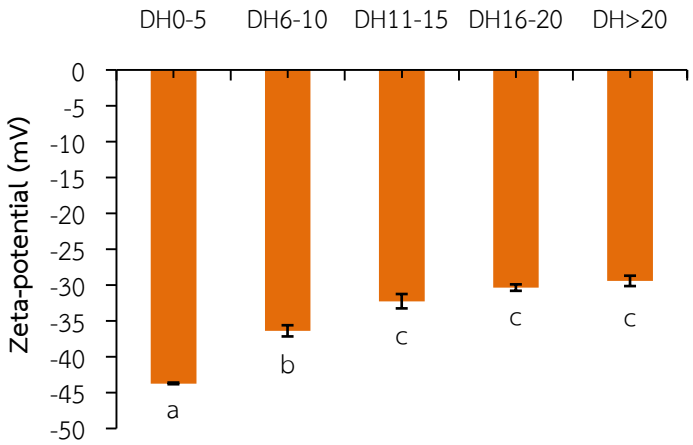


ภาพที่ 4.21 การกระจายตัวของอนุภาคเม็ดไขมันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ อัลคาเลส(ภาพ A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์(ภาพ B) ที่ระดับการย่อย (DH) ต่างๆ ความเข้มข้นร้อยละ 0.4โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10 พีเอช6.5 ทำการวัด หลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง

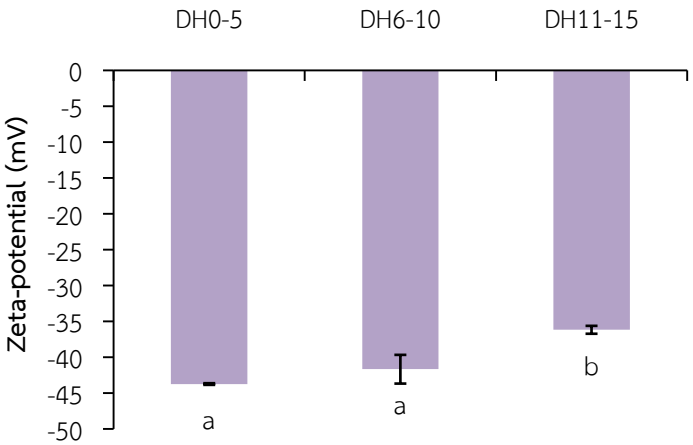
2) ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าของอนุภาคเม็ดไขมัน

ความต่างศักย์ไฟฟ้าของอนุภาคเม็ดไขมันจากอิมัลชันที่มีส่วนผสมของ MRBP-Aและ MRBP-F(ภาพที่ 4.2 2A-B) พบว่าค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าของอนุภาคเม็ดไขมันของอิมัลชันของ MRBP-A และ MRBP-F เพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยเพิ่มขึ้นคือ MRBP-A เพิ่มจาก -44 เป็น -29 มิลลิโวลต์ และ MRBP-F เพิ่มจาก -44 เป็น-36 มิลลิโวลต์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการที่ระดับการย่อยเพิ่มขึ้นจะทำให้ค่าการละลายเพิ่มขึ้นเนื่องจาก น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมีขนาดเล็กและ สายโพลีเพปไทด์สั้นจึงไม่สามารถห่อหุ้มเม็ดไขมันได้ ส่งผลให้ความหนาแน่นของประจุ (Charge density) ที่ล้อมรอบอนุภาคเม็ดไขมันลดลง เมื่อเปรียบ ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าของ อิมัลชันของ MRBP-F จะมีค่าแตกต่างกับ MRBP-A เนื่องจากระดับการย่อยที่น้อยกว่า จะมีชนิดและจำนวน Ionizableของกรดอะมิโนของโปรตีนที่ผ่านการย่อยที่แตกต่างกันของเอนไซม์ ทำให้มีผลต่อความแตกต่างของ ความหนาแน่นของประจุที่ล้อมรอบอนุภาคเม็ดไขมันที่แตกต่างกัน

(A)



(B)



หมายเหตุ: [a,b]อักษรกำกับที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

ภาพที่ 4.22ความต่างศักย์ไฟฟ้าของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส(ภาพ A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์(ภาพ B) ที่ระดับการย่อย (DH) ต่างๆ ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10 พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง

3) ดัชนีการเกิดครีม

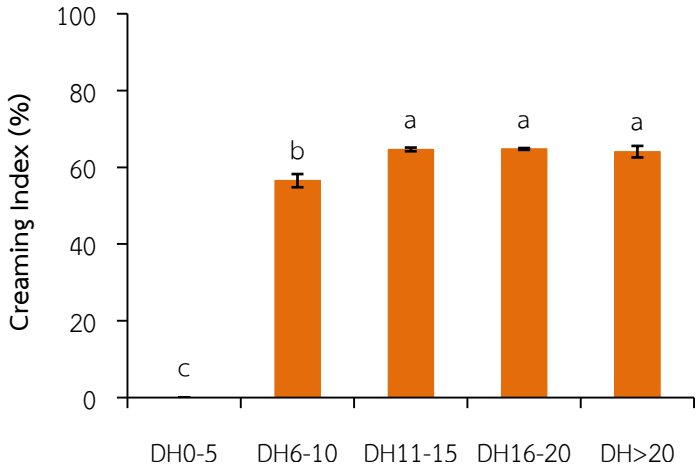
ตรวจสอบค่าดัชนีการเกิดครีม ของอิมัลชันของ MRBP-A และMRBP-F พบว่า MRBP-Aที่ระดับการย่อยร้อยละ 0-5 มีความคงตัวของครีมแต่เมื่อช่วงระดับการย่อยเพิ่มขึ้นเกิดการรวมตัวกันของอนุภาคไขมันและเกิดการแยกชั้นครีม (ภาพที่ 4.2 3A) สำหรับอิมัลชันของ MRBP-F ที่

ระดับการย่อยร้อยละ 0-5 และ 6-10 มีความคงตัวของครีม แต่ที่ระดับการย่อยร้อยละ 11-15 จะเกิดการแยกชั้นครีม(ภาพที่ 4.23B)แสดงให้เห็นว่าการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ที่ระดับการย่อยต่ำ (ร้อยละ 0-10) สามารถทำให้อิมัลชันเกิดการคงตัวได้ สังเกตจากไม่เกิดการแยกชั้นของครีม ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนรำข้าวดัดแปลงที่ระดับการย่อยต่ำ จะทำให้โครงสร้างโปรตีนเกิดการคลายตัว ส่งผลต่อการเพิ่มพื้นที่ผิวส่วนที่ไม่ชอบน้ำ อีกทั้งการย่อยจะช่วยเพิ่มความสมดุลระหว่างโปรตีนส่วนที่ชอบน้ำกับโปรตีนส่วนที่ชอบน้ำมัน (Hydrophilic-lipophilic balance) ทำให้โปรตีนมีคุณสมบัติในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ที่ดี (Guan et al., 2007) แต่ที่ระดับการย่อยเพิ่มมากขึ้น (มากกว่าร้อยละ 10) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงให้คุณสมบัติการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ลดลง เนื่องจากโครงสร้างโปรตีนเกิดการคลายตัวออกมาที่เกิดจากการย่อยในระดับสูงจะมีปริมาณกรดอะมิโนที่มีประจุและไม่มีประจุที่ซ่อนอยู่ภายในโครงสร้างเกิดขึ้นที่ผิวของโปรตีนมากขึ้นอีกทั้งโครงสร้างของโปรตีนหรือสายเพปไทด์จะมีขนาดโมเลกุลเล็ก ทำให้โปรตีนมีความเป็น Amphiphilicไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดอิมัลชันที่ดี ส่งผลให้ความสามารถในการห่อหุ้มเม็ดไขมันของโปรตีนบริเวณผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันจึงลดลง (Phongthai et al., 2016 และ Phongthai et al., 2017)

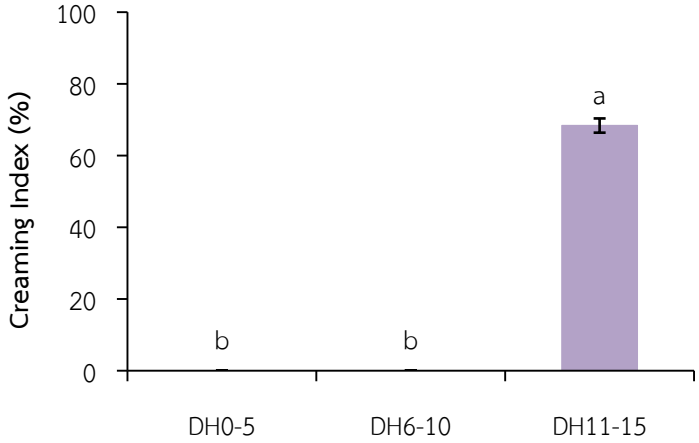
4) โครงสร้างทางจุลภาคของอนุภาคเม็ดไขมัน

ผลการทดลองโครงสร้างทางจุลภาคของอิมัลชันที่มีส่วนผสมของ MRBP-A และ MRBP-F (ภาพที่ 4.24) พบว่าโครงสร้างทางจุลภาคของอนุภาคเม็ดไขมันจากระบบอิมัลชันของ MRBP-A ที่ระดับการย่อยร้อยละ 0-5 และ MRBP-F ที่ระดับการย่อยร้อยละ 0-5 และ 6-10 มีการกระจายตัวของอนุภาคเม็ดไขมันที่แขวนลอยได้ดี ทำให้ระบบอิมัลชันมีความคงตัวและไม่เกิดการแยกชั้นครีม แต่ที่ระดับการย่อยเพิ่มขึ้น มีการกระจายตัวของอนุภาคขนาดเล็กที่แขวนลอยอยู่ในระบบ แต่ยังคงมีเม็ดไขมันบางส่วนเกิดการเกาะกลุ่มกันและเกิดการรวมตัวกัน ส่งผลให้เม็ดไขมันบางส่วนมีขนาดใหญ่ทำให้ระบบอิมัลชันไม่คงตัว ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองการกระจายตัวของอนุภาคเม็ดไขมันและดัชนีการเกิดครีม

(A)

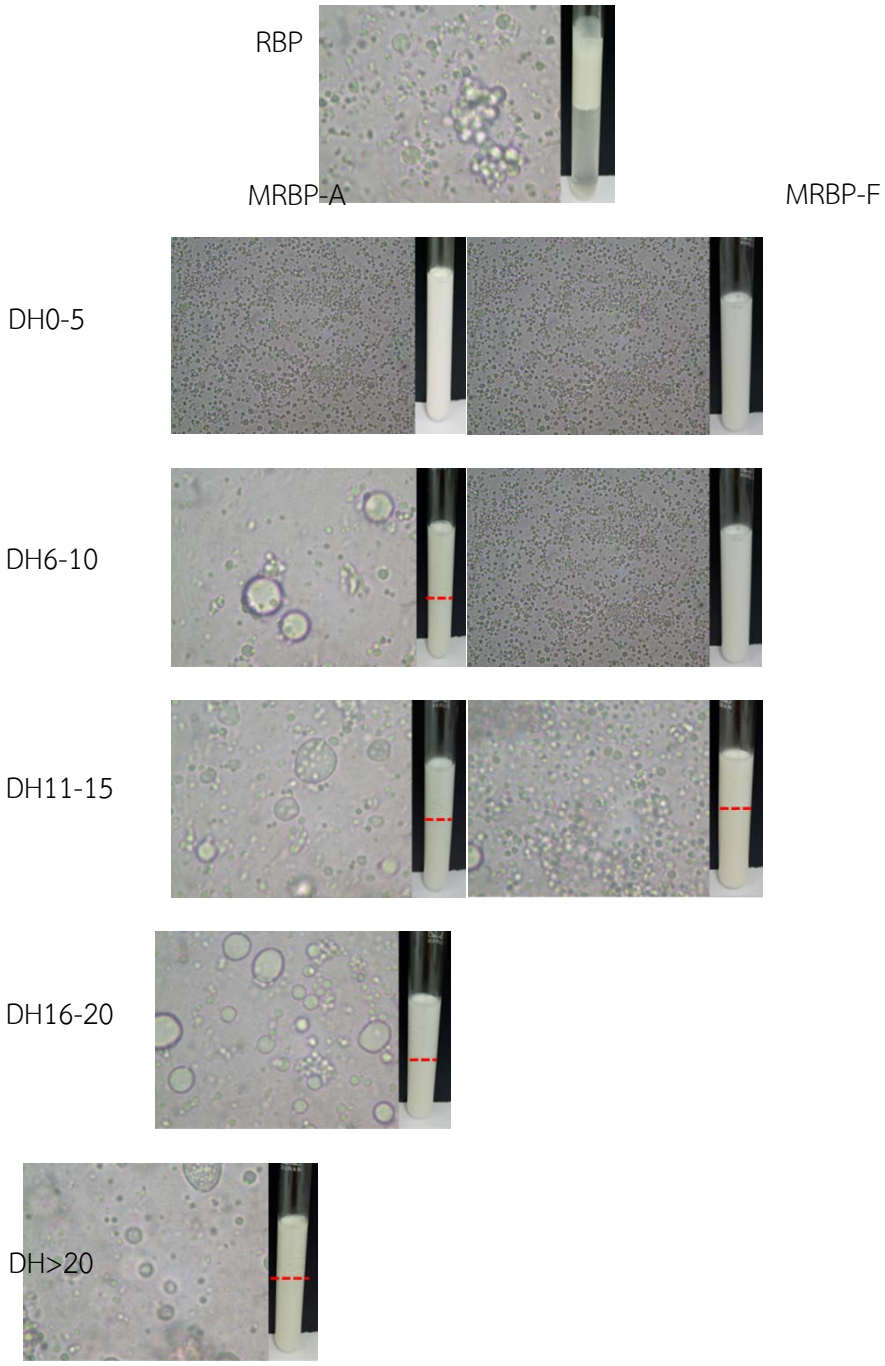


(B)



หมายเหตุ: [a,b]อักษรกำกับที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

ภาพที่ 4.23ดัชนีการเกิดครีมของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส(ภาพ A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์(ภาพ B) ที่ระดับการย่อย (DH) ต่างๆ ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10 พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.24โครงสร้างจุลภาคของอนุภาคเม็ดไขมันของโปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส(MRBP-A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์(MRBP-F) ที่ระดับการย่อย (DH) ต่างๆ ความเข้มข้นร้อยละ 0.4โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10 พีเอช6.5 ทำการวัดหลังจากเก็บนาน 24 ชั่วโมงด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังการขยาย 100 เท่า)

4.5.3สมบัติการอุ้มน้ำและสมบัติการอุ้มน้ำมัน

4.5.3.1 สมบัติการอุ้มน้ำและสมบัติการอุ้มน้ำมันของโปรตีนรำข้าว

ผลวิเคราะห์สมบัติการอุ้มน้ำของโปรตีนรำข้าว(RBP)เปรียบเทียบกับโปรตีน ถั่วเหลือง(SP) พบว่า RBP มีสมบัติการอุ้มน้ำน้อยกว่า SP(ตารางที่ 4.9) เนื่องจากชนิดของกรด อะมิโนที่แตกต่างกันส่งผลให้ความสามารถในการอุ้มน้ำที่แตกต่างกัน เพราะความสามารถของโมเลกุลที่สามารถรักษาน้ำเอาไว้ในโครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่มีอยู่ในอาหารเกิดจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของน้ำกับส่วนที่ชอบน้ำของโปรตีน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการมีขั้วและไม่มีขั้วของกรดอะมิโนของโปรตีนแต่ละชนิด ผลการทดลองสอดคล้องกับ Onsaard et al. (2010) รายงานสมบัติการอุ้มน้ำของโปรตีนถั่วเหลืองเป็น 6.1 กรัมของน้ำต่อกรัมของโปรตีน และ Chandi and Sogi (2007) รายงานว่าสมบัติการอุ้มน้ำของโปรตีนรำข้าวมีค่าเท่ากับ 3.87 กรัมของน้ำต่อกรัมของโปรตีนเช่นเดียวกับ Cao et al. (2009)รายงานว่าสมบัติการอุ้มน้ำของโปรตีนรำข้าวมีค่าเท่ากับ3.54 กรัมของน้ำต่อกรัมของโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนจากพืช พบว่าโปรตีนรำข้าวมีสมบัติการอุ้มน้ำใกล้เคียงกับโปรตีนบักหวีดและโปรตีนงาดำ เป็น 3.30 และ 3.11 กรัมของน้ำต่อกรัมของโปรตีน ตามลำดับ (Tomotake et al., 2002 และ สังคม สิงหาราช, 2557)

ผลการทดลองสมบัติการอุ้มน้ำมันของ RBP และ SP พบว่า RBP มีสมบัติการอุ้มน้ำมันดีกว่า SP(ตารางที่ 4.9) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Cao et al. (2009)รายงานว่าสมบัติการอุ้มน้ำมันของ RBP เท่ากับ 3.83 กรัมของน้ำมันต่อกรัมของโปรตีนโดยทั่วไปแล้วสมบัติการอุ้มน้ำมันจะมีความสำคัญกับระบบอิมัลชัน เพราะระบบอิมัลชันมีน้ำมันเป็นองค์ประกอบและมีความสัมพันธ์กับปริมาณกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วในโปรตีนซึ่งเป็นส่วนสำคัญของส่วนที่ชอบน้ำมันของโปรตีน เมื่อมีความสามารถในการอุ้มน้ำมันมากจะมีแนวโน้มในทางเดียวกันกับความคงตัวของอิมัลชัน

ตารางที่ 4.9ความสามารถในการอุ้มน้ำและอุ้มน้ำมันของโปรตีนรำข้าว (RBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลือง (SP)

ตัวอย่าง	ความสามารถในการอุ้มน้ำ (กรัมของน้ำต่อกรัมของโปรตีน)	ความสามารถในการอุ้มน้ำมัน (กรัมของน้ำมันต่อกรัมของโปรตีน)
RBP	2.75 ± 0.31^{b}	3.66 ± 0.31^{a}
SP	6.03 ± 0.39^{a}	2.73 ± 0.95^{b}

หมายเหตุ:ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

^{a,b}อักษรกำกับที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\leq0.05$

4.5.3.2 สมบัติการอุ้มน้ำและสมบัติการอุ้มน้ำมันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง

ผลการทดลองความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีนรำข้าว (MRBP)และโปรตีนถั่วเหลือง (MSP)ดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่างพบว่า ความสามารถในการอุ้มน้ำของ MRBP มีค่าน้อยกว่า MSP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ส่วนความสามารถในการอุ้มน้ำมัน ของ MRBP มีค่าน้อยกว่า MSP ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)(ตารางที่ 4.10) แต่เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการอุ้มน้ำและน้ำมันระหว่าง MRBP และRBPและระหว่าง SP และ MSP(ตารางที่ 4.9 และ 4.10)พบว่าMRBP มีความสามารถในการอุ้มน้ำสูงกว่า RBP (เพิ่มขึ้นจาก 2.77 เป็น 4.02 กรัมของน้ำต่อกรัมของโปรตีน) และ MRBP มีความสามารถในการอุ้มน้ำมันสูงกว่า RBP (เพิ่มขึ้นจาก 3.66 เป็น 4.17 กรัมของน้ำมันต่อกรัมของโปรตีน) และเมื่อเปรียบเทียบสมบัติ การอุ้มน้ำของ SP จะมีค่ามากกว่า MSP แต่สมบัติการ อุ้มน้ำมันระหว่าง SP จะมีน้อยกว่า MSP ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการใช้ความร้อนร่วมกับสารละลายด่างในการดัดแปลงโปรตีนรำข้าวจะช่วยเพิ่มสมบัติการอุ้มน้ำและน้ำมัน แต่ การใช้ความร้อนร่วมกับสารละลายด่างในการดัดแปลง โปรตีนถั่วเหลืองจะช่วยเพิ่มเฉพาะสมบัติการอุ้มน้ำมันเท่านั้น

ตารางที่ 4.10ความสามารถในการอุ้มน้ำและอุ้มน้ำมันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) และโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP)

ตัวอย่าง	**ความสามารถในการอุ้มน้ำ (กรัมของน้ำต่อกรัมของโปรตีน)**	**ความสามารถในการอุ้มน้ำมัน (กรัมของน้ำมันต่อกรัมของโปรตีน)**
MRBP	4.02 ± 0.10^{b}	4.17 ± 0.79^{a}
MSP	5.82 ± 0.11^{a}	4.56 ± 0.74^{a}

หมายเหตุ:ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

^{a,b}อักษรกำกับที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

4.5.3.3สมบัติการอุ้มน้ำและสมบัติการอุ้มน้ำมันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์

จากผลการทดลองสมบัติการอุ้มน้ำและสมบัติการอุ้มน้ำมันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (MRBP-A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (MRBP-F) ที่ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH) ต่างๆ ดังตารางที่ 4.11-4.12 พบว่า MRBP-A ความสามารถในการอุ้มน้ำเพิ่มขึ้นที่ระดับการย่อยร้อยละ 0-5 ถึงร้อยละ 16-20 จากนั้นลดลงที่ระดับการย่อยมากกว่าร้อยละ 20 โดยสมบัติการอุ้มน้ำของ MRBP-A ที่ร้อยละ11-15 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 6.46 ก รัมของน้ำต่อกรัมของโปรตีน (ตารางที่ 4.11) ส่วนสมบัติการอุ้มน้ำของ MRBP-F ทุกระดับการย่อย คือ ร้อยละ 0-5, 6-10 และ 11-15(4.06-4.76 กรัมของน้ำต่อกรัมของโปรตีน) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) (ตารางที่ 4.12) ผลสมบัติการอุ้มน้ำของ MRBP-A และ MRBP-Fที่แตกต่างกัน เนื่องจากความจำเพาะของสารตั้งต้นหรือซับสเตรท (Substrate) ของเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่แตกต่างกัน ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ภายหลังจากการย่อยแตกต่างกัน อาจส่งผลถึงการแสดงกลุ่มของประจุ (Charge) หรือโมเลกุลมีขั้ว (Polar group) ที่แตกต่างกันส่งผลให้การแสดงความสามารถในการชอบน้ำ (Hydrophilic) แตกต่างกัน

ส่วนความสามารถในการอุ้มน้ำมันของ MRBP-A ทุกช่วงระดับการย่อยมีค่าเท่ากับ 4-6 กรัมของน้ำมันต่อกรัมของโปรตีน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) (ตารางที่ 4. 11) แต่ความสามารถในการอุ้มน้ำมันของ MRBP-F ที่ระดับการย่อยร้อยละ 0-5 จะมีค่าสูงสุดเท่ากับ 6.55 กรัมของน้ำมันต่อกรัมของโปรตีน (ตารางที่ 4.1 2) ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นของทั้งความสามารถในการอุ้มน้ำและน้ำมันของโปรตีนที่ผ่านการดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับด่าง หรือการใช้เอนไซม์ ไม่เพียงแต่จะช่วยแสดงกลุ่มของประจุ (Charge) หรือโมเลกุลมีขั้ว (Polar group) เพิ่มขึ้น แต่ยังเพิ่มจำนวนกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic groups) บนโมเลกุลของโปรตีนอีกด้วย ส่งผลให้ช่วยเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำมันของโปรตีน สอดคล้องกับ Zhang et al. (2012) รายงานความสามารถในการอุ้มน้ำและอุ้มน้ำมันของโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่าโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการอุ้มน้ำเป็น 4.4 กรัมของน้ำต่อกรัมของโปรตีน และมีความสามารถในการอุ้มน้ำมันเท่ากับ 5.13 กรัมของน้ำมันต่อกรัมของโปรตีน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการดัดแปลงด้วยเอนไซม์จะช่วยเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำและอุ้มน้ำมันเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.11ความสามารถในการอุ้มน้ำและอุ้มน้ำมันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับการย่อย (DH) ต่างๆ

ระดับการย่อย	ความสามารถในการอุ้มน้ำ (กรัมของน้ำต่อกรัมของโปรตีน)	ความสามารถในการอุ้มน้ำมัน (กรัมของน้ำมันต่อกรัมของโปรตีน)
DH0-5	5.26±0.09[c]	5.80±0.47[a]
DH6-10	5.89±0.10[b]	5.88±0.19[a]
DH11-15	6.46±0.24[a]	5.50±0.59[a]
DH16-20	6.17±0.22[ab]	6.08±0.33[a]
DH>20	4.91±0.22[d]	5.49±0.56[a]

หมายเหตุ: [a,b,c]อักษรกำกับที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

ตารางที่ 4.12ความสามารถในการอุ้มน้ำและอุ้มน้ำมันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ที่ระดับการย่อย (DH) ต่างๆ

ระดับการย่อย	ความสามารถในการอุ้มน้ำ (กรัมของน้ำต่อกรัมของโปรตีน)	ความสามารถในการอุ้มน้ำมัน (กรัมของน้ำมันต่อกรัมของโปรตีน)
DH0-5	4.76±0.03[a]	6.55±0.12[a]
DH6-10	4.17±0.03[a]	5.03±0.40[b]
DH11-15	4.06±0.22[a]	4.05±0.32[c]

หมายเหตุ: [a,b,c]อักษรกำกับที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

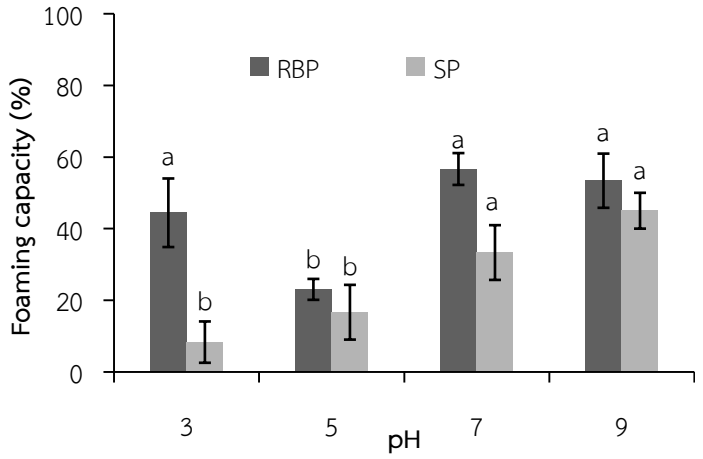
4.5.4 สมบัติการเกิดโฟม

4.5.4.1 สมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนรำข้าว

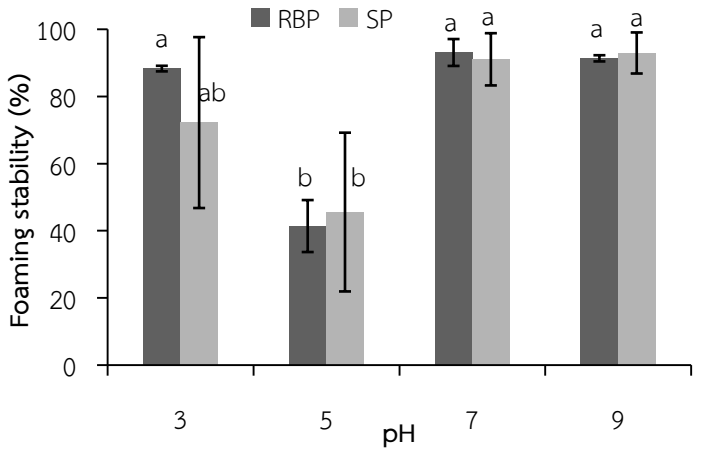
จากการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดโฟม (Foaming capacity: FC) และความคงตัวของโฟม (Foaming stability: FA) ของโปรตีนรำข้าว (RBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลือง (SP) ที่ระดับพีเอช 3 5 7 และ 9 ดังภาพที่ 4. 25 พบว่า RBP มีความสามารถเกิดโฟมได้ดีกว่า SP ที่พีเอช 3 และ 7 แต่พีเอช 5 และ 9 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) สอดคล้องกับผลการศึกษาค่าการละลายของโปรตีนดังภาพที่ 4.8 เพราะการเกิดโฟมของโปรตีนมีความสัมพันธ์กับการละลายของโปรตีน ถ้าโปรตีนละลายได้มากหรือเกิดการกระจายตัวของโปรตีนในน้ำได้ดี ส่งผลให้โปรตีนแพร่กระจายไปยังผิวหน้าระหว่างน้ำและอากาศได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้เกิดการจับอากาศของโปรตีนเกิดเป็นโครงสร้างฟิล์มล้อมรอบฟองอากาศ (Tang et al., 2003) นอกจากนี้ความสามารถในการเกิดโฟมของ RBP ที่พีเอช 3 7 และ 9 มีค่าสูง คือ ร้อยละ 44, 56 และ 53 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับพีเอช 5 เนื่องจากพีเอช 5 เป็นพีเอชที่ใกล้เคียงกับจุดไฮโซอิเล็กตริก (Isoelectric point:pI) ทำให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนน้อยลงส่งผลให้ความสามารถในการเกิดโฟมต่ำ (ร้อยละ 23)

ส่วนความคงตัวของโฟม พบว่า RBP มีความคงตัวของโฟมดีกว่า SP ที่พีเอช 3 และ 7 แต่พีเอช 5 และ 9 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) และที่พีเอช 5 ความคงตัวของโฟมน้อยสุด ทั้งนี้ความคงตัวของโฟมของ RBP ที่พีเอช 3 7 และ 9 คิดเป็นร้อยละ 38 , 53 และ 47 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chandi and Sogi (2007) พบว่าที่สภาวะกรดและด่างโปรตีนจะเกิดการละลายได้ดี ทำให้ความสามารถในการเกิดโฟมดีและความคงตัวของโฟมสูง เมื่อเทียบกับสภาวะที่พีเอช 5 เนื่องจากที่พีเอชใกล้จุดไอโซอิเล็กทริก ทำให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนต่ำและเกิดการตกตะกอนส่งผลให้ความสามารถในการเกิดโฟมไม่ดีและความคงตัวของโฟมต่ำ ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าพีเอชเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อค่าความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟมของโปรตีนรำข้าว ซึ่งในสภาวะที่มีความเป็นกรดหรือด่างสูงโมเลกุลของโปรตีนจะสัมพันธ์กับประจุสุทธิทำให้เกิดการผลักกัน (Electrostatic repulsion) ของประจุไฟฟ้าซึ่งมีผลทำให้แรงไฮโดรโฟบิกอ่อนแรงลง ส่งผลให้โมเลกุลของโปรตีนมีความยืดหยุ่น (Guan et al., 2007)

(A)



(B)



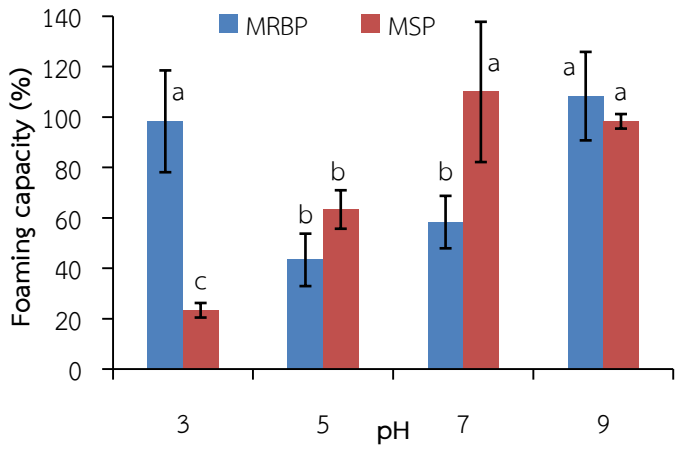
หมายเหตุ: [a,b]อักษรกำกับที่ต่างกันที่พีเอชแตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

ภาพที่ 4.25 ความสามารถในการเกิดโฟม(ภาพ A) และความคงตัวของโฟม(ภาพ B) ของโปรตีนรำข้าว (RBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลือง (SP) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับพีเอช 3 5 7 และ 9

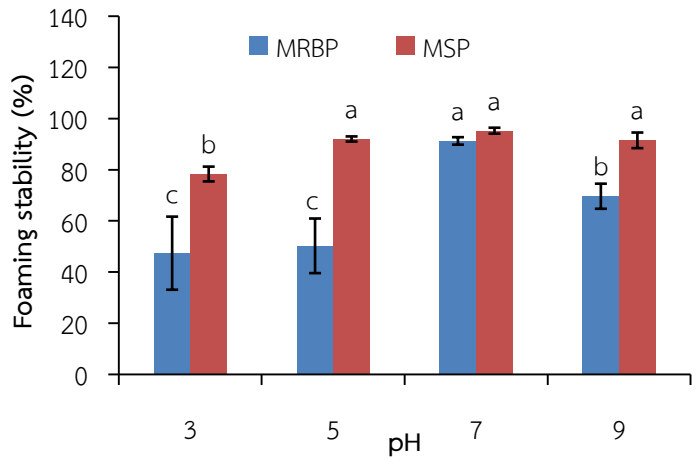
4.5.4.2 สมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง

ผลการศึกษาความสามารถในการเกิดโฟม (Foaming capacity: FC) และความคงตัวของโฟม(Foaming stability: FA) ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP) ที่ระดับพีเอช 3 5 7 และ 9 (ภาพที่ 4.2 6) พบว่า MRBP มีความสามารถในการเกิดโฟมได้ดีที่สภาวะพีเอชเป็นกรดและด่าง โดยเฉพาะที่พีเอช 3 และพีเอช 9 เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่าง MRBP กับ MSP พบว่า MRBP ที่พีเอช 3 และ 9 มีความสามารถในการเกิดโฟมได้ดี แต่ที่พีเอช 5 และ 7 มีความสามารถในการเกิดโฟมต่ำกว่า MSP(ภาพ 4.26 A) ส่วนความคงตัวของโฟม พบว่า MSP มีความคงตัวของโฟมดีกว่า MRBP ทุกพีเอช ยกเว้นที่พีเอช 3 ที่มีความคงตัวของโฟมต่ำ (ภาพ 4.26 B) จากผลการทดลองสามารถอธิบายได้ว่าการใช้ความร้อนทำให้โมเลกุลของ MRBP เกิดการคลายตัวและความสามรถในการละลายเพิ่มขึ้นและความสามารถในการละลาสูงกว่า MSP ทำให้ MRBP สามารถแพร่กระจายไปยังผิวหน้าระหว่างน้ำและอากาศได้เร็ว เกิดการจัดเรียงตัวบริเวณผิวหน้าของอากาศและน้ำได้ดี ความสามารถในการเกิดโฟมจึงดี (พีเอช 9) เมื่อพิจารณาผลความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟมระหว่าง MRBP กับ RBP (ภาพที่ 4.24) พบว่า MRBP มีความสามารถในการเกิดโฟมเพิ่มขึ้นและมีความคงตัวของโฟมได้ดี แสดงให้เห็นว่าการใช้ความร้อนร่วมกับสารละลายด่างช่วยให้โปรตีนมีความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟมดีขึ้น จากการศึกษาของ Yeom et al., (2010) ได้ทำการศึกษาการดัดแปลงโปรตีนรำข้าวโดยใช้ความร้อนเช่นเดียวกัน แต่เป็นการใช้ความร้อนด้วยวิธีการให้ความร้อนแบบ autoclaved ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เวลา 30 นาที พบว่าโปรตีนรำข้าวมีความสามารถในการเกิดโฟมเพิ่มขึ้น เพราะการใช้ความร้อนแบบวิธี Autoclaved ส่งผลให้โครงสร้างของโปรตีนเกิดการคลายตัวและได้โมเลกุลของเพปไทด์ที่มีขนาดเล็กลง

(A)



(B)



หมายเหตุ: [a,b]อักษรกำกับที่ต่างกันที่พีเอชแตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

ภาพที่ 4.26 ความสามารถในการเกิดโฟม(ภาพ A) และความคงตัวของโฟม(ภาพ B) ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MSP) ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับพีเอช 3 5 7 และ 9

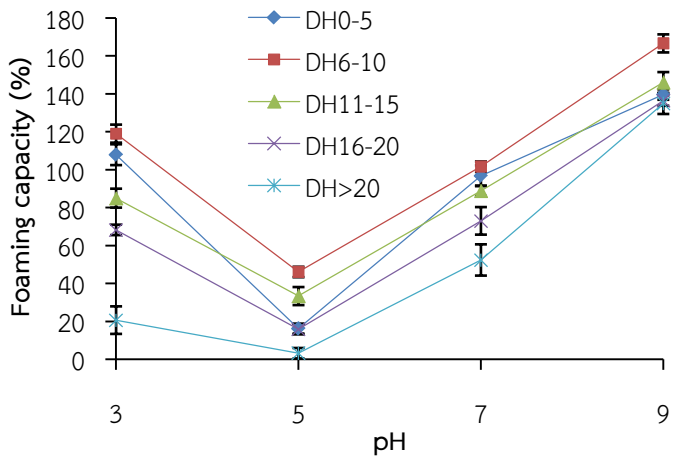
4.5.4.3 สมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์

1) สมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส(MRBP-A)

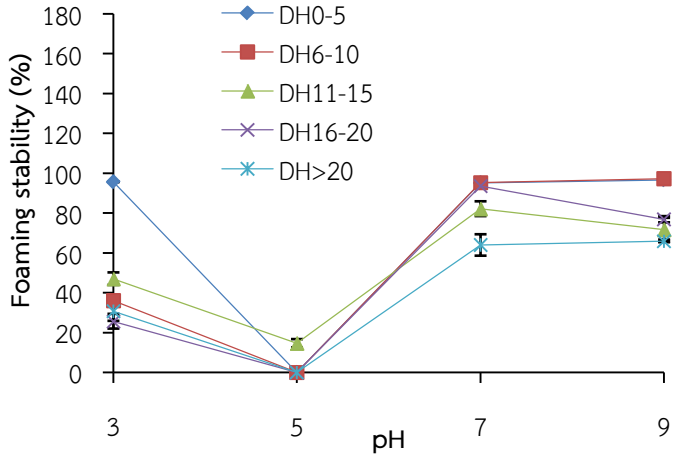
ผลการศึกษาความสามารถในการเกิดโฟม (Foaming capacity: FC) และความคงตัวของโฟม (Foaming stability: FA) ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (MRBP-A)ที่ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH) ร้อยละ 0-5, 6-10, 11-15, 16-20 และ >20 พีเอช 3, 5, 7 และ 9 แสดงดังภาพที่ 4.27A พบว่า MRBP-A ทุกระดับการย่อยมีความสามารถในการเกิดโฟมดีที่สภาวะพีเอชมากกว่า 5 และน้อยกว่า 5 และความสามารถในการเกิดโฟมสูงที่สุดของโปรตีนทุกช่วงระดับการย่อยที่พีเอช 9 และเมื่อเปรียบเทียบผลของระดับการย่อยต่อ ความสามารถในการเกิดโฟม พบว่าระดับการย่อยร้อยละ 6-10 มีความสามารถในการเกิดโฟมสูงที่สุดและระดับการย่อยร้อยละ >20มีความสามารถในการเกิดโฟม ต่ำที่สุด ทุกพีเอชสำหรับความคงตัวของโฟมของ MRBP-Aที่ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH) ต่าง ๆ แสดงดังภาพที่4.27 B พบว่า MRBP-A ทุกช่วงระดับการย่อยมีความคงตัวของโฟมต่ำสุดที่พีเอช 5 และความคงตัวของโฟมเพิ่มขึ้นที่พีเอชมากกว่าและน้อยกว่า 5 เมื่อพิจารณาผลของระดับการย่อยต่อ ความคงตัวของโฟมของ MRBP-A พบว่าระดับการย่อยร้อยละ 6-10 ให้ค่าความคงตัวของโฟมมากสุด แต่ที่ระดับการย่อยร้อยละ >20 จะให้ความคงตัวต่ำที่สุดทุกพีเอช

เนื่องจากความสามารถของการเกิดโฟมและความคงตัวของการเกิดโฟมของ MRBP-A จะมีความสัมพันธ์กับค่าพีเอช ทั้งนี้ผลจากประจุ (Net charge) ของโปรตีนมีผลต่อการดูดซับระหว่างอากาศกับผิวน้ำ (Air-water interface)เมื่อประจุเพิ่มมากขึ้น สมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนจะเพิ่มขึ้น ส่วนที่พีเอช 5 สมบัติการเกิดโฟมของโปรตีน จะต่ำที่สุด เนื่องจากความสามารถในการละลายต่ำสุด เพราะใกล้จุด isoelectric point (pI)เมื่อพิจารณาผลของ ระดับการย่อยพบว่าที่ระดับการย่อยสูง ได้เพปไทด์ที่มีขนาดเล็กทำให้ความสามารสามารถห่อหุ้มฟองอากาศต่ำมีผลต่อความสามารถเกิดโฟมต่ำ (Zhao et al., 2012) เช่นเดียวกับการทดลองของ Phongthai et al. (2016) พบว่าโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับการย่อยร้อยละ 5.04 มีความสามารถในการเกิดโฟมสูงสุด แต่ที่ระดับการย่อยร้อยละ 10.37 และร้อยละ 15.04 ความสามารถในการเกิดโฟมต่ำ อีกทั้งยังสอดคล้องกับโปรตีนจากพืชชนิดอื่น เช่นการทดลองของ Yust et al. (2010) ที่ได้ทำการศึกษาความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนถั่วเขียว (Chickpea) ที่ระดับการย่อยร้อยละ 10 พบว่าโปรตีนมีความสามารถในการเกิดโฟมลดลง Chabanon et al. (2007) ศึกษาความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนแอลบูมินจากโปรตีนแรบซีดที่ระดับการย่อยร้อยละ 5 ถึง 15 พบว่าโปรตีนมีความสามารถในการเกิดโฟมลดลงจากร้อยละ 91 เป็น86 และ Jamdar et al. (2010) พบว่าโปรตีนถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับการย่อยร้อยละ 40 มีความสามารถในการเกิดโฟมต่ำ

(A)



(B)



ภาพที่ 4.27ความสามารถในการเกิดโฟม (ภาพ A) และความคงตัวของโฟม (ภาพ B) ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ระดับพีเอช 3 5 7 และ 9

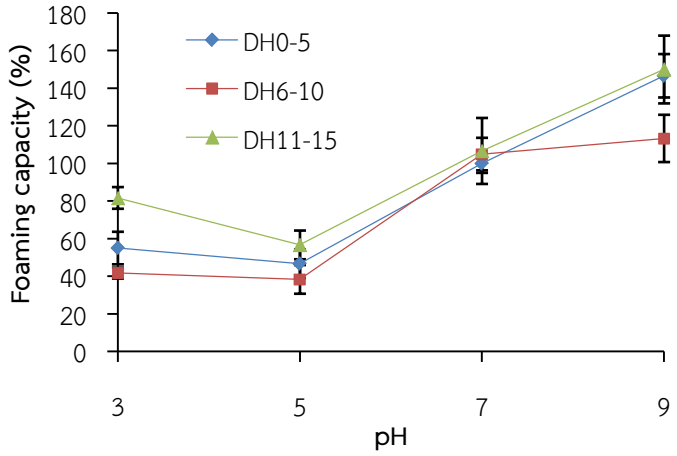
2) สมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์

ส่วนผลการศึกษาความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์(MRBP-F)ที่ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis: DH) ร้อยละ 0-5, 6-10 และ 11-15 พีเอช 3, 5, 7 และ 9แสดงดังภาพที่ 4.28 Aพบว่า MRBP-F มีความสามารถในการเกิด โฟมได้ดีที่สภาวะพีเอชมากกว่า 5 แต่ที่พีเอช 3 และ5 ความสามารถในการเกิดโฟมไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบผลความสามารถในการเกิดโฟมระหว่างช่วงระดับการย่อย พบว่าที่ระดับการย่อยร้อยละ 0-5 มีความสามารถในการเกิดโฟมมากและไม่แตกต่างกันกับที่ระดับการย่อยร้อยละ 11-15 แต่ที่ระดับการย่อยร้อยละ 6-10 มีความสามารถในการเกิดโฟมต่ำสุด (ภาพที่ 4.28 A)เมื่อพิจารณาผลความคงตัวของโฟมพบว่าผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับความสามารถในการเกิดโฟม โดย MRBP-F มีความคงตัวของโฟมได้ดีที่สภาวะพีเอชมากกว่า 5 แต่ที่พีเอช 3 และ 5 มีความคงตัวของโฟมต่ำสุด

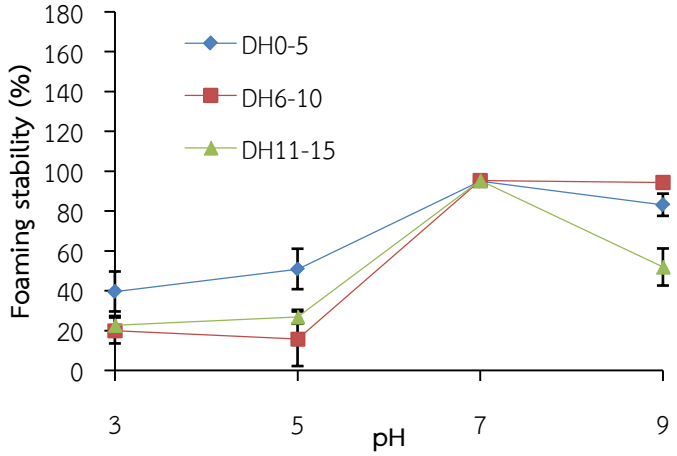
เมื่อเปรียบเทียบผลระดับการย่อยของโปรตีนต่อความคงตัวของโปรตีน พบว่าระดับการย่อยร้อยละ 0-5 มีความคงตัวของโฟมมากสุด และมีความคงตัวของโฟมลดลงเมื่อช่วงระดับการย่อยเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4.28 B)สอดคล้องกับผลการทดลองของ ลีนา หง้าฝา (2556) พบว่าโปรตีนถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยร้อยละ 5 และ 10 มีความสามารถในการเกิดโฟมที่ดี แต่เมื่อระดับการย่อยของโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 15 พบว่าความสามารถในการเกิดโฟมมีค่าลดลง และเมื่อพิจารณาความคงตัวของโฟมพบว่าเมื่อระดับการย่อยของโปรตีนเพิ่มขึ้น จะให้ผลของความคงตัวของโฟมลดลงพบว่าที่ระดับการย่อยร้อยละ 15 มีค่าความคงตัวของโฟมต่ำ

จากผลการศึกษาจะเห็นว่า MRBP-A หรือ MRBP-F มีความสามารถเกิดฟองและความคงตัวของโฟมที่ดี เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนรำข้าว (RBP) แต่อย่างไรก็ตามที่ระดับการย่อยต่ำๆ (ร้อยละ 5-10)จะมีความสามารถในการเกิดฟองสูงกว่าระดับการย่อยสูง โดยทั่วไปแล้วความสามารถในการเกิดโฟมเกิดจากโปรตีนที่ละลายอยู่ในของเหลวเคลื่อนที่มาบริเวณที่ผิวรอยต่อระหว่างอากาศกับน้ำ โปรตีนคลายตัวเกิดเป็นฟิล์มบาง จัดเรียงตัวในลักษณะเป็นสายยาว (Chain) ห่วง (Loop) และหาง (Tail) หันส่วนที่ไม่มีขั้วสู่อากาศแต่หันส่วนมีขั้วสู่น้ำ ส่งผลให้โปรตีนสามารถกักเก็บอากาศไว้ได้ในโครงสร้าง และฟองอากาศสามารถกระจายตัวอยู่ภายในของเหลวได้ แต่เมื่อ โปรตีนที่ระดับการย่อยสูง จะเป็นเพปไทด์สายสั้นได้โมเลกุลโปรตีนขนาดเล็ก ส่งผลให้โปรตีนขาดความสามารถในการจัดเรียงตัวบริเวณผิวหน้าของอากาศและน้ำ (Air-water interface) จึงไม่เกิดเป็นฟิล์มห่อหุ้มฟองอากาศไว้ ทำให้ความสามารถในการเกิดฟองไม่ดี (Phongthai et al., 2016) อีกทั้งการย่อยจะทำให้ได้โมเลกุลที่มีประจุมาก ซึ่งการที่โมเลกุลมีประจุมากทำให้เกิดการขัดขวางการขึ้นรูปและส่งผลต่อความคงตัวของโฟม(Chandi and Sogi, 2007)

(A)



(B)



ภาพที่ 4.28ความสามารถในการเกิดโฟม (ภาพ A) และความคงตัวของโฟม (ภาพ B) ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ระดับพีเอช 3 5 7 และ 9

ส่วนที่ 3 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลง

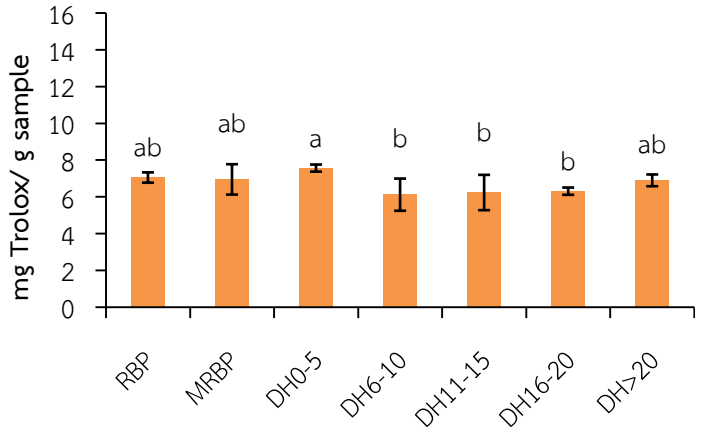
4.6 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนรำข้าวดัดแปลง

4.6.1 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTSradical scavenging activity

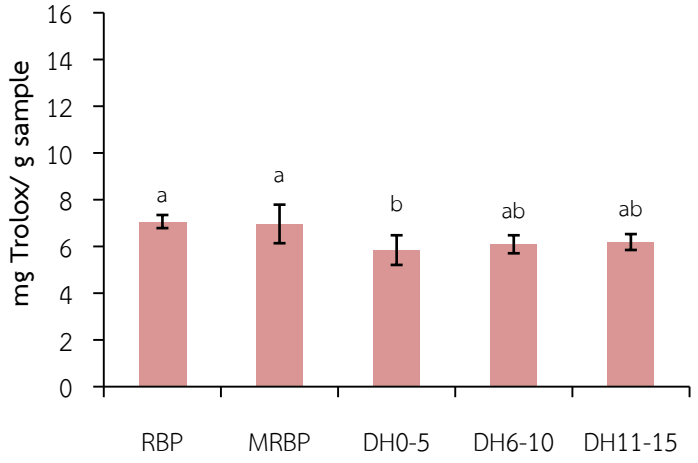
การวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการเป็นสารอนุมูลอิสระทดสอบ ด้วยวิธี ABTS radical scavenging activityของโปรตีนรำข้าว(RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง(MRBP) และโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส(MRBP-A)และ เอนไซม์ฟลาโวไซม์ (MRBP-F)ที่ระดับการย่อยต่างๆ แสดงดังภาพที่ 4.29พบว่าRBP MRBP และ MRBP-A ที่ระดับการย่อยร้อยละ 0-5 และ >20 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) แต่ MRBP-A ระดับการย่อยร้อยละ 0-5 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$มากสุด คือ 7.57 mg Trolox/g sample (ภาพที่ 4.29 A) สำหรับMRBP-Fเมื่อเปรียบเทียบกับ RBP และ MRBP พบว่า RBP MRBP และ MRBP-F ที่ระดับการย่อยต่างๆ จะมี ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ$ABTS^{+}$ ใกล้เคียงกันคืออยู่ในช่วง 5.84-7.06 mg Trolox/g sample (ภาพที่ 4.29 B)สอดคล้องกับ Thamnarathip et al. (2016) รายงานความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ของโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับการย่อยร้อยละ 12.5 , 16.3 และ 18.7 เปรียบเทียบกับโปรตีนรำข้าวที่ไม่ผ่านการย่อย พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ ไม่แตกต่างกัน

รายงานค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่ได้ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระของ $ABTS^{+}$ได้ร้อยละ 50ของปริมาณทั้งหมด(Effective Concentration:EC50)พบว่าMRBP-A ที่ระดับการย่อยร้อยละ 0-5 มีค่า EC_{50}ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนน้อย คือ 2.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ($p \leq 0.05$)(ตารางที่ 4.1 3)ส่วน MRBP-F ที่ระดับการย่อยต่างๆ ให้ค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 3.27-3.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) (ตารางที่ 4.1 4)จากการรายงานของ Adebiyiet al. (2009) และ Thamnarathip et al. (2016) พบว่าการใช้เอนไซม์ในการย่อยโปรตีนทำให้โมเลกุลของโปรตีนมีขนาดเล็ก มีสายเพปไทด์ขนาดสั้นเพิ่มขึ้น จึงส่งผลให้สายเพปไทด์มีกรดอะมิโนที่มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นด้วย เช่น กรดอะมิโนประเภทสารประกอบฟีนอล (Phenolic hydroxyl) ฮิตติดีน (Histidine) โพรลีน (Proline)ทริปโตเฟน (Tryptophan) ลิวซีน (Leucine) วาลีน (Valine)อะลานีน (Alanine) และเมไทโอนีน (Mathionine) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เพราะเอนไซม์แต่ละชนิดมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นต่างกัน

(A)



(B)



ภาพที่ 4.29 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS ของโปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง(MRBP) โปรตีนรำ ข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส(MRBP-A) ที่ระดับการย่อย(DH) ร้อยละ0-5, 6-10, 11-15, 16-20 และ >20(ภาพ A) และโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ ฟลาโวไซม์ (MRBP-F) ที่ระดับการย่อย(DH) ร้อยละ 0-5, 6-10 และ11-15 ที่ ความเข้มข้นของโปรตีน 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร(ภาพ B)

ตารางที่4.13ผลของฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS ที่ร้อยละ 50 (EC_{50}) ของโปรตีน รำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส(MRBP-A) ที่ระดับ การย่อย(DH) ร้อยละ0-5, 6-10, 11-15, 16-20 และ >20

ตัวอย่าง	**EC_{50} (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)**
Trolox	0.34 ± 0.01^{a}
RBP	3.07 ± 0.08^{c}
MRBP	3.26 ± 0.28^{de}
DH0-5	2.67 ± 0.07^{b}
DH6-10	3.89 ± 0.16^{f}
DH11-15	3.49 ± 0.11^{e}
DH16-20	3.44 ± 0.13^{de}
DH>20	3.17 ± 0.19^{cd}

หมายเหตุ: ^{a,b,c}อักษรกำกับที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\leq0.05$

ตารางที่4.14ผลของฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS ที่ร้อยละ 50 (EC_{50}) ของโปรตีน รำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) และโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์(MRBP-F) ที่ระดับ การย่อย(DH) ร้อยละ 0-5, 6-10 และ 11-15

ตัวอย่าง	**EC_{50} (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)**
Trolox	0.34 ± 0.01^{a}
RBP	3.07 ± 0.08^{b}
MRBP	3.26 ± 0.28^{c}
DH0-5	3.27 ± 0.15^{bc}
DH6-10	3.31 ± 0.13^{c}
DH11-15	3.36 ± 0.06^{c}

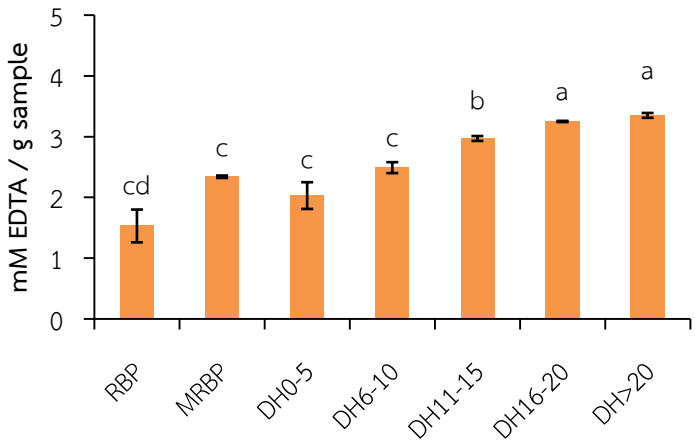
หมายเหตุ: ^{a,b,c}อักษรกำกับที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\leq0.05$

4.6.2ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี Metal ions chelating activity

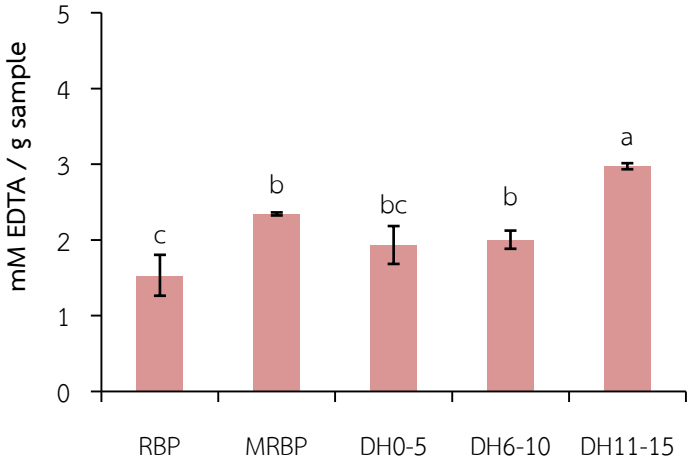
จากผลการวิเคราะห์ค่าความสามารถในการจับโลหะไอออน (Metal ions chelating) ของ MRBP-A และ MRBP-F ที่ระดับการย่อยต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ RBP และ MRBP ดังภาพที่ 4.30 พบว่า MRBP-A ที่ระดับการย่อยร้อยละ0-5 และ 6-10 ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับ RBP และ MRBP ($p \geq 0.05$) แต่เมื่อระดับการย่อยเพิ่มขึ้น ระดับการย่อยร้อยละ 11-15, 16-20 และ >20 ความสามารถในการจับโลหะไอออนได้ดีกว่า RBP MRBP ($p \leq 0.05$) (ภาพที่ 4.30A) ส่วนMRBP-F พบว่าที่ระดับการย่อยร้อยละ 11-15 มีความสามารถในการจับโลหะไอออนสูงสุด เปรียบเทียบกับ RBP MRBP และ MRBP-F ที่ระดับการย่อยร้อยละ 0-5 และ 6-10 ($p \leq 0.05$) (ภาพที่ 4.30B)

จากผลการทดลองสามารถอธิบายได้ว่าโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ระดับการย่อยสูงๆ สามารถทำหน้าที่เป็นสารคีเลตหรือสารอินทรีย์ที่สามารถจับอนุมูลอิสระได้ดี สอดคล้องกับผลการทดลองของการทดลองของ Phongthai et al. (2016) รายงานว่าโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับการย่อยร้อยละ 5.04 มีความสามารถในการจับโลหะไอออนน้อย แต่มีความสามารถในการจับโลหะไอออนได้ดีเมื่อระดับการย่อยเพิ่มขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสกับโปรตีนรำข้าวที่ไม่ผ่านการย่อย พบว่าความสามารถในการจับโลหะไอออนไม่แตกต่างกันทางสถิติและ ลีนา หง้าฝา (2556) พบว่าโปรตีนถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสหรือฟลาโวไซม์ มีความสามารถในการจับโลหะไอออนได้ดีและสูงขึ้นเมื่อระดับการย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้น เนื่องจากโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ทำให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง มีสายเพปไทด์สั้นขึ้น การละลายเพิ่มขึ้น และมีประจุเพิ่มขึ้น ส่งผลให้สายเพปไทด์มีกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เป็น Prooxidantsเพิ่มขึ้น นำไปสู่การลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Zhu et al., 2006)

(A)



(B)

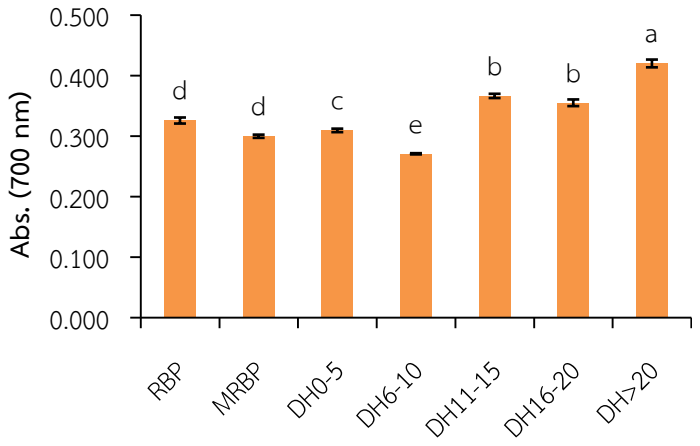


ภาพที่ 4.30ความสามารถในการคีเลตโลหะด้วยวิธี Metal ions chelating activityของ โปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส(MRBP-A) ที่ระดับการย่อย (DH) ร้อยละ0-5, 6-10, 11-15, 16-20 และ >20(ภาพ A) และโปรตีนรำข้าว ดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์(MRBP-F) ที่ระดับการย่อย(DH) ร้อยละ 0-5, 6-10 และ11-15 ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร(ภาพ B)

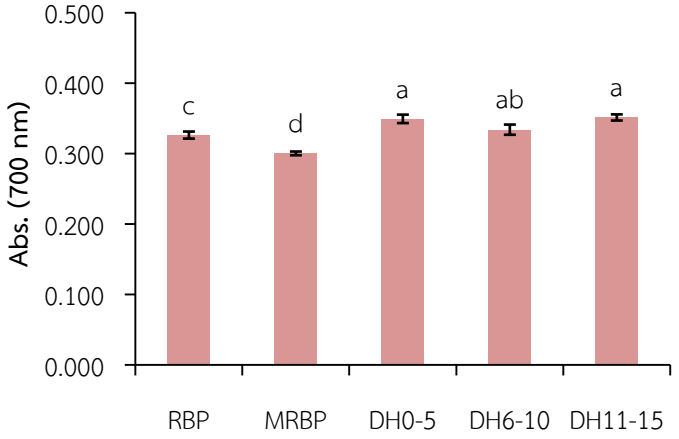
4.6.3ความสามารถในการรีดิวซ์ของโปรตีนรำข้าวด้วยวิธี Reducing power

ผลการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ของ MRBP-A และMRBP-F ที่ระดับการย่อยต่างๆ เปรียบเทียบกับ RBP และ MRBP ดังภาพที่ 4.31 พบว่า MRBP-A ที่ระดับการย่อยมากกว่าร้อยละ 20 มีความสามารถในการรีดิวซ์สูงสุด รองลงมาคือที่ระดับการย่อยร้อยละ 11-15 , 16-20, 0-5 และ 6-10 ตามลำดับ เมื่อ เปรียบเทียบกับ RBP และ MRBP พบว่า MRBP-A ที่ระดับการย่อยร้อยละ 11-15, 16-20 และ 0-5 จะมีค่าสูงกว่า (ภาพที่ 4.31 A)ส่วนความสามารถในการรีดิวซ์ของ MRBP-F พบว่า MRBP-F ทุกระดับการย่อยมีความสามารถในการรีดิวซ์มากกว่า RBP MRBP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ภาพที่ 4.31 B) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี เพราะโดยทั่วไปแล้วความสามารถในการรีดิวซ์เป็นการทดสอบความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารละลายโปรตีน โดยการรีดิวซ์ Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} (Chan et al., 2007) แต่อย่างไรก็ตามความสามารถในการรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับระดับการย่อยของโปรตีน ความสามารถในการละลาย เมื่อโปรตีนมีระดับการย่อยที่สูงส่งผลให้โปรตีนมีขนาดเล็กลง ความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น โปรตีนมีประจุเพิ่มขึ้น รวมถึงมีสายเพปไทด์ที่มีโครงสร้างส่งเสริมให้มีความสามารถในการรีดิวซ์ได้ดี (Ramos and Xiong, 2001) อีกทั้งการย่อยทำให้ได้กรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นประจุลบ (R group) อยู่บนโครงสร้างของโปรตีนเพิ่มมากขึ้น บ่งชี้ถึงความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (Re et al., 1999) จากรายงานการวิจัยของ Castro and Sato. (2015) พบว่าโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.399 แต่โปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.176

(A)



(B)



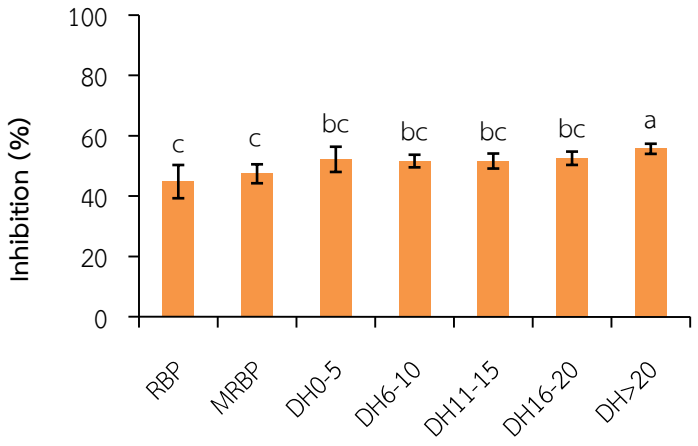
ภาพที่ 4.31ความสามารถในการรีดิวซ์ของโปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ อัลคาเลส(MRBP-A) ที่ระดับการย่อย(DH) ร้อยละ0-5, 6-10, 11-15, 16-20 และ >20(ภาพ A) และโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์(MRBP-F) ที่ระดับการย่อย(DH) ร้อยละ 0-5, 6-10 และ11-15 ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร(ภาพ B)

4.6.4ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ของกรดลิโนเลอิกด้วยวิธี Linoleic acid peroxidation activity

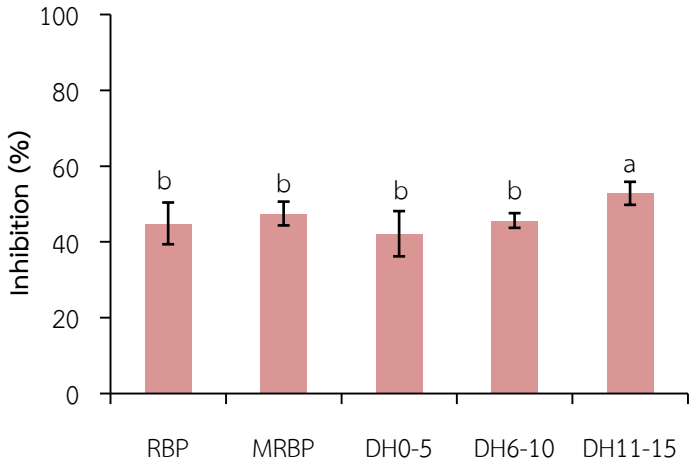
การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกของ MRBP-A และ MRBP-F ที่ระดับการย่อยต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ RBP และ MRBP ดังภาพที่ 4.32 พบว่า MRBP-A ที่ระดับการย่อยมากกว่า 20 มีความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกได้ดีกว่า RBP MRBP และที่ระดับการย่อยอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ภาพ A)

ส่วนความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกของ MRBP-F เปรียบเทียบกับ RBP และ MRBP พบว่า MRBP-F ที่ระดับการย่อยร้อยละ 11-15 มีความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกดีกว่า RBP MRBP และที่ระดับการย่อยอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ภาพ B) เนื่องจากโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์มีกรดอะมิโนกลุ่มไฮโดรโฟบิก(Hydrophobic) เพิ่มขึ้น (Chiue et al., 2003) อีกทั้งยังสอดคล้องกับความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีน ซึ่งพบว่าความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อโปรตีนผ่านการดัดแปลงหรือย่อยด้วยเอนไซม์ เพราะความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกที่เพิ่มขึ้นอาจมีผลมาจากโปรตีนมีความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ที่ดี เช่นเดียวกับการรายงานของ Zhu et al. (2006) พบว่าการดัดแปลงโปรตีนด้วยเอนไซม์ ทำให้โครงสร้างของโปรตีนคลายตัวออก มีค่า Surface hydrophobicity เพิ่มขึ้น และมีความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ ซึ่งส่งผลให้มีความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกเพิ่มขึ้นด้วย

(A)



(B)



ภาพที่ 4.32ความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกด้วยวิธี linoleic acid peroxidation activityของโปรตีนรำข้าว (RBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลง ด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วเอนไซม์ อัลคาเลส(MRBP-A) ที่ระดับการย่อย (DH) ร้อยละ0-5, 6-10, 11-15, 16-20 และ >20(ภาพ A) และโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์(MRBP-F) ที่ระดับการย่อย(DH) ร้อยละ 0-5, 6-10 และ11-15 ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร(ภาพ B)

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การ ดัดแปลงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนรำข้าวด้วยความร้อนร่วมกับ สารละลาย ด่าง (MRBP)พบว่าการมีระดับการย่อย (DH) ของโปรตีนรำข้าวเท่ากับร้อยละ 0.43-1.98 ส่วน การดัดแปลงโปรตีนรำข้าวด้วยเอนไซม์ อัลคาเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.3 ที่ระยะเวลา 0-180 นาที และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 ที่ระยะเวลา 0-12ชั่วโมง พบว่าระดับการย่อยเท่ากับร้อยละ 1.55-21.47 และร้อยละ 1.87-12.08ตามลำดับ

คุณลักษณะโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP)และโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วย เอนไซม์พบว่าค่าสี L* ลดลง แต่มีค่าสี a* และ b* เพิ่มขึ้นในสภาวะ non-reducing ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนรำข้าวเท่ากับ 7- 151 กิโลดาลตันแต่เมื่อ ดัดแปลงด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง (MRBP) พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 8-145 กิโลดาลตัน และเมื่อผ่านการดัดแปลงด้วยเอนไซม์ พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเล็กลงเมื่อระดับการย่อยเพิ่มขึ้น ส่วนสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนรำข้าวดัดแปลง พบว่าสมบัติการละลาย ความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ ความสามารถในการอุ้มน้ำและน้ำมัน และสมบัติการเกิดโฟมดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนรำข้าวไม่ผ่านการดัดแปลง โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์จะมีความสามารถในการจับโลหะไอออน ความสามารถในการรีดิวซ์ และความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกสูงกว่า โปรตีนรำข้าว ไม่ผ่านการดัดแปลงและผ่านการ ด้วยความร้อนร่วมกับสารละลายด่าง โดยที่ โปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับการย่อยร้อยละ 0-5 มีความสามารถในการต้าน อนุมูลอิสระ ABTS ดีที่สุดส่วนโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับการย่อยร้อยละ 20 มีความสามารถในการจับโลหะไอออน ความสามารถในการรีดิวซ์ และความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกดีที่สุด ส่วนโปรตีนรำข้าวดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ระดับการย่อยร้อยละ 11-15 ให้ความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกดีที่สุด

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการตรวจสอบสมบัติการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ในวันที่ 0 ด้วย เพื่อใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบ และควรตรวจสอบการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน เพื่อให้ทราบโครงสร้างที่แน่ชัดของเพปไทด์ที่ผลิตได้

5.2.2ควรนำโปรตีนรำข้าวดัดแปลงมาทดลองใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหาร เพื่อดูสมบัติเชิงหน้าที่และการใช้งานได้จริงของโปรตีนดัดแปลง

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

ขวัญหญิง คุ้มทองหลาง.**การศึกษาการสกัดและสมบัติทางหน้าที่ของโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต:มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2546.

จินตนา สังโสภา.**การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและศักยภาพการเป็นอาหารสุขภาพจากรำข้าวสกัดโดยใช้เอนไซม์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต:มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, 2551.

จารุดา วิเศษสรรโชค.**การใช้เอนไซม์ในการผลิตรำข้าวโปรตีนสูง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2545.

ชัยพฤกษ์ หงส์ลัดดาพร.**รายงานการวิจัยผลการใช้ปลายเดือยทดแทนปลายข้าวในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ**. เลย: มหาวิทยาราชภัฏเลย, 2554.

ปราณี อ่านเปรื่อง.**เอนไซม์ทางอาหาร**. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2547.

ลีนา หง้าฝา.**องค์ประกอบทางเคมี สมบัติเชิงหน้าที่ และการออกฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของโปรตีนไฮโดรไลเสตของถั่วหรั่ง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ , 2556.

วราทิพย์ วงษ์เอี่ยม. **การเสริมคุกกี้แป้งข้าวเจ้าด้วยโปรตีนที่สกัดจากงาดำ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2552.

สังคม สิงหาราช. **การศึกษาผลของปริมาณและชนิดของโปรตีนจากกากงา 3 สายพันธุ์ จากอุบลราชธานีต่อคุณภาพของเส้นสปาเก็ตตีเสริมโปรตีน.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2557.

สุภาวดี ทรัพย์สิริไพบูรณ์. **ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีทางเอ็นไซม์และวิธีทางเคมี**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต :เทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง, 2550.

สาโรช ค้าเจริญ.**อาหารและการให้อาหารสัตว์ไม่เคี้ยวเอื้อง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต :มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2547.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2561). “พืชไร่”, **ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร.** http://www.oae.go.th., 15 มิถุนายน, 2561.

Adebiyi et al. “Purification and characterization of antioxidative peptides derived from rice bran protein hydrolysis”, **International Journal of Food Science and Technology**. 228(1): 553-563; February, 2009.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Adler-Nissen, J.**Enzymatic hydrolysis of food protein**. Elsevier Publishing, pp. 77-363. NewYork, 1986.

Ahmadifard et al. "Comparison the effect of three commercial enzymes for enzymatic hydrolysis of two substrates (rice bran protein concentrate and soy-been protein) with SDS-PAGE", **Journal Food Science Technology**. 53(2): 1279-1284; February, 2016.

Anonymous. (2000). "Novozyme",www.Novozymes.com., 29 August, 2015.

AOAC.**Association of Official Analytical Chemistry**.Official methods of Analysis 15th ed. USA: Washington, DC, 1999.

Bradbury et al. "Methods of separation of the major histological components of rice and characteristization of their protein by amino acid analysis", **Journal of Cereal Chemistry**. 57(2): 133-137, March, 1980.

Cao et al."Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice protein",**Journal of Cereal science**.50(2):184-189; September, 2009.

Castro, R.J.S. and Sato, H.H. "Synergistic actions of proteolytic enzymes for production of soy protein hydrolysates with antioxidant activities: An approach based on enzymes specificities", **Journal of Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 4(4): 694-702; October, 2015.

Chabanon et al. "Hydrolysis of rapseed protein isolates: kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates", **Journal of Process Biochemistry**. 42(10): 1419-1428; October, 2007.

Chan et al."Antioxidant and antibacterial activity of leaves of *Etlingera*species (Zingiberaceae) in Penisular Malaysia", **Journal of Food Chemistry.**104(4): 1586–1593; March, 2007.

Chandi, K.G. and Sogi, S.D."Functional properties of rice bran protein concentrates", **Journal of Food Engineering**. 79(2): 592-597; March, 2007.

Chen et al. "Review: Emulsification properties of soy bean protein", **Journal of Nusantara Bioscience**. 6(2): 196-202;November, 2014.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Chiue et al.“Deamidation-induced fragmentation of maize zein, and its linked reduction in fatty acid-binding capacity as well as antioxidative effect”, **Journal of Food Chemistry**. 58(2): 111-117;May,1997.

Clemente et al.“Protein quality of chickpea (Cicerarietinum L.)protein hydrolysates”, **Journal of Food Chemistry**. 67(3): 269-274; November, 1999.

Damodaran, S.**Food proteins: an overview**. In S. Damodaran and A. Paraf (Eds.), Food proteins and their applications. New York: Marcel Dekker, 1997.

Davis, P.J. and Williams, S.C. “Protein modification by thermal processing”, **Journal of Allergy and Clinical Immunology**.53(2): 102-105;March, 1998.

Dinis et al. “Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salycilate and 5-aminosalycilate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxylradical scavengers”, **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 315(1): 161-169; November, 1994.

Guan et al.“Some functional properties of oat branprotein concentrate modified by trypsin”, **Journal of Food Chemistry**. 101(1): 163-170;January, 2007.

Jamdar et al.“Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate”, **Journal of Food Chemistry**. 121(1): 178-184;July, 2010.

Jiamyangyuen et al. “Extraction of rice bran concentrate and its application in bread Songklanakarin”, **Journal Science of Technology**. 27(1): 55-56;July,2005.

Juliano, B.O**. Rice Chemistry and Technology**. Minnesota: American Association of Cereal Chemists.Inc., 1972.

Juliano B.O. “Polysaccharides proteins and lipids of rice”, **In Rice: Chemistry and Technology.**Arun S. Mujumdar Editors.p 98-141. Minnesota: St. Paul, 1994.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Kaur, M. and Singh, N. "Relationships between various functional, thermal and pasting properties of flours from different Indian black gram (*Phaseolusmungo* L.)cultivars", **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 87(6): 974-984;March,2007.

Kim et al. "Influence of protein concentration and order of addition on the thermal stability of betalactoglobulin stabilized n-hexadecane oil-in-water emultion at neutral pH", **Journal of Langmuir**.21(1): 134-139; January, 2005.

Kohler, G.O. and Palter, R. "Studies on methods for amino acid analysis of wheat products", **Journal of Cereal Chemistry**.44(1): 512-520; March, 1967.

Krochta, J.M., Baidwin, E.A. and Nisperos-Carriedo, M.O.**Edible coating and film improve food quality**. Boca Raton: Iechnomic Publishing Company Inc., 1994.

Laemmli, U.K. "Cleavage of structure protein during the assembly of heat of bacteriophage T4", **Journal of Nature**.227(5259): 680-685; August, 1970.

Lasztity, R. **The Chemistry of Cereal Proteins**. Hungary: Budapest, 1995.

Lawal et al."Functional properties of native and chemically modified protein concentration from bambarra groundnut", **Journal of Food Research International**.40(8): 1003-1011; October, 2007.

Lew et al."A note on protein concentrate from full fat rice bran", **Journal of Cereal Chemistry**. 52(5): 748-750;May, 1975.

Li et al. "Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity", **Journal of Food Science and Technology International**. 11(4): 281–287; August, 2005.

Lin et al."Certain functional properties of sunflower meal products", **Journal of Food Science**.39(2):368–370; March, 1974.

Lugay, J.C. and Juliano, B.O. "Fatty acid composition of rice lipids by gas-liquid chromatography", **Journal of the American Oil Chemists' Society.**41(4): 273-275; April, 1964.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Makayay, R. and Theerakulkait, C. "Effects of production process improvement on quality and functional properties of protein concentrates from defatted rice bran" In **The proceeding of 45th Kasetsart University Annual Conference.**p 215-222, Bangkok: Kasetsart University, 2007.

Mine, Y."Effect of dry heat and mild alkaline treatment on functional properties of egg white proteins", **Journal of Agriculture and Food Chemistry.**45(8): 2924-2928; August, 1997.

Molina et al. "Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7s and 11s globulin", **Journal of Food Hydrocolloid**. 15(3): 263-269; May, 2001.

Onsaard et al. "Comparison of properties of oil-in-water emulsions stabilized by coconut cream proteins with those stabilized by whey protein isolate", **Journal of Food Research International**. 39(1): 78-86;January,2006.

Onsaard, E."Functional properties of sesame protein concentrates from sesame meal", **Asian Journal Food Agro-Industry**. 3(4): 420-431; January, 2010.

Phongthai et al."Optimization of microwave-assisted extraction of rice bran proteinand its hydrolysates properties",**Journal of Cereal Science**. 70: 146-154;June, 2016.

Phongthai et al."Preparation, properties and application of rice bran protein: A review", **International Food Research Journal**. 24(1): 25-34;February, 2017.

Qi, M., Hettiarachchy, N.S. and Kalapathy, U."Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin", **Journal of Food Science**. 62(6): 1110-1115; July, 1997.

Ramos, P. and Xiong, Y.L."Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system", **Journal Dairy Science**. 84(12): 2577-83; December, 2001.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Robinson, H.W. and Hodgen, C.G. "The biuret reaction in the determination ofserum protein I. a study of the condition necessary for the production of the stable colour which bears a quantitative relationship to the protein concentration", **Journal of Biological Chemistry**. 135(10): 707-725; June, 1940.

Saunders, R.M. "The properties of rice bran as a food stuff", **Journal of Cereal food world**.35(7): 632-636;May, 1990.

Sereewatthanawut et al."Extraction of protein and amino acid from deolied rice bran by subcritical water hydrolysis", **Journal of Biosource Technology**. 99(3): 555-561;February, 2008.

Shih, F.F., Champagne, E.T., Daigle, H. and Zarins, Z. "Use of enzyme in the processing of protein products from rice and rice flour", **Molecular Nutrition Food Research**. 43(1): 14-18;February, 1999.

Sosulski, F.W."The centrifuge method for determining flour absorption inhard redspringwheats",**Journal ofCerealChemistry**.39: 344–350;Jury, 1962.

Sumura et al. "Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis",**Journal ofFood Science and Technology**.
38 (3): 255-261;May, 2005.

Tang et al. "Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran: II. The role of amylase, cellulast and vicozyme", **Journal of Food Chemistry and Toxicology**. 68(25): 471-175;November, 2003.

Tavano, O.L. "Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food Biotechnology", **Jour of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 90(1): 1-11; June, 2013.

Thammarathip et al."Identification of peptide molecular weight from rice bran protein hydrplysate with high antioxidant activity", **Journal of Cereal Science**.69: 329-335;May, 2016.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Tomotake et al.“Physicochemical and functional properties of buckwheat protein product”, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50(7): 2125-2129; February,2002.

Tsumura, K., Saito, T., Tsuge, K., Ashida, H., Kugimiya, W. and Inouye, K.“Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis”, **Journal of Food Science and Technology**. 38(3):255-261; May, 2005.

United States Department of Agriculture (USDA).(2018). “Rice”, Grain: World Markets and Trade-USDA Foreign Agricultural Service. https://www.fas.usda.gov, 15th June, 2018.

Wang, M., Hettiarachchy, N.S., Qi, M., Burks, W. and Siebenmorgen, T.“Preparation and Functional properties of rice bran protein isolate”, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 47(2): 411-416;December, 1999.

Yeom et al. “Production and physicochemical properties of rice bran protein isolates prepared withautoclaving and enzyme hydrolysis”, **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**. 53(1): 62-70; February, 2010.

Yildirim et al.“Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex cripus* L. extracts”, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 49(8): 4083-4089;August, 2001.

You et al.“Effect of degree of hydrolysis on the antoxidant activity of loach (Misgumusanguillicaudatus) protein hydrolysates”, **Innovative Food Science and Emerging Technology**. 10(2): 235-240; April, 2009.

Yust et al.“Improvement of functional properties of chickpea protein by hydrolysis with immobilized alcalase”, **Journal of Food Chamistry**. 122(4): 1212-1217; October, 2010.

Zhanget al.“Preparation and functional properties of rice bran protein from heat-stabilized defatted rice bran”, **Journal of Food Research International**. 47(2): 359-363; July, 2012.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Zhang et al.“Antioxidant activities of the fractionated protein hydrolysates from heat stable defatted rice bran”, **Journal of Food Science and Technology**. 49(5): 1330-1336; May, 2014.

Zhao et al.“Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate”, **Journal of Food Chemistry**. 127(4): 1438-1443; August, 2011.

Zhao et al. “Enhancing the oxidative stability of food emulsion with rice dreg protein hydrolysate”, **Journal of Food Research International**. 48(2): 876-884; October, 2012.

Zhu et al. “Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase”, **Journal of Process Biochemistry**. 41(6): 1296-1302**;** June**,**2006.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การวิเคราะห์ทางด้านคุณลักษณะของโปรตีน

1. การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ดัดแปลงจาก Laemmli, 1970)

2.1 วัสดุอุปกรณ์

2.1.1 เครื่องMiniprotein 3 cells

2.1.2 Auto pipette

2.2 สารเคมี

2.2.1Acrylamide/bisacrylamide (30%T, 2.67%C)

เตรียมโดยชั่ง acrylamide 29.2 กรัม และ bisacrylamide 0.8 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °ซ สามารถเก็บสารละลายไว้ใช้ได้ 1 เดือนหลังจากการเตรียม

2.2.2 1.5 M Tris-HCl pH 8.8

ชั่ง Tris-base 18.15 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร แล้วปรับพีเอชเป็น 8.8 ด้วย 1 MHClจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

2.2.3 0.5 M Tris-HCl pH 6.8

ชั่ง Tris-base 6.06 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร แล้วปรับพีเอชเป็น 6.8 ด้วย 1 MHClจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

2.2.410% SDS

ชั่ง SDS 10 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2.2.5Stock sample buffer (10 มิลลิลิตร)

2.2.5.1 Reducing agent

- น้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร
- 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 1.25 มิลลิลิตร
- Glycerol 2 มิลลิลิตร
- 10% SDS 2 มิลลิลิตร
- 2-β-mercaptoethanol 0.5 มิลลิลิตร
- 0.2% (w/v) bromophenol blue 0.25 มิลลิลิตร

2.2.5.2 Non-reducing agent

- น้ำกลั่น 4.5 มิลลิลิตร
- 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 1.25 มิลลิลิตร
- Glycerol 2 มิลลิลิตร
- 10% SDS 2 มิลลิลิตร

- 0.2% (w/v) bromophenol blue 0.25 มิลลิลิตร

2.2.6Electrode (running) buffer pH 8.3

- Tris base 9 กรัม
- Glycine 43.2 กรัม
- SDS 3 กรัม

ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 3,000 มิลลิลิตร (พีเอช 8.3) และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

2.2.7Catalyst

2.2.7.1 10% Ammonium persulphate (APS) เตรียมก่อนที่จะใช้

2.2.7.2 TEMED (N,N,N, N-tetramethylethylenediamine) สามารถใช้ได้เลยโดยไม่ต้องเจือจาง

2.2.8 Protein Marker

โปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล 5-245 KDaยี่ห้อ BLUelfPrestained Ladder

2.2.9สีย้อมแถบโปรตีน (Staining)

เตรียมโดยชั่งCoomassiebrillian blue R-250 ปริมาณ 0.3 กรัม (0.3% w/v) จากนั้นละลายใน methanol ปริมาตร 45 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดแล้วกรอง จากนั้นเติม Glacial Acetic acid ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร

2.2.10 สารละลายสำหรับล้างสีย้อมแถบโปรตีน (Destaining)

1) Destaining solution 1 เตรียมโดยผสมเอธานอล 250 มิลลิลิตร กรดอะซิติก37.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 212.5 มิลลิลิตร

2) Destaining solution 2 เตรียมโดยผสมเอธานอล25 มิลลิลิตร กรดอะซิติก37.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 437.5 มิลลิลิตร

2.2.11การเตรียม Separating Gel ดังตารางที่ ก.1

ตารางที่ ก.1 ส่วนประกอบของเจลสำหรับ SDS-PAGE

ส่วนประกอบของเจล	Stacking gel 4%	Running gel 10%
30% Acrylamide, 0.8 bis acrylamide (mL)	0.665	3.333
1.5 M Tris-HCl pH 8.8 (mL)	-	2.5
0.5 M Tris-HCl pH 6.8 (mL)	1.25	-
10% SDS (µL)	50	100
Distillate water (mL)	3	4.012
10% Ammonium persulphate (µL)	35	50
TEMED (µL)	3	5
Total volume (mL)	5.00	9.997

2.3 วิธีการทดลอง

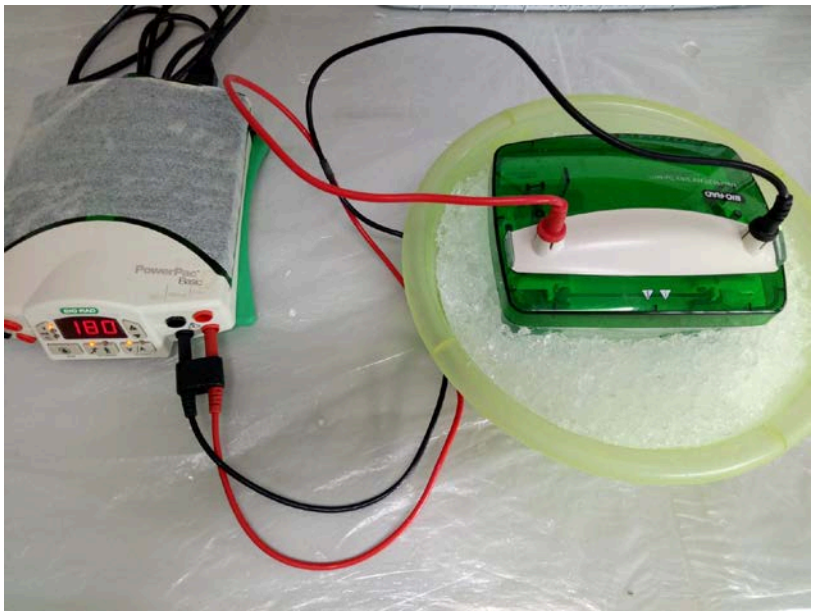
2.3.1การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างโปรตีน 1 กรัม ผสมกับ 5 % SDS 9 มิลลิลิตร จากนั้นโฮโมจิไนส์ 1 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 85 °ซเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารละลายมาเหวี่ยงแยก 8000 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีไบยูเรท ก่อนนำไปใช้นำส่วนใสที่ได้มาผสมกับ sample buffer ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการต้มสารผสมเป็นเวลา 3 นาที ที่ 95 °ซ

2.3.2 เตรียม Running gel และ Stacking gel จากตารางที่ ก.1

2.3.3 การแยกโปรตีนโดยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสทำการประกอบชุดเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส จากนั้นเติม electrod buffer ให้เต็ม chamber จากนั้น load ตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 1 จำนวน 10 ไมโครลิตร ต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสเข้ากับ power supply เปิดกระแสไฟฟ้า 180 โวลล์ จนสีของโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่จนเกือบสุดปลายกระจก จึงหยุดการให้กระแสไฟฟ้า (ประมาณ 1 ชั่วโมง)

2.3.4 ทำการย้อมสีโปรตีนในเจล โดยย้อมในStaining solution นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างโดยแช่ในDestaining solution 1 นาน 30 นาที แล้วแช่ด้วย Destaining solution 2นาน 2 ชั่วโมง



ภาพที่ ก.1 การแยกโปรตีนโดย Gel electrophoresis

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ทางเคมี

2.การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น (ดัดแปลงจาก A.O.A.C.,1999)

2.1 วัสดุอุปกรณ์

2.1.1 ภาชนะอะลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น

2.1.2 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

2.1.3โถดูดความชื้น (desiccator)

2.1.4 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

2.2 วิธีทดลอง

2.2.1อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 °ซ นาน 2-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนัก

2.2.2กระทำเช่นข้อ 1 ซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

2.2.3 ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนอย่างละเอียด 1-2 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว

2.2.4 นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องสาเซลเซียส นาน 4-5 ชั่วโมง

2.2.5 นำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนัก จากนั้นนำเข้าตู้อบและกระทำซ้ำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น} \quad (\%) = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักก่อนอบและหลังอบ}(\text{กรัมน้ำ})}{(\text{กรัม})\text{หนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

3. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน(ดัดแปลงจาก A.O.A.C.,1999)

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 ขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีน (Kjeldahl Apparatus)

3.1.2เครื่องย่อย (Digestion Apparatus)

3.1.3เครื่องกลั่น (Distallation)

3.1.4 ขาตั้งและบิวเรตสำหรับไทเทรตสารละลาย

3.1.5 ขวดรูปชมพู่ขนาด (Erlenmeyer flask) 250 มิลลิลิตร

3.1.6 กระบอกตวงขนาด 25 100 และ 500 มิลลิลิตร

3.1.7 น้ำกลั่น

3.1.8บีกเกอร์

3.1.9Glass bead or boiling chip

3.1.10เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.2 สารเคมี

3.2.1Conc. HCL

3.2.2 Mix Catalyst (สารผสมระหว่าง copper sulfate: potassium sulfate อัตราส่วน 1:10)

3.2.3 Sodium hydroxide เข้มข้นร้อยละ 40 โดยใช้ Sodium hydroxide 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.2.4Hydrochloric เข้มข้น 0.1 N

3.2.5 Boric acid เข้มข้นร้อยละ 4

3.2.6Indicator เตรียมโดยใช้ (mixed indicator : methylred 0.1 กรัม : bromocresol green 0.1 กรัม ใน ethanol 100 ml)

3.3 วิธีทดลอง

3.3.1 ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 0.5-1 กรัม ใส่ลงใน Kjeldalh flask เติม Mix Catalyst ประมาณ 5 กรัม

<u>การย่อย (Digestion)</u>

3.3.2 เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาณ 25 มิลลิลิตร

3.3.3ย่อยบน heating mantle โดยให้ความร้อนอ่อนๆ จนกระทั่งหมดฟอง แล้วค่อยเพิ่มความร้อนอุณหภูมิ 400 °ซ จนกระทั่งสารละลานใสทิ้งไว้ให้เย็น

<u>การกลั่น (Distillation)</u>

3.3.4เติมน้ำกลั่นลงในหลอดย่อย 400 มิลลิลิตร และเติม 40%NaOH 80 มิลลิลิตร นำหลอดย่อยมาต่อเข้ากับเครื่องกลั่น

3.3.5 นำขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มี 4% boric acid อยู่ 75 มิลลิลิตร และเติมอินดิเคเตอร์เรียบร้อยแล้วมารองรับสารละลานที่กลั่นได้

3.3.6 กลั่นจนได้สารละลาย 300 มิลลิลิตร

3.3.7 ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วย 0.1N HClจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพู

3.3.8 ทำ blank ตามข้อ 1-7 โดยไม่ต้องใส่ตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \frac{(A-B)\text{x } 0.014 \text{ x N x } 100}{W}$$

ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ) = % Nitrogen x F

เมื่อ A คือ ปริมาตรของ HClที่ใช้ไทเทรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
B คือ ปริมาตรของ HClที่ใช้ไทเทรตกับ blank (มิลลิลิตร)
N คือ ความเข้มข้นของ HCl (โมลาร์)
W คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)
F คือ ค่าแฟคเตอร์

4. การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (ดัดแปลงจาก A.O.A.C.,1999)

4.1 วัสดุอุปกรณ์

4.1.1Soxhletapparatut
4.1.2หลอดใส่ตัวอย่าง (extraction thimble)
4.1.3 สำลี
4.1.4 ตู้อบลมร้อน
4.1.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
4.1.6 โถดูดความชื้น

4.2 สารเคมี

4.2.1 ปิโตรเลียม อีเทอร์ หรือเฮกเซน

4.3 วิธีทดลอง

4.3.1 อบขวดกลมสำหรับหาปริมาณไขมันในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 105 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

4.3.2 ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 3-5 กรัม ห่อให้มิดชิดใส่ลงในหลอดใส่ตัวอย่าง ปิดด้วยสำลี

4.3.3 นำหลอดตัวอย่างใส่ใน Soxhletเติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียม อีเทอร์ ลงในขวดกลมปริมาตร 60 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตา

4.3.4 ประกอบชุดกลั่นไขมัน พร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่น และเปิดสวิทซ์ให้ความร้อน โดยปรับความร้อนให้เกิดการกลั่นตัวของสารละลายปิโตรเลียม อีเทอร์ 5-6 หยดต่อนาที ใช้เวลาในการสกัดประมาณ 6 ชั่วโมง

4.3.5 หลังจากสกัดเสร็จ ปรับเครื่องไปที่ปุ่ม recovery เพื่อให้ปิโตรเลียม อีเทอร์ เหลือ 2-3 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 103-105 °ซ นาน 6 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันหลังอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

5. การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า (ดัดแปลงจาก A.O.A.C.,1999)

5.1 วัสดุอุปกรณ์

5.1.1Crucible

5.1.2 Muffle furnace (เตาเผา)

5.1.3 Hot plate

5.1.4โถดูดความชื้น

5.1.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

5.2 วิธีทดลอง

5.2.1 เผาถ้วยกระเบื้องในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 °ซ นาน 3 ชั่วโมง นำออกจากเตาเผาเก็บไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน บันทึกผล

5.2.2 ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 2-5 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว

5.2.3 นำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 °ซ จนกระทั่งได้เถ้าสีขาว อาจใช้เวลา 5-6 ชั่วโมง นำออกจากเตาเผา เก็บในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง บันทึกผลที่แน่นอน

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

6. การวิเคราะห์หาปริมาณเยื่อใย(ดัดแปลงจาก A.O.A.C.,1999)

6.1 วัสดุอุปกรณ์

6.1.1 อุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยและชุดกรองเยื่อใย

6.1.2Crucible

6.1.3 Hot air oven

6.1.4 Muffle furnace

6.1.5โถดูดความชื้น

6.1.6Balance

6.1.7 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

6.2 สารเคมี

6.2.1 1.25% H_2SO_4

6.2.2 1.25% NaOH

6.2.3 95% Ethanol

6.3 วิธีทดลอง

6.3.1 ใส่ตัวอย่างที่ชั่งน้ำหนักแน่นอนประมาณ 2 กรัม ใส่ในกระบอกแก้วสำหรับต้มย่อย เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 1.25 ที่ผ่านการต้ม 150 มิลลิลิตร ลงในกระบอกแก้ว นำไปต้มในเครื่องย่อยหาเยื่อใยที่เปิดน้ำผ่านระบบควบแน่นนาน 30 นาที

6.3.2 กรองตัวอย่างผ่านผ้าลินิน โดยใช้ชุดกรอง ประกอบด้วย butcher funnel, filtering flask และ suction pump ล้างเยื่อใยด้วยน้ำร้อนจนหมดความเป็นกรด

6.3.3 นำกากที่ได้จากการกรองใส่ในกระบอกแก้วใบเดิม เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 1.25 ที่ผ่านการต้มเดือด 150 มิลลิลิตร ต้มในเครื่องย่อย 30 นาที

6.3.4 กรองตัวอย่างผ่านผ้าลินินเช่นเดียวกับข้อ 2 ล้างตัวอย่างด้วยน้ำร้อนจนหมดความเป็นด่างและกรด และล้างด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 2 ครั้ง ครั้งละประมาณ 10 มิลลิลิตร แล้วขูดกากใส่ในถ้วยกระเบื้อง (crucible) ที่อบและทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว

6.3.5 นำ crucible อบที่ 103-105 องสาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในโถความชื้น อบซ้ำอีก 30 นาที จนกระทั่งได้น้ำหนักสองครั้งต่างกันไม่เกิน 1-3 มิลลิลิตร

6.3.6 นำ crucible ไปเผาพร้อมกากที่อบแห้งในเตาเผาอุณหภูมิ 550 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำอีก 30 นาที จนได้น้ำหนักที่แน่นอน

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเยื่อใย (\%)} = \frac{\text{ผลต่างของนน.ตัวอย่างหลังอบและหลังเผา (กรัมน้ำ)}}{\text{หนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

7. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรต (ดัดแปลงจาก Robinson and Hodgen, 1940)

7.1 วัสดุอุปกรณ์

7.1.1หลอดทดลอง

7.1.2 เครื่องผสม (Vortex mixer)

7.1.3 Spectrophotometer และ cuvette

7.1.4 Auto pipette

7.2 สารเคมี

7.2.1 สารละลายไบยูเรต(Biuret regent)

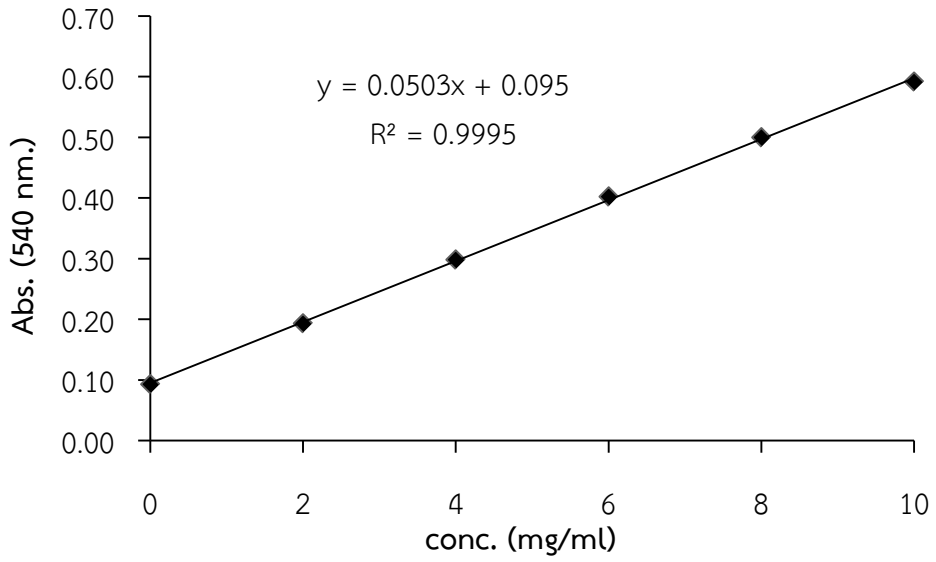
เตรียมโดยชั่ง $CuSO_4.5H_2O$ มา 1.5 กรัม และ $NaKC_4H_4O_6.4H_2O$ 6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร กวนจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลาย 10% NaOH 300 มิลลิลิตรในขณะกวน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

7.2.2 สารมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่ง BSA มา 0.01 กรัม จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 10 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใส่หลอดทดลองดังตารางที่ ข.1

ตารางที่ ข.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

Conc. (mg/mL)	BSA (µL)	น้ำกลั่น (µL)	สารละลายไบยูเรต(mL)
0	0	500	2
2	100	400	2
4	200	300	2
6	300	200	2
8	400	100	2
10	500	0	2



ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA)

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างโปรตีนรำข้าว 0.5 กรัมแล้วเติม 5 mM phosphate buffered saline ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างไปกวนเป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการแยกเอาส่วนใสมาวิเคราะห์ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที หรือกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ไบยูเรทเพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีน

8. ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity ดัดแปลงจากวิธี Thamnarathip et al. (2016) และ Re et al. (1999)

8.1 การเตรียมสารละลาย

8.1.1 เตรียม 7 mM ABTS ชั่ง ABTS 1.8012 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

8.1.2 เตรียม 2.45 mM Potassium persulphateชั่งโพแทสเซียมซัลเฟส 0.3312 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

8.1.3 การเตรียม 5mM Phosphate buffered saline (pH 7.4) ทำโดยชั่ง

-5 mM $Na_2HPO_4.7H_2O$ มา 0.7098 กรัม

-5 mM KH_2PO_4มา 0.6804 กรัม

-137 mMNaClมา 8.0008 กรัม

-2.7 mMKClมา 0.2013 กรัม

จากนั้นเติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตรแล้วกวนจนกว่าจะละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับ pH ด้วย HClให้ได้ pH 7.4 ค่อยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั้นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

8.1.4 เตรียมสารละลาย $ABTS^+$ ทำการผสม 7 mM ABTS กับ 2.45 mM Potassium persulphate ในอัตราส่วน 1 :0.5 ในขวดสีชาบ่มในที่มืด 12-16 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ จากนั้นดูดสารละลายที่ผสมมาเจือจางด้วย 5 mMPhosphate buffered saline (pH 7.4) แล้วนำไปวัดค่า Abs. ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง 0.7±0.02

8.1.5เตรียมTrolox(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) โดยการชั่ง Troloxมา 0.05กรัม ละลายด้วยสารละลาย 80% ethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วย 80% ethanol ให้ได้ 50 มิลลิลิตรแล้วทำการเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0-0.6 mg/ml

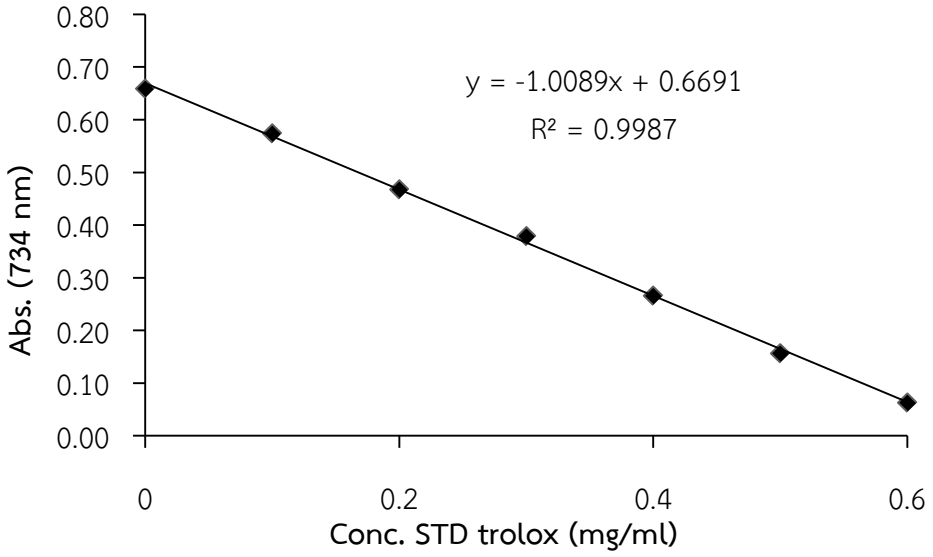
8.2 วิธีวิเคราะห์

8.2.1ปิเปตสารละลายตัวอย่างโปรตีน (0-8 mg/ml) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (Blank :ใช้ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง) ลงในหลอดทดลองที่หุ้มด้วยฟอยด์

8.2.2 เติมสารละลาย $ABTS^+$ ที่เจือจางแล้วปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 6 นาที

8.2.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตรบันทึกค่า ทำการเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Troloxและคำนวณค่าการยับยั้ง (% inhibition $ABTS^+$) ได้จากสมการ

$$\% \text{ inhibition } ABTS^+ = [(Abs._{control} - Abs._{sample})/Abs._{control}] \times 100$$



ภาพที่ ค.1 กราฟมาตรฐาน Trolox (mg/ml)

9.ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี Metal ions chelating activity ตามวิธีของ Phongthai et al. (2016)

9.1 การเตรียมสารละลาย

9.1.1 2 mMFerrous chloride ($FeCl_2$) โดยชั่ง Ferrous chloride 0.0254 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

9.1.2 5 mMFerrozineโดยชั่ง Ferrozine 0.2462 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

9.1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐาน 1 mM EDTA โดยชั่ง EDTA 0.029 กรัม ละลายด้วย 80% Ethanal ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้นในช่วง 0-0.1 mM

9.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

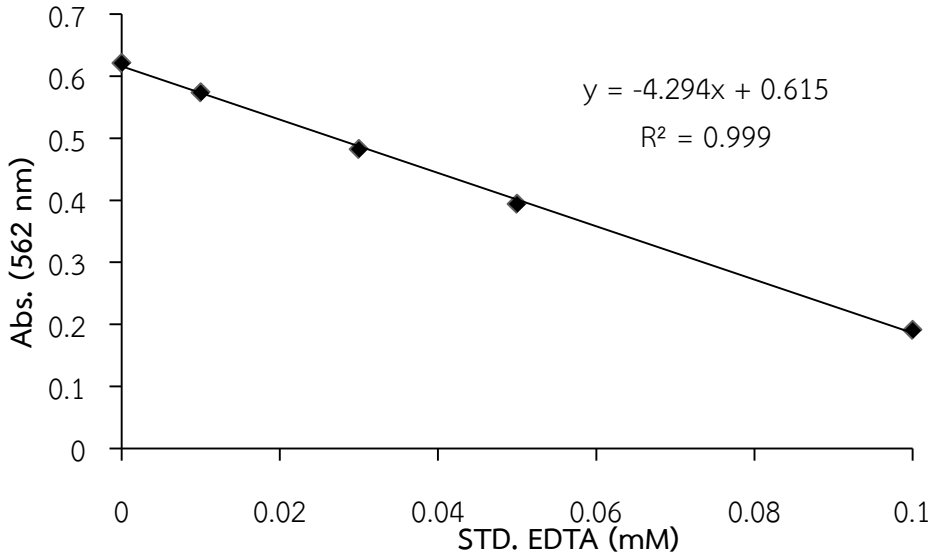
9.2.1 นำตัวอย่างโปรตีนที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (Blank : ใช้น้ำกลั่น)

9.2.2เติมน้ำกลั่น 3.7 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

9.2.3 เติมสารละลาย 2 mM Ferrous chloride ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

9.2.4 เติมสารละลาย 5 mMFerrozineปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน

9.2.5 วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร บันทึกค่า ทำการเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน 1 mM EDTA



ภาพที่ ค.2 กราฟมาตรฐาน EDTA (mM)

10. ความสามารถในการรีดิวซ์(Reducing power)ตามวิธีของCastro and Sato (2015) และ Yildirim et al. (2001)

10.1 การเตรียมสารละลาย

10.1.10.2 M Phosphate buffer (pH 6.6)

-NaH_2PO_4 ชั่งมา 23.996 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

-Na_2HPO_4ชั่งมา 28.392 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

จากนั้นนำสารละลายทั้งสองมาผสมกันให้ได้ค่า pH เท่ากับ 6.6

10.1.2 1% Potassium ferricyanideโดยชั่ง $C_6N_6FeK_3$มา 1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

10.1.3 10% TCA โดยชั่ง TCA มา 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

10.1.40.1% Ferric chloride ($FeCl_3$) โดยชั่ง Ferric chloride 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

10.2 วิธีการวิเคราะห์

10.2.1นำตัวอย่างโปรตีนที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

10.2.2 เติม 0.2 M Phosphate buffer (pH 6.6) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร

10.2.3 เติม 1% Potassium ferricyanide (K_3Fe $(CN)_6$) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร

10.2.4 ผสมให้เข้ากัน

10.2.5 แล้วนำไปบ่มที่ 50 °ซ เป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด

10.2.6 เติม 10% TCA ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 x g นาน 10 นาที

10.2.7 ใช้สารละลายส่วนใส 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย 0.1% ferric chloride ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร

ผลการทดลองแสดงในรูปของการดูดกลืนแสงโดยพิจารณาว่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับกำลังลดกำลัง

11. ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (Linoleic acid autoxidation)ตามวิธีของCastro and Sato (2015)

11.1 การเตรียมสารละลาย

11.1.150 mM Phosphate buffer (pH 7)

-NaH_2PO_4ชั่งมา 5.999 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

-Na_2HPO_4ชั่งมา 7.098 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

จากนั้นนำสารละลายทั้งสองมาผสมกันให้ได้ค่า pH เท่ากับ 7

11.1.2 Linoleic acid

11.1.3 99.5% Ethanol

11.1.4 75% Ethanol

11.1.5 30% Ammonium thiocynateชั่ง Ammonium thiocynate15 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 50 มิลลิลิตร

11.1.6 20 mMFerrous chloride (FeCl2) โดยชั่ง Ferric chloride 0.2535 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

11.2 วิธีการวิเคราะห์

11.2.1เจือจางตัวอย่างโปรตีนให้ได้ 2 mg/ml โดยใช้ 50 mM Phosphate buffer (pH 7) ในการเจือจางให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อละลายตัวอย่าง (Blank: ใช้น้ำกลั่น)

11.2.2 เติมสารละลาย Linoleic acid ปริมาตร 130 ไมโครลิตร

11.2.3 เติมเอทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 25 มิลลิลิตร

11.2.4 ผสมให้เข้ากันปิดฝา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในที่มืด

11.2.5 จากนั้นนำมาวิเคราะห์ระดับการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธี Ferric thiocyanateโดยการดูดสารละลายตัวอย่างมา 0.1 มิลลิลิตร

11.2.6 เติม 75% Ethanol ปริมาตร 4.7 มิลลิลิตร

11.2.7 เติม 30% Ammonium thiocyanateปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

11.2.8 เติม 20mM Ferrous chloride ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

11.2.9ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร บันทึกค่า และคำนวณค่ากิจกรรมในหน่วยร้อยละ (%)

Inhibition (%) = [(Abs.blank-Abs.sample)/Abs.blank] x 100

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวรจนา นพตะนา

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ปีการศึกษา 2558

ประวัติการทำงาน เป็นผู้ช่วยวิจัย 4 โครงการ ได้แก่ 1) โครงการวิจัยเรื่องการพัฒนากรรมวิธีการผลิตซอสงาจากกากงาโดยใช้กระบวนการหมักปี 2558-2560. 2) โครงการวิจัยเรื่อง พัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำผลไม้ผสมสมุนไพรสควอชเพื่อสุขภาพปี 2558. 3) โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาผลิตภัณฑ์พาสตางาดำปี 2560 และ 4) โครงการวิจัยเรื่อง การผลิตและการตลาดสำหรับผลิตภัณฑ์พาสตาปราศจากกลูเตนจากแป้งข้าวเม่าปี 2561

ผลงานทางวิชาการ “Modification of Emulsifying Properties of Soybean Protein by Heat and Alkaline Treatment” ในงาน The 20th World Congress on Clinical Nutrition. December 14-16, Bangkok, Thailand. RodjanaNoptana and EkasitOnsaard.Enhanced Physical Stability of Rice Bran Oil-in-Water Emulsion by Heat and Alkaline Treated Proteins from Rice Bran and Soybean. J. Science & Technology Asia, 2018; 23:1.