การผลิตและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อเมล็ดข้าว

PRODUCTION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PROTEIN HYDROLYSATE FROM RICE SEED KERNEL

สุภาวดี แก้วโภคา และจันทกานต์ นุชสุข*

Supawadee Kaewphokha and Chanthakan Nuchsuk*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตและศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อเมล็ดข้าว 4 พันธุ์ ได้แก่ อยุธยา 1 สุพรรณบุรี 1 ปทุมธานี 1 และกข 29 การสกัดโปรตีนหยาบทำได้โดยแช่เนื้อเมล็ดข้าวในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และวิเคราะห์ด้วยวิธีลาวรีพบว่าสารสกัดโปรตีนหยาบจากเนื้อเมล็ดข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 มีร้อยละผลผลิตและปริมาณโปรตีนสูงที่สุด (8.01 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ และ 6.92 ± 0.02 กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ) จากนั้นวิเคราะห์รูปแบบและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบโดยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่ามีรูปแบบแตกต่างกันเล็กน้อยและมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 19.3-102.1 กิโลดาลตัน การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตทำได้โดยย่อยสลายสารสกัดโปรตีนหยาบจากเนื้อเมล็ดข้าวด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง และทดสอบการต้านออกซิเดชันด้วยเทคนิค DPPH พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตมีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัดโปรตีนหยาบจากเนื้อเมล็ดข้าวทุกพันธุ์

คำสำคัญ: เนื้อเมล็ดข้าว โปรตีนไฮโดรไลเสต ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา อำเภอพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา 13000

Faculty of Science and Technology, Phranakhon Si Ayutthaya Rajabhat University, Phra Nakhon Si Ayutthaya District, Phra Nakhon Si Ayutthaya Province 13000

*corresponding author e-mail: pui.chanthakan@gmail.com

Received: 10 July 2021; Revised: 31 October 2021; Accepted: 3 November 2021

DOI: https://doi.org/10.14456/lsej.2021.18

Abstract

The purposes of this research were to produce and study the antioxidant activity of protein hydrolysate from seed kernel of four rice cultivars: Ayutthaya 1, Suphanburi 1, Pathum Thani 1 and RD 29. To obtain crude protein extract, rice seed kernel was soaked in 0.2 % sodium hydroxide (NaOH) and protein content was determined according to the Lowry method. The results showed that crude protein extract from seed kernel of Pathum Thani 1 had the highest percent yield (8.01 ± 0.08 %) and the highest amount of crude protein (6.92 ± 0.02 g/100 g sample). The protein types and patterns were analyzed by SDS-PAGE technique. Electrophoretic patterns of the extracted proteins have shown a slight difference in the patterns of proteins with molecular weight between 19.3 – 102.1 kDa. The production of protein hydrolysate was prepared by hydrolysis of crude protein extract with 4 M HCl at 100°C for 6 h and antioxidant activity was analysis by DPPH method. Th results showed protein hydrolysate had higher scavenging activity than crude protein extract for all cultivars.

Keywords: Rice seed kernel, Protein hydrolysate, Antioxidant activity

บทนำ

ข้าวเป็นธัญพืช วงศ์หญ้า (Family: Grammineae หรือ Poaceae) ในสกุลออไรซา (Genus: Oryza) ประชากรของโลกมากกว่าครึ่งบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก โดยเฉพาะชาวเอเชียบริโภคมากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (Naivikul, 2013) สำหรับประเทศไทยมีการปลูกข้าวทั่วประเทศ โดยภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ทำนามากที่สุด พันธุ์ข้าวเจ้าที่นิยมปลูก เช่น พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ลักษณะเด่น คือ เมล็ดข้าวสารใส ยาวเรียว สีขาวสวยและมีกลิ่นหอม พันธุ์ปทุมธานี 1 หรือข้าวหอมปทุม ลักษณะเด่น คือ มีกลิ่นหอม คุณภาพข้าวสุกเหมือนขาวดอกมะลิ 105 พันธุ์สุพรรณบุรี 1 ลักษณะเด่น คือ ค่อนข้างต้านทานโรคเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และอากาศเย็น และพันธุ์ กข 29 หรือชัยนาท 80 ลักษณะเด่น คือ ผลผลิตสูง (ประมาณ 876 กิโลกรัมต่อไร่) ปริมาณธาตุเหล็กสูง (Rice Department, 2018) เป็นต้น

องค์ประกอบทางเคมีของข้าวมีผลมาจากพันธุ์ สภาวะการปลูก การเก็บเกี่ยวและกระบวนการแปรรูปจากข้าวเปลือกเป็นข้าวกล้องและข้าวสาร การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยทั่วไปใช้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (proximate analysis) โปรตีนเป็นองค์ประกอบทางเคมีที่มีปริมาณมากเป็นอันดับสองรองจากคาร์โบไฮเดรตหรือสตาร์ช โดยข้าวเปลือกจะมีโปรตีนประมาณ 5.8-7.7 กรัม/100 กรัม เมื่อกะเทาะเปลือกออกได้เป็นข้าวกล้องมีโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็น 7.1-8.3 กรัม/100 กรัม ส่วนข้าวสารซึ่งได้จากการขัดขาวมีปริมาณโปรตีนลดลงเหลือ

6.3-7.1 กรัม/100 กรัม เมื่อเทียบกับข้าวกล้อง เนื่องจากส่วนของเยื่อหุ้มผล เยื่อหุ้มเมล็ด นิวเซลลัส (nucellus) เยื่อชั้นแอลิวโรน (aleurone) รวมทั้งคัพภะ (embryo) หรือจมูกข้าว (germ) ซึ่งเป็นบริเวณที่พบโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ได้หลุดออกไป (Naivikul, 2013)

โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักของข้าวมี 4 ชนิด ได้แก่ อัลบูมิน (albumin) (ละลายน้ำ) กลอบูลิน (globulin) (ละลายในน้ำเกลือ) กลูเตลิน (glutelin) (ละลายในกรดหรือเบส) และโพรลามิน (prolamin) (ละลายในแอลกอฮอล์) โดยมีสัดส่วนที่แตกต่างกัน ดังนี้ ข้าวกล้องมี 5-10 7-17 75-81 และ 3-6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ข้าวขาว 4-6 6-13 79-83 และ 2-7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และรำข้าวมี 24-43 13-36 22-45 และ 1-5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Amagliani et al., 2017)

โปรตีนไฮโดรไลเสต (protein hydrolysate) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนที่บริเวณพันธะเพปไทด์ (peptide bond) เพื่อให้ได้กรดอะมิโนอิสระและเพปไทด์สายสั้นที่มีขนาดและน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน เป็นการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ เช่น การละลาย การเป็นอิมัลซิไฟเออร์ การเกิดโฟม และการอุ้มน้ำ เป็นต้น (Peighambardoust et al., 2021) เพื่อนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้อย่างหลากหลายเพิ่มมากขึ้น โปรตีนไฮโดรไลเสตจากธัญพืชนิยมนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เบเกอรีและเครื่องดื่ม เนื่องจากมีราคาไม่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนสัตว์ (Duangmal & Sritongtae, 2014) การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยวิธีการทางเคมีแบ่งเป็น (1) การย่อยสลายด้วยกรด (acid hydrolysis) (2) การย่อยสลายด้วยเบส (base/alkali hydrolysis) และ (3) การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) โดยวิธีการย่อยสลายด้วยสารเคมีมีราคาถูก ย่อยสลายโปรตีนได้รวดเร็ว แต่มีข้อเสียคือ ควบคุมระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) ได้ยาก กรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophan) ถูกทำลายและเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโนจากชนิดแอล (L-form) ไปเป็นชนิดดี (D-form) ซึ่งร่างกายมนุษย์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ส่วนการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์สามารถควบคุมระดับการย่อยสลายได้ แต่มีราคาแพงกว่าวิธีการย่อยสลายโปรตีนด้วยสารเคมี (Julmanlik & Kongruang, 2019)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตและศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อเมล็ดข้าว 4 พันธุ์ ได้แก่ ปทุมธานี 1 อยุธยา 1 สุพรรณบุรี 1 และกข 29 ซึ่งได้รับการส่งเสริมให้มีการปลูกในเขตจังหวัดพระนครศรีอยุธยา เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างข้าวที่ใช้ในงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์ข้าวเปลือกพันธุ์ปทุมธานี 1 อยุธยา 1 สุพรรณบุรี 1 และ กข 29 จากศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ซึ่งได้ทำการสีกะเทาะเปลือกออกเพื่อนำส่วนเนื้อเมล็ดข้าว (ข้าวขาว) มาใช้ในงานวิจัยดังภาพที่ 1 (Figure 1)

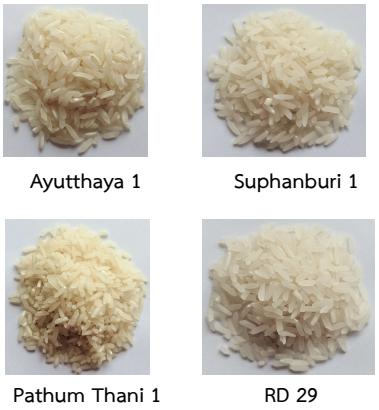

Figure 1 Four seed kernel rice cultivars

2. การเตรียมตัวอย่าง

สกัดน้ำมันออกจากเนื้อเมล็ดข้าวด้วยวิธีการแช่ในสารละลายเฮกเซน โดยใช้อัตราส่วนของเนื้อเมล็ดข้าว : สารละลายเฮกเซน เท่ากับ 1 : 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กวนตลอดเวลานาน 6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไประเหยสารละลายเฮกเซนออกให้หมด จากนั้นจึงบดให้ละเอียดเพื่อใช้ในการสกัดโปรตีนต่อไป

3. การสกัดโปรตีน

3.1 การสกัดโปรตีนทั้งหมด (total protein) (Kumagai et al., 2006)

ทำได้โดยแช่เนื้อเมล็ดข้าวบดละเอียดปริมาณ 100 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 400 มิลลิลิตร กวนตลอดเวลานาน 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใส ส่วนตะกอนนำไปสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์อีกครั้ง นำส่วนใสทั้งสองครั้งมารวมกัน ปรับค่า pH ของส่วนใสให้มีค่าเท่ากับ 6.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บตะกอน ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นทำให้แห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อหาปริมาณและรูปแบบของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบต่อไป

3.2 การสกัดโปรตีนแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบ (Amagliani et al., 2017)

3.2.1 การสกัดโปรตีนอัลบูมิน กลอบูลินและกลูเตลิน

ทำได้โดยแช่เนื้อเมล็ดข้าวบดละเอียดปริมาณ 50 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร กวนตลอดเวลานาน 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใส (1) ส่วนตะกอนนำไปเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร กวนตลอดเวลานาน 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใส (2) ส่วนตะกอนนำไปเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร กวนตลอดเวลานาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใส (3) นำส่วนใส (1) (2) และ 3) ไปตกตะกอนโดยปรับค่า pH ของแต่ละตัวอย่างเป็น 4.1 4.3 และ 4.8 จะได้โปรตีนอัลบูมิน กลอบูลินและกลูเตลิน ตามลำดับ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ปรับ pH ให้มีค่าเป็น 7.0 จากนั้น จึงหาปริมาณและรูปแบบโปรตีนต่อไป

3.2.2 การสกัดโปรตีนโพรลามิน

ทำได้โดยแช่เนื้อเมล็ดข้าวบดละเอียดปริมาณ 50 กรัม ในสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร กวนตลอดเวลานาน 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใส นำไปตกตะกอน โดยการเติมอะซิโตนแช่เย็นปริมาตร 3 เท่าของส่วนใส ตั้งทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บตะกอน ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ปรับ pH ให้มีค่าเป็น 7.0 จากนั้นจึงหาปริมาณและรูปแบบโปรตีนต่อไป

4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีลาวรี (Lowry method) (Lowry et al., 1951)

เตรียมตัวอย่างโดยละลายตะกอนโปรตีนด้วยน้ำกลั่น ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเติม Lowry Reagent ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เมื่อครบเวลาเติม Folin-Phenol Reagent ที่เจือจางในน้ำกลั่น อัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แล้วคำนวณปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) ซึ่งใช้เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

5. การศึกษารูปแบบและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อเมล็ดข้าวด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

เทคนิค SDS-PAGE ประกอบด้วยเจลส่วนบน (stacking gel) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ และเจลส่วนล่าง (separating gel) ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้า 25 มิลลิแอมแปร์ต่อ 1 แผ่นเจล จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมสีแถบโปรตีนด้วยสารละลาย Coomassie brilliant blue R250 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นาน 45-60 นาที ล้างสีย้อมออกโดยแช่ในสารล้างสี (destaining solution) ข้ามคืนหรือจนกว่าพื้นหลังจะใส คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักโมเลกุล (M_w) กับค่า relative migration distance (R_f) ของแถบโปรตีนมาตรฐาน (Precision Plus Protein™ Standards, BIO-RAD)

6. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยวิธีการย่อยด้วยกรด

ชั่งตะกอนโปรตีนปริมาณ 5 กรัม ใส่ลงในขวดแก้ว เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 4 โมลาร์ ปริมาตร 24 มิลลิลิตร ปิดฝาขวด เขย่าให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 4 โมลาร์ให้มีค่าเท่ากับ 6.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เก็บส่วนใส ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 24 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง แล้วแยกเอาส่วนใสออก นำส่วนใสทั้งสองมารวมกัน จากนั้นทำให้แห้ง เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีนและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันต่อไป

7. การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีน (Degree of Hydrolysis, DH) (Silvestre et al., 2013)

เตรียมตัวอย่างโดยละลายตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปิเปตมา 0.4 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย *O*-Phthalaldehyde (OPA) ปริมาตร 3.4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) คำนวณค่าระดับการย่อยสลายจากสมการ

$$\%DH = (ABS \times 1{,}934 \times d)/c$$

ABS = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

d = ค่าการเจือจาง (dilution factor)

c = ความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง (กรัมต่อลิตร)

8. การศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยเทคนิค 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging

เตรียมตัวอย่างโดยละลายตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางตัวอย่างแบบลำดับสอง (2-fold serial dilution) ใส่ในหลอดทดลองความเข้มข้นละ 1.0 มิลลิลิตร (10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้น เติมสารละลาย DPPH ในเอทานอลบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร และสารละลาย DPPH ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร) และคำนวณหา %Radical Scavenging จากสมการ

$$\%\text{Radical Scavenging} = [(A_{control} - A_{sample})/A_{control}] \times 100$$

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของชุดควบคุม

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของตัวอย่าง

9. การวิเคราะห์ข้อมูล

ค่าข้อมูลที่วิเคราะห์แสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปในการคำนวณทางสถิติ (IBM SPSS version 21.0)

ผลการวิจัย

1. การสกัดโปรตีนทั้งหมดจากเนื้อเมล็ดข้าว

ผลการสกัดโปรตีนทั้งหมดพบว่าสารสกัดโปรตีนหยาบจากเนื้อเมล็ดข้าวทั้ง 4 พันธุ์ มีลักษณะเป็นผงหยาบสีขาว โดยสารสกัดโปรตีนหยาบจากเนื้อเมล็ดข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 แสดงค่าร้อยละผลผลิต (8.01 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์) และปริมาณโปรตีน (6.92 ± 0.02 กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง) สูงที่สุด แสดงดังตารางที่ 1 (Table 1)

Table 1 Yield (%) and protein content (g/100 g sample) of four seed kernel rice cultivars

Rice cultivars	Yield (%)	Protein content (g/100 g sample)
Ayutthaya 1	7.49 ± 0.13^{a}	4.62 ± 0.09^{a}
Suphanburi 1	7.78 ± 0.14^{ab}	6.35 ± 0.03^{c}
Pathum Thani 1	8.01 ± 0.08^{b}	6.92 ± 0.02^{d}
RD 29	7.71 ± 0.09^{ab}	5.18 ± 0.06^{b}

Remark Difference letters on the same column indicate significant differences according to Duncan's test ($p<0.05$)

2. การสกัดโปรตีนแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบหลักในเนื้อเมล็ดข้าว

ผลการสกัดโปรตีนหลักแต่ละชนิดในเนื้อเมล็ดข้าวทั้ง 4 พันธุ์ พบว่าประกอบด้วยกลูเตลิน สูงที่สุด รองลงมาคือกลอบูลิน อัลบูมิน และโพรลามิน ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 2 (Table 2)

Table 2 The major rice seed storage proteins of four seed kernel rice cultivars

Rice cultivars	Rice seed storage protein (%)			
	Albumin	Glutelin	Globulin	Prolamin
Ayutthaya 1	3.94 ± 0.03^{a}	81.19 ± 0.06^{a}	12.41 ± 0.03^{a}	1.46 ± 0.03^{c}
Suphanburi 1	4.12 ± 0.05^{b}	81.25 ± 0.08^{a}	12.38 ± 0.06^{a}	1.25 ± 0.04^{b}
Pathum Thani 1	4.53 ± 0.05^{c}	81.34 ± 0.09^{a}	13.07 ± 0.04^{c}	1.06 ± 0.04^{a}
RD 29	4.00 ± 0.06^{ab}	81.33 ± 0.05^{a}	12.67 ± 0.05^{b}	1.00 ± 0.07^{a}

Remark Difference letters on the same column indicate significant differences according to Duncan's test ($p<0.05$)

3. การศึกษารูปแบบและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดโปรตีนหยาบและโปรตีนหลักที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อเมล็ดข้าวด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

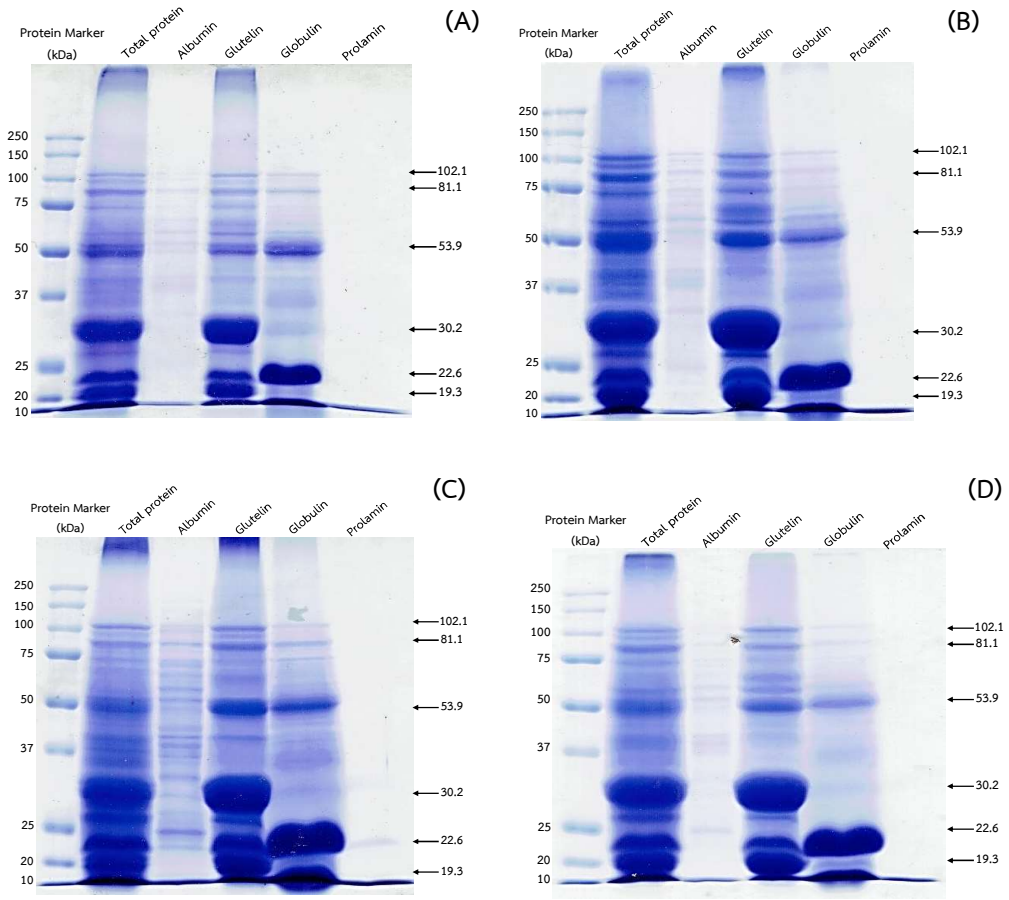

Figure 2 Representative sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) patterns of crude protein extract and the major rice seed storage proteins from four seed kernel rice cultivars; (A) Ayutthaya 1 (B) Suphanburi 1 (C) Pathum Thani 1 and (D) RD 29. (lane 1: molecular weight marker; lane 2: Total protein; lane 3: Albumin; lane 4: Glutelin; lane 5: Globulin and lane 6: Prolamin)

จากภาพที่ 2A-D (Figure 2A-D) สารสกัดโปรตีนหยาบจากเนื้อเมล็ดข้าวทั้ง 4 พันธุ์ มีรูปแบบและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกันเล็กน้อย พบน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10-105 กิโลดาลตัน โดยแสดงแถบโปรตีนที่เด่นชัด 6 แถบ ได้แก่ 19.3, 22.6, 30.2, 53.9, 81.1 และ 102.1 กิโลดาลตัน ส่วนสารสกัดโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเมล็ดข้าวพบว่าโปรตีนกลูเตลินแสดงแถบโปรตีนที่เด่นชัด 4 แถบ ได้แก่ 19.3, 22.6, 30.2 และ 53.9 กิโลดาลตัน โปรตีนกลอบูลินแสดงแถบโปรตีนที่เด่นชัดเพียง 2 แถบ คือ 22.6 และ 53.9 กิโลดาลตัน โปรตีนอัลบูมินแสดงแถบโปรตีนไม่เด่นชัด และโปรตีนโพรลามิน ไม่แสดงแถบโปรตีนเนื่องจากมีปริมาณน้อยมาก

4. การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย

จากการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อเมล็ดข้าวด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก แล้วนำมาคำนวณหาระดับการย่อยสลาย พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อเมล็ดข้าวทั้ง 4 พันธุ์มีระดับการย่อยสลายใกล้เคียงกัน โดยพันธุ์ปทุมธานี 1 (25.74 ± 0.15 เปอร์เซ็นต์) และ กข 29 (25.33 ± 0.17 เปอร์เซ็นต์) มีระดับการย่อยสลายสูงที่สุด แสดงดังตารางที่ 2 (Table 2)

Table 2 Degree of hydrolysis (DH; %) of protein hydrolysate from acid hydrolysis of four seed kernel rice cultivars after 6 h of incubation at 100°C

Rice cultivars	DH (%)
Ayutthaya 1	20.58 ± 0.22^{a}
Suphanburi 1	22.68 ± 0.48^{b}
Pathum Thani 1	25.74 ± 0.15^{c}
RD 29	25.33 ± 0.17^{c}

Remark Difference letters on the same column indicate significant differences according to Duncan's test ($p<0.05$)

5. การทดสอบการต้านออกซิเดชัน

การทดสอบการต้านออกซิเดชันของสารสกัดโปรตีนหยาบและโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยเนื้อเมล็ดข้าวด้วยกรดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสารสกัดโปรตีนหยาบจากเนื้อเมล็ดข้าวทุกพันธุ์สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ในระดับต่ำ (0-30 เปอร์เซ็นต์) และมีค่าใกล้เคียงกันที่แต่ละความเข้มข้นโปรตีน ดังแสดงในรูปที่ 3A (Figure 3A) ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเสตมีประสิทธิภาพกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูงขึ้นประมาณ 3-6 เท่า เมื่อเทียบกับสารสกัดโปรตีนหยาบ ดังแสดงในภาพที่ 3B (Figure 3B)

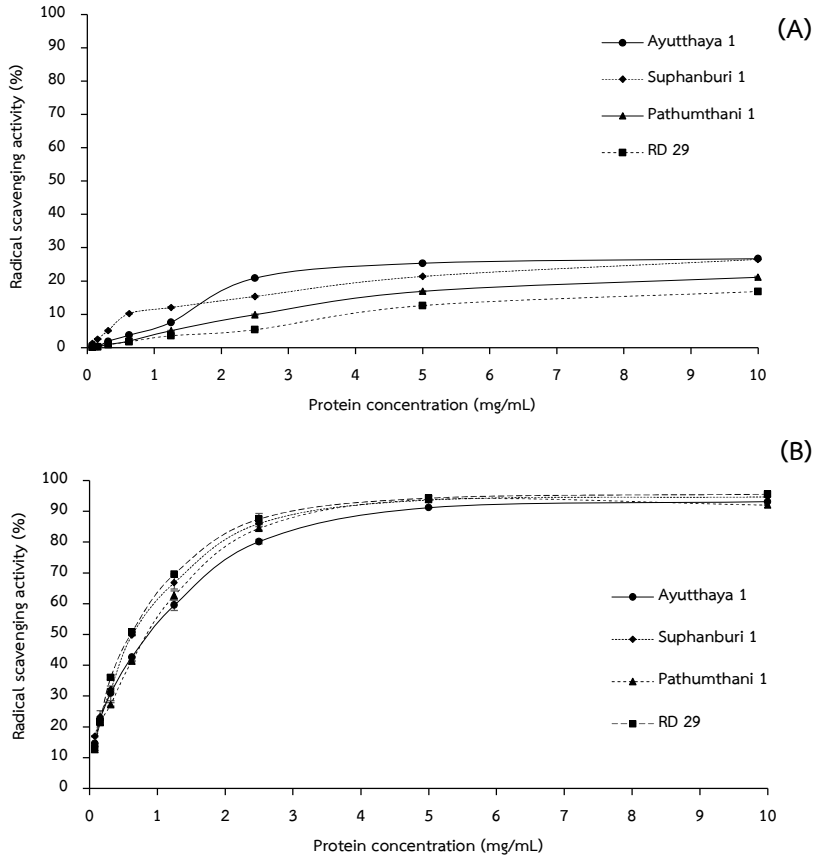

Figure 3 DPPH radical scavenging activities (%) of (A) crude protein extract (B) protein hydrolysate of four seed kernel rice cultivars at different concentrations. Each value is expressed as mean ± SD

อภิปรายผล

งานวิจัยนี้ได้สกัดแยกโปรตีนหยาบจากเนื้อเมล็ดข้าว 4 พันธุ์ ได้แก่ ปทุมธานี 1 อยุธยา 1 สุพรรณบุรี 1 และกข 29 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (pH 11.56) (alkaline extraction) ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการสกัดแยกโปรตีนออกจากแป้งข้าวเจ้า (rice flour) ในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งมีข้อดีคือโปรตีนถูกย่อยได้ง่ายและมีระดับชีวประสิทธิผล (bioavailability) สูงกว่าการสกัดแยกด้วยเอนไซม์อะไมเลส (α-amylase) แต่มีข้อเสียคืออาจทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ และมีสารอื่นถูกแยกออกมาด้วย (Amagliani et al., 2017) ผลการทดลองพบว่าได้โปรตีนกลูเตลินปริมาณมากที่สุด (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2A-D) (Table 2 and Figure 2 A-D) เนื่องจากสามารถละลายได้ในสารละลายกรด (pH<3) หรือสารละลายเบส (pH>10) (Amagliani et al., 2017) การวิเคราะห์โปรตีนพบว่า

ข้าวแต่ละพันธุ์มีปริมาณแตกต่างกันเล็กน้อยดังตารางที่ 1 (Table 1) ความแตกต่างของปริมาณโปรตีนในข้าวแต่ละพันธุ์ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมในการปลูกเป็นปัจจัยสำคัญ เช่น การใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ระยะเวลาในการปลูก สภาพอากาศ เป็นต้น (Naivikul, 2013)

สารสกัดโปรตีนหยาบจากเนื้อเมล็ดข้าวทั้ง 4 พันธุ์ มีรูปแบบและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกันเล็กน้อย โดยแสดงแถบโปรตีนที่เด่นชัด 6 แถบ ได้แก่ 19.3, 22.6, 30.2 53.9, 81.1 และ 102.1 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 2A-D) (Figure 2 A-D) โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 19.3, 30.2 และ 53.9 กิโลดาลตัน คาดว่าเป็นกลูเตลิน เนื่องจากโปรตีนกลูเตลินที่เป็นองค์ประกอบของข้าวมี 3 ขนาด คือ 51-57 กิโลดาลตัน (glutelin precursor) 19-23 กิโลดาลตัน (β-glutelin) และ 30-40 กิโลดาลตัน (α-glutelin) (Amagliani et al., 2017) ส่วนโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 22.6 กิโลดาลตัน อาจเป็น β-glutelin หรือกลอบูลินเนื่องจากปรากฏแถบโปรตีนทั้งสองส่วน

การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตทำได้โดยการย่อยสลายสารสกัดโปรตีนหยาบจากเนื้อเมล็ดข้าวด้วยกรดไฮโดรคลอริก วิธีการมีข้อดี คือ ราคาถูกและย่อยสลายโปรตีนได้เร็ว แต่มีข้อเสีย คือ ทำให้กรดอะมิโนทริปโตเฟนถูกทำลายและไม่สามารถควบคุมระดับการย่อยสลายได้ (Julmanlik & Kongruang, 2019) ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม เมื่อคำนวณระดับการย่อยสลายพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อเมล็ดข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และ กข 29 มีค่าใกล้เคียงกัน (25.74 ± 0.15 และ 25.33 ± 0.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และมีค่ามากกว่าพันธุ์อยุธยา 1 และสุพรรณบุรี 1 เล็กน้อย ระดับการย่อยสลายเป็นการบอกปริมาณการทำลายพันธะเพปไทด์ซึ่งมีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ ระดับการย่อยสลายต่ำเป็นการตัดพันธะเพปไทด์เพียงบางส่วน ส่วนใหญ่มีค่าประมาณ 1-20 เปอร์เซ็นต์ และระดับการย่อยสลายสูงมีค่ามากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ จะได้เพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระเป็นผลิตภัณฑ์ (Duangmal & Sritongtae, 2014) การควบคุมระดับการย่อยสลายขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต จากนั้นทดสอบการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตเปรียบเทียบกับสารสกัดโปรตีนหยาบที่ความเข้มข้นโปรตีนต่าง ๆ โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดโปรตีนหยาบทุกความเข้มข้นโปรตีน โดยมี %Radical scavenging สูงขึ้น ประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ ขนาดของเพปไทด์และการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน (Luna-Vital et al., 2015; Thongimpong et al., 2016)

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้สกัดแยกโปรตีนจากเนื้อเมล็ดข้าว 4 พันธุ์ ซึ่งมีการปลูกในพื้นที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ได้แก่ อยุธยา 1 สุพรรณบุรี 1 ปทุมธานี 1 และกข 29 ทำการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต และศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน พบว่าทุกพันธุ์มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูงใกล้เคียงกัน ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการและเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ที่ให้คำแนะนำและความอนุเคราะห์เมล็ดข้าวเปลือกจำนวน 4 พันธุ์ได้แก่ปทุมธานี 1 อยุธยา 1 สุพรรณบุรี 1 และกข 29 รวมทั้งอนุญาตให้ใช้เครื่องขัดขาวในการสีกะเทาะเปลือก ขอขอบคุณสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา ที่ให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่ทำการทำวิจัย และขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นวลฉวี เวชประสิทธิ์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ให้ความเอื้อเฟื้อสารเคมี อุปกรณ์และสถานที่ในการศึกษารูปแบบโปรตีน

เอกสารอ้างอิง

Amagliani L, O′Regan J, Kelly Al, O′Mahony JA. Composition and protein profile analysis of rice protein ingredients. Journal of Food Composition and Analysis 2017;59:18-26.

Duangmal K, Sritongtae B. Protein modification using proteases and its applications. KKU Science Journal 2014;42(2):274-288.

Julmanlik T, Kongruang S. Functional properties and applications of egg white protein hydrolysates. Journal of Food Technology, Siam University 2019;14(2):69-87.

Kumagai T, Kawamura H, Fuse T, Watanabe T, Saito Y, Masumura T. et al. Production of rice protein by alkaline extract improves its digestibility. Journal of Nutritional Science and Vitaminology 2006;52:467-472.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature 1970;227:680–685.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological and Chemistry. 1951; 193(1): 265–275.

Luna-Vital DA, Mojica L, González de Mejía E, Mendoza S, Loarca-Piña G. Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. Food Research International 2015;76: 39-50.

Naivikul O. Rice: Science and technology. 3rd ed. Bangkok, Kasetsart University Press; 2013.

Peighambardoust SH, Karami Z, Pateiro M, Lorenzo JM. A review on health-promoting, biological and functional aspects of bioactive peptides in food applications. Biomolecules 2021; 11(5): 1-21.

Rice Department. Handbook: knowledge and pass on knowledge of rice production technology. http://brpe.ricethailand.go.th/images/PDF/handbook_5_bigfarm/1--.pdf Accessed February 4, 2021.

Silvestre MPC, Morais HA, Silva VDM, Silva MR. Degree of hydrolysis and peptide profile of whey proteins using pancreatin. Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition 2013;38(3):278-290.

Thongimpong P, Laohakunjit N, Kerdchoechuen O, Pinitglang S, Thumthanaruk B. Antioxidant and functional properties of extracted sunflower proteins by bromelain and Flavourzyme®. KMUTT Research & Development Journal 2016;39(4):565-583.