

ผลของการใช้สารรีดิวซิงซ์ต่อคุณลักษณะทางเคมีกายภาพ
และเนื้อสัมผัสของข้าวเก่า

นางสาวทานตะวัน ถนอมพลกรัง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2554

**EFFECTS OF REDUCING AGENTS ON
PHYSICOCHEMICAL AND TEXTURAL PROPERTIES
OF AGED RICE**

Tantawan Thanompolkrung



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

Suranaree University of Technology

Academic Year 2011

ผลของการใช้สารรีดิวซ์ต่อคุณลักษณะทางเคมีกายภาพ
และเนื้อสัมผัสของข้าวเก่า

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร.สุนันทา ทองทา)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(รศ. ดร.จิรวัดน์ ขงสวัสดิกุล)

กรรมการ

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปิจำนงค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ทานตะวัน ถนอมพลกรัง : ผลของการใช้สารรีดิวซิงซ์ต่อคุณลักษณะทางเคมีกายภาพ และ
เนื้อสัมผัสของข้าวเก่า (EFFECT OF REDUCING AGENTS ON PHYSICOCHEMICAL
AND TEXTURAL PROPERTIES OF AGED RICE) อาจารย์ที่ปรึกษา :
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันทา ทองทา, 159 หน้า.

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ 4 สภาวะการทดลอง คือ ข้าวใหม่ ข้าวเก่า 1 ปี เก็บที่อุณหภูมิห้อง ข้าวเก็บแช่แข็งอายุ 1 ปี และข้าวเร่งเก่าที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง พบว่าข้าวใหม่จะนุ่มเมล็ดข้าวสุกเกาะกันดี ต่างจากข้าวเก่าที่แข็ง และร่วน ข้าวแช่แข็งมีเนื้อสัมผัสที่แข็ง และร่วนขึ้น และข้าวเร่งมีลักษณะเมล็ดข้าวเกาะตัวกันได้น้อยลง เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติการเกิดเพสท์ ด้วยเครื่องวัดความหนืดแบบรวดเร็ว พบว่าข้าวเก่า ข้าวแช่แข็ง และข้าวเร่งมีอุณหภูมิการเกิดเพสท์ (pasting temperature, PT) ที่สูงขึ้น ขณะที่ค่าความหนืดสูงสุด (peak viscosity, PV) และเบรคดาวน์ (breakdown, BD) ต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวใหม่ การกำจัดโปรตีนทำให้ค่า PV และ BD เพิ่มขึ้น แต่ค่าเซตแบค (setback, SB) ลดต่ำลงในบางตัวอย่าง

การศึกษาคูสมบัติทางเคมีของโปรตีนในข้าวใหม่ และข้าวเก่า 1 ปี เก็บที่อุณหภูมิห้อง พบว่าการละลายของโปรตีนที่สกัดด้วยด่างในข้าวเก่ามีค่าต่ำ และสามารถเพิ่มขึ้นเมื่อใช้โซเดียมโดเดซิล ซัลเฟตช่วยในการสกัด นอกจากนี้ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิก และพันธะไดซัลไฟด์ก็มีค่ามากกว่า แสดงถึงการเปิดตัว และเกาะกลุ่มกันเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับผล SDS-PAGE ที่พบโปรตีนขนาดใหญ่ มากกว่า ซึ่งเชื่อมกันด้วยอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก และพันธะไดซัลไฟด์ การศึกษาโปรตีนในข้าวสุก พบว่ามีค่าปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกสูงกว่าข้าวสาร แสดงถึงการเปิดตัวของโปรตีนที่เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ผล SDS-PAGE ของโปรตีนข้าวสุก ก็พบแถบโปรกลูทีลินมีความเข้มมากกว่าแถบอื่น และพบแถบโปรตีนใหม่ขนาด 41 กิโลดาลตัน ซึ่งเกิดจากเกาะกลุ่มกันใหม่ของหน่วยย่อยเบต้ากลูทีลิน หลังหุงข้าว การศึกษาในสภาวะที่มีเบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล แสดงให้เห็นว่า แถบโปรกลูทีลินที่เข้มขึ้นที่พบในโปรตีนข้าวสุกนี้เกิดจากการเกาะตัวกันมากขึ้นของหน่วยย่อยแอลฟา และเบต้ากลูทีลิน ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีนข้าวสุก

การใช้สารละลายรีดิวซิงซ์ 3 ชนิด ได้แก่ โซเดียมซัลไฟท์ (SS) กรดแอสคอร์บิก (AA) และ ซิสทีอีน (CYS) โดยเติมในน้ำหุงข้าว ทำให้เนื้อสัมผัสข้าวเก่านุ่มขึ้นใกล้เคียงข้าวใหม่ได้ทุกระดับ ความเข้มข้น คือ 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ การใช้บัฟเฟอร์เพื่อควบคุมพีเอชของสารรีดิวซิงซ์ ทั้ง 3 ชนิดให้เท่ากัน ทำให้ข้าวเก่านุ่มขึ้นได้เฉพาะที่ 15 มิลลิโมลาร์ การปรับพีเอชของน้ำที่ใช้หุงข้าว ให้เท่ากับสารรีดิวซิงซ์ ที่ 9.53 และ 3.20 มีผลทำให้ข้าวสุกนุ่มขึ้นได้ สารรีดิวซิงซ์ทั้งหมดทำให้ค่า

PV และ BD เพิ่มขึ้น ขณะที่ค่า SB ต่ำลง การศึกษาการแช่ข้าวเก่าในสารละลาย SS ที่ 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ และไดโทโอริทอล (DTT) ที่ 5 มิลลิโมลาร์ โดยแช่ที่ 37 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง แล้วอบแห้ง พบการเพิ่มขึ้นของค่า PV และ BD ขณะที่ค่า SB ลดลงทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น เช่นเดียวกับการแช่ด้วย DTT เมื่อนำตัวอย่างที่แช่ SS ที่ 5 มิลลิโมลาร์ มาตรวจสอบโดย วัดค่าวัดเนื้อสัมผัสพบว่ามีความนุ่มใกล้เคียงกับข้าวสุกใหม่ และลักษณะการเกาะติดกันของเมล็ดข้าวก็เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบการลดลงของปริมาณพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีน ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณหมู่ซัลไฮดริลที่เพิ่มขึ้น และผลของ SDS-PAGE ก็พบว่าแถบโปรตีนขนาดใหญ่ และแถบโปรตีนที่เล็ก จางลง ขณะที่แถบหน่วยย่อยกลูทีลินเข้มข้น จากผลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าสามารถปรับเปลี่ยนเนื้อสัมผัสข้าวเก่าให้ใกล้เคียงกับข้าวใหม่ได้ด้วยสารรีดิวซิงซ์



สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา 2554

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

TANTAWAN THANOMPOLKRUNG : EFFECT OF REDUCING

AGENTS ON PHYSICOCHEMICAL AND TEXTURAL PROPERTIES OF

AGED RICE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUNANTA TONGTA,

Ph.D., 159 PP.

RICE STORAGE/TEXTURE/RICE PROTEINS/REDUCING AGENTS

The changes to Khaw Dawk Mali 105 rice following four treatments, which used fresh rice, aged rice (a year's storage at room temperature), frozen rice (a year's storage at -20 °C) and aged-accelerated rice (AA, heated at 100 °C for 1 h) were studied. The texture of the cooked fresh rice was tender and sticky while it was different from the cooked aged and frozen rice which were harder and less sticky. The low stickiness also appeared in the AA rice. The pasting property was measured using a Rapid Visco-Analyzer (RVA). When compared with the fresh rice, the pasting temperature (PT) of aged, frozen and AA rice was higher, but the peak viscosity (PV) and breakdown (BD) were lower. After proteins were removed, the PV of some rice samples was higher, but the setback (SB) was lower.

The chemical properties of proteins were studied in the fresh and aged rice. Low solubility of proteins in alkaline solution was found in the aged rice, but it increased when SDS was added in the solution. The protein extract of aged rice showed higher surface hydrophobicity (S_0) and a greater total of disulfide bonds, indicating more protein unfolding and aggregating. This was consistent with the increase in high molecular weight proteins (HWM) on SDS-PAGE which were linked via hydrophobic interactions and disulfide bonds. The cooked rice showed more protein unfolding as observed by higher S_0 . The intensity of proglutelin was greater than that of other bands on

SDS-PAGE. In addition, the new protein band of 41 kDa was found as a result of the aggregation of β -glutelin subunits after cooking. SDS-PAGE study with β -mercaptoethanol (BME) suggested that the higher intensity of the proglutelin band resulted from the aggregation of α -glutelin and β -glutelin via disulfide bonds. This correlated with the increased total disulfide bonds of cooked rice protein.

The reducing agents, sodium sulfite (SS), ascorbic acid (AA) and cysteine (CYS) were added in the cooking water of the aged rice. All of them increased the tenderness of the aged rice at concentrations of 5, 10 and 15 mM. The softer texture of cooked aged rice was also observed in all reducing agents (at 15 mM) with equal pH control using phosphate buffer. In addition, the pH value of cooking water was adjusted to be equal to the pH of the reducing agent solution at 9.50 and 3.20 which also increased the soft texture of the cooked aged rice. All of the reducing agents increased PV and BD, but decreased SB. The soaking of aged rice with SS at 5, 10 and 15 mM and 5 mM dithiothreitol (DTT) at 37 °C for 6 h followed by drying was also investigated. An increase in PV and BD and a decrease in SB were observed at all concentrations of SS and DTT. The cooked aged rice soaked with 5 mM SS showed a soft texture similar to that of the cooked fresh rice and the stickiness also increased. In addition, the disulfide bonds were lower which was related to the greater content of sulfhydryl groups. The SDS-PAGE showed a lower intensity of HMW and proglutelin, but higher glutelin subunits. Based on this study, the addition of reducing agents can be used to change the texture of cooked aged rice to make it more like fresh rice.

School of Food Technology

Student's Signature_____

Academic Year 2011

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนันทา ทองทา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา ชี้แนะ ให้ความช่วยเหลือสนับสนุนในการศึกษาวิจัยอย่างยิ่ง ตลอดจนแนะนำในการเขียน และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จสมบูรณ์ กราบขอพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล ที่กรุณาให้คำปรึกษา และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี สำหรับการอนุเคราะห์ และตัวอย่างที่นำมาใช้บางส่วนในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณบุคลากรประจำศูนย์เครื่องมือ 1 และ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุกท่าน ที่เสียสละเวลาให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยด้วยดีตลอดมา ขอขอบคุณนางสาวนวพร ลากส่งผล และพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ บัณฑิตศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ที่ทำงานในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีอาหารทุกท่าน ซึ่งคอยให้ความช่วยเหลือ แนะนำ และให้กำลังใจตลอดระยะเวลาการเรียนและการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การเลี้ยงดูอบรม และสนับสนุนส่งเสริมการศึกษาของข้าพเจ้าเป็นอย่างดี จนผู้ทำวิจัยประสบความสำเร็จในทุก ๆ ด้านของชีวิตตลอดมา

ทานตะวัน ถนอมพลกรัง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฐ

บทที่

1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	5
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	5
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
1.6 รายการอ้างอิง.....	6
2 ปรัชญ่วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
2.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว.....	8
2.1.1 แกลบ (hull, husk).....	8
2.1.2 ผลแท้ (true fruit หรือ caryopsis grain).....	9
2.2 องค์ประกอบทางเคมี.....	9
2.2.2 คาร์โบไฮเดรต.....	9
2.2.3 ลิพิด.....	11
2.2.4 โปรตีน.....	11
2.2.5 น้ำ หรือความชื้น.....	16
2.3 คุณภาพข้าว.....	16
2.4 โปรตีนกับคุณภาพข้าว.....	17

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5	การเปลี่ยนแปลงคุณภาพข้าวระหว่างเก็บรักษา.....	19
2.6	พันธะเคมี และแรงยึดเกาะที่สำคัญของโปรตีน.....	23
2.7	สารรีดิวซิงซ์ (Reducing agent)	27
2.8	รายการอ้างอิง.....	31
3	การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของข้าวภายหลังการเก็บรักษา	
3.1	บทคัดย่อ.....	43
3.2	บทนำ.....	43
3.3	วัตถุประสงค์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	45
3.3.1	วัตถุประสงค์.....	45
3.3.2	การเตรียมตัวอย่างข้าวสาร.....	45
3.3.3	การเตรียมตัวอย่างแป้งข้าว.....	45
3.3.4	การเตรียมสสารข้าว.....	46
3.3.5	การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี.....	47
3.3.5.1	การวัดความชื้น.....	47
3.3.5.2	การวิเคราะห์ไขมัน.....	47
3.3.5.3	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน.....	47
3.3.5.4	การวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลส.....	48
3.3.6	การปลดปล่อยอะไมโลสอิสระ.....	49
3.3.7	การวิเคราะห์กำลังการพองตัว (swelling power) และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (soluble solid)	50 50
3.3.8	คุณสมบัติการเกิดเพสท์ (pasting properties)	50
3.3.9	การศึกษาสภาวะการเตรียมตัวอย่างข้าวสุก.....	51
3.3.9.1	เวลาในการหุงข้าว (minimum cooking time).....	51
3.3.9.2	การหาปริมาณน้ำที่ใช้ในการหุงข้าว (water uptake ratio).....	51
3.3.9.3	การหุงข้าว.....	52
3.3.9.4	การอัดตัวอย่าง.....	53

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.10	การวัดเนื้อสัมผัสข้าวสุก.....	53
3.3.11	การตรวจสอบคุณสมบัติทางความร้อนของตัวอย่างแป้งและสตาร์ชข้าว.....	53
3.3.12	การวัดสีของตัวอย่าง.....	54
3.3.13	การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ.....	54
3.4	ผลการทดลองและวิจารณ์.....	54
3.4.1	องค์ประกอบทางเคมีของข้าวสาร	54
3.4.2	ลักษณะทางเคมีกายภาพของฟลาร์ว และสตาร์ชข้าว.....	56
	ที่สภาวะการทดลองที่ต่างกัน.....	56
3.4.3	คุณสมบัติการเกิดเพสท์ (pasting properties)	62
3.4.4	คุณสมบัติทางความร้อน (Thermal properties)	67
3.4.5	เนื้อสัมผัสข้าวสุก.....	69
3.5	สรุปผลการทดลอง.....	71
3.6	รายการอ้างอิง.....	71
4	คุณสมบัติทางเคมีของโปรตีนในข้าวภายหลังการเก็บรักษา	
4.1	บทคัดย่อ.....	76
4.2	บทนำ.....	76
4.3	วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	79
4.3.1	วัสดุทดลอง.....	79
4.3.2	การสกัดโปรตีนในตัวอย่างแป้งข้าว	79
4.3.3	การหาสภาวะเหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากตัวอย่างข้าวสุก.....	80
4.3.4	การสกัดโปรตีนจากตัวอย่างเจลข้าวสุก.....	80
4.3.5	การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....	81
4.3.6	การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสไฮโดรโฟบิกของโปรตีน	82
4.3.7	การวิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล (Total SH)	83
	และ ฟังก์ชันไดซัลไฟด์ (SS)	83

4.3.7.1	การวิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลไฮดริลทั้งหมด (Total SH).....	83
4.3.7.2	การวิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล.....	84
	และหมู่ไดซัลไฟด์ (Total SH + SS).....	84
4.3.8	การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	84
4.4	ผลการทดลองและวิจารณ์.....	84
4.4.1	ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้จากฟลาร์ว	84
4.4.2	ขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE).....	86
4.4.3	ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้จากข้าวสุก.....	93
4.4.4	ขนาดโมเลกุลของโปรตีนในตัวอย่างข้าวสุก.....	95
	ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE).....	95
4.4.5	ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิก (Surface hydrophobicity).....	99
4.4.6	ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล (SH) และไดซัลไฟด์ (SS)	100
4.5	สรุปผลการทดลอง.....	101
4.6	รายการอ้างอิง.....	102
5	ผลของสารรีดิวซิงซ์ต่อคุณสมบัติข้าวเก่า	
5.1	บทคัดย่อ.....	107
5.2	บทนำ.....	108
5.3	วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	109
5.3.1	วัสดุทดลอง.....	109
5.3.2	การเตรียมตัวอย่างข้าวสุก.....	109
5.3.3	การวัดเนื้อสัมผัสข้าวสุก.....	111
5.3.4	คุณสมบัติการเกิดเพสท์ของแป้งในสารละลายรีดิวซิงซ์.....	111
5.3.5	การเตรียมตัวอย่างข้าวเก่าที่ปรับปรุงคุณภาพด้วยสารรีดิวซิงซ์.....	112
5.3.6	การเตรียมสารละลายโปรตีนสกัด.....	113
5.3.7	การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE	114
5.3.8	การวิเคราะห์ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของโปรตีน	114
5.3.9	ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล (SH) และไดซัลไฟด์ (SS)	115

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.3.9.1	การวิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลไฮดริลทั้งหมด (Total SH).....	115
5.3.9.2	การวิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล.....	84
	และหมู่ไดซัลไฟด์ (Total SH + SS).....	116
5.3.10	การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	116
5.4	ผลการทดลองและวิจารณ์.....	117
5.4.1	ผลของสารละลายรีดิวซิ่งต่อเนื้อสัมผัสข้าวสุก.....	117
5.4.2	ผลของพีเอชในสารละลายรีดิวซิ่งต่อคุณลักษณะเนื้อสัมผัสของข้าวเก่า....	119
5.4.3	ผลของการใช้สารรีดิวซิ่งต่อคุณสมบัติการเกิดเพสท์ของฟลารว์.....	124
5.4.4	การปรับปรุงคุณสมบัติข้าวเก่าด้วยการแช่สารรีดิวซิ่ง.....	127
5.4.5	ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล (SH) และไดซัลไฟด์ (SS)	130
5.4.6	ปริมาณพื้นที่ผิวไฮโดรโฟบิก.....	131
5.4.7	การศึกษานาโมเลกุลของโปรตีนด้วย SDS-PAGE.....	132
5.5	สรุปผลการทดลอง.....	135
5.6	รายการอ้างอิง.....	136
6	บทสรุป.....	139
	ภาคผนวก.....	141
	ประวัติผู้เขียน.....	159

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	ร้อยละส่วนประกอบโดยประมาณของส่วนต่าง ๆ ของในเมล็ดข้าว คิดเทียบเป็นน้ำหนักแห้ง.....9
3.1	ปริมาณตัวอย่าง น้ำ และเวลาที่ใช้ในการหุงข้าว.....53
3.2	องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ในสภาวะการทดลองที่ต่างกัน.....55
3.3	คุณลักษณะเคมีกายภาพของฟลาร์ว์และสตาร์ชจาก 4 กลุ่มตัวอย่างทดลอง.....57
3.4	ค่าสีของเมล็ด ฟลาร์ว์ และสตาร์ชจาก 4 กลุ่มตัวอย่างทดลอง.....60
3.5	คุณสมบัติการเกิดเพสท์ของตัวอย่างฟลาร์ว์ ฟลาร์ว์ที่สกัดไขมันออก และสตาร์ช จากข้าวที่สภาวะการทดลองต่างกัน.....64
3.6	คุณสมบัติทางความร้อนของฟลาร์ว์และสตาร์ชจากทั้ง 4 กลุ่มตัวอย่างทดลอง.....68
4.1	การเติมเอนไซม์ในตัวอย่างข้าวสุก.....81
4.2	การเติมสารละลายสำหรับสกัดโปรตีนในตัวอย่างสารละลายข้าวสุก.....81
4.3	ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากฟลาร์ว์ข้าวขาวดอกมะลิ105 ใหม่ และเก่า.....85
4.4	ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากข้าวสุกขาวดอกมะลิ105 ใหม่ และเก่า.....94
4.5	ค่าพื้นที่ผิวความเป็นไฮโดรโฟบิกของตัวอย่างโปรตีนที่สกัดจากฟลาร์ว์และข้าวสุก.....99
4.6	ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล และไคซัลไฟด์ของโปรตีนจากฟลาร์ว์ และตัวอย่างข้าวสุก.....100
5.1	ปริมาณตัวอย่าง น้ำ และเวลาที่ใช้ในการหุงข้าว.....111
5.2	พีเอชของรีดิวซิงซ์ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำกลั่น และฟอสเฟตบัฟเฟอร์.....120
5.3	คุณสมบัติการเกิดเพสท์ของฟลาร์ว์ในรีดิวซิงซ์เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์125
5.4	คุณสมบัติการเกิดเพสท์ของฟลาร์ว์ในที่ใช้น้ำกลั่นปรับพีเอชเลียนแบบสารรีดิวซิงซ์.....125
5.5	คุณสมบัติการเกิดเพสท์ของฟลาร์ว์ในสารรีดิวซิงซ์เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์.....126
5.6	คุณสมบัติการเกิดเพสท์ในฟลาร์ว์ที่เตรียมจากข้าวแช่สารรีดิวซิงซ์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 6 ชั่วโมง.....128

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
5.7	ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล และไดซัลไฟด์ของตัวอย่างแป้งข้าว
	หลังผ่านการแช่ด้วยสารละลายรีดิวซิงซ์ ที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 6 ชั่วโมง.....130
5.8	ปริมาณพื้นที่ผิวไฮโดรโฟบิกของโปรตีนในตัวอย่างฟลาร์ข้าว
	ที่ผ่านการแช่ด้วยโซเดียมซัลไฟท์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง.....131



สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างเมล็ดข้าว.....	8
2.2	โครงสร้างของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน.....	10
2.3	ปฏิกิริยาการเกิดพันธะไคซัลไฟด์.....	26
2.4	ปฏิกิริยารีดักชันของโปรตีนด้วยสารรีดิวซิงซ์.....	29
2.5	สูตรโครงสร้างของสารรีดิวซิงซ์.....	30
3.1	เส้นกราฟความหนืดของตัวอย่างฟลาร์ว์ข้าวที่สภาวะการเก็บต่าง ๆ.....	65
3.2	ความหนืดของตัวอย่างฟลาร์ว์ และฟลาร์ว์ที่กำจัดไขมัน และสตาร์ซ์ข้าวที่สภาวะการเก็บต่าง ๆ กัน.....	66
3.3	คุณลักษณะเนื้อสัมผัสด้านความแข็ง และความเหนียวติดของเมล็ดข้าวสุก.....	70
4.1	ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีน จากข้าวขาวดอกมะลิ105 ภายใต้สภาวะที่ไม่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทธานอล (BME) ปริมาณอะคริลาไมด์ ร้อยละ 12.5.....	87
4.2	ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีน จากข้าวขาวดอกมะลิ105 ภายใต้สภาวะที่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทธานอล (BME) ปริมาณอะคริลาไมด์ ร้อยละ 12.5	87
4.3	ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีน จากข้าวขาวดอกมะลิ105 ภายใต้สภาวะที่ไม่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทธานอล (BME) ปริมาณอะคริลาไมด์ ร้อยละ 7.5.....	88
4.4	ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีน จากข้าวขาวดอกมะลิ105 ภายใต้สภาวะที่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทธานอล (BME) ปริมาณอะคริลาไมด์ ร้อยละ 7.5	88
4.5	ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีน จากข้าวขาวดอกมะลิ105 ภายใต้สภาวะที่ไม่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทธานอล (BME) ปริมาณอะคริลาไมด์ ร้อยละ 15.....	89

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.6	ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีน จากข้าวขาวดอกมะลิ105 ภายใต้สภาวะที่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทานอล (BME) ปริมาณอะคริลาไมด์ ร้อยละ 1589
4.7	ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีน จากข้าวขาวดอกมะลิ105 สุกภายใต้สภาวะที่ไม่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทานอล (BME) ปริมาณอะคริลาไมด์ ร้อยละ 12.5.....96
4.8	ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีน จากข้าวขาวดอกมะลิ105 สุก ภายใต้สภาวะที่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทานอล (BME) ปริมาณอะคริลาไมด์ ร้อยละ 12.597
4.9	ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีน จากข้าวขาวดอกมะลิ105 สุกภายใต้สภาวะที่ไม่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทานอล (BME) ปริมาณอะคริลาไมด์ ร้อยละ 15.....97
4.10	ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีน จากข้าวขาวดอกมะลิ105 ภายใต้สภาวะที่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทานอล (BME) ปริมาณอะคริลาไมด์ ร้อยละ 15.....98
5.1	ค่าความแข็ง และ ค่าการเกาะตัวกัน ของข้าวสุกใหม่ (fresh) เก่า (aged) ที่หุงด้วยน้ำ และข้าวสุกเก่าที่หุงด้วย โซเดียมซัลไฟท์ (SS) แอสคอร์บิก (AA) และ ซิสทีน (CYS) ที่ความเข้มข้น 5 10 และ 15 มิลลิโมลาร์.....118
5.2	ค่าความแข็ง และ ค่าการเกาะตัวกัน ของข้าวสุกใหม่ (fresh) เก่า (aged) ที่หุงด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และข้าวสุกเก่าที่หุงด้วยโซเดียมซัลไฟท์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (SS) แอสคอร์บิกในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (AA) และ ซิสทีนในฟอสเฟตบัฟเฟอร์(CYS) ที่ความเข้มข้น 5 10 และ 15 มิลลิโมลาร์.....121
5.3	ค่าความแข็ง (a-c) และ ค่าการเกาะตัวกัน (d-e) ของข้าวสุกใหม่ (fresh) เก่า (aged) และข้าวสุกเก่าที่หุงด้วยน้ำกลั่นที่มีค่าพีเอชเลียนแบบ พีเอชของสารละลายรีดิวซิงซ์.....122

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
5.4	ค่าความแข็ง และ ความเหนียว ของข้าวสุกใหม่ (fresh/DI) เก๋า (aged/DI) ที่หุงด้วยน้ำกลั่น ข้าวสุกเก่าที่แช่ด้วยน้ำกลั่น 37 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง (aged/37C6H/DI) และข้าวสุกเก่าที่แช่ด้วยสารรีดิวซิงซ์ 37 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง (aged/37C6H/5SS).....128
5.5	ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจาก ข้าวขาวดอกมะลิ105 เก๋า (aged) ที่แช่ด้วยโซเดียมซัลไฟต์ (SS) เข้มข้น 0, 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ และ ไคไทโอรีทอล เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (DTT) สกัดด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ใช้ปริมาณอะคริลาไมด์ ร้อยละ 12.5.....133
5.6	ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจาก ข้าวขาวดอกมะลิ105 เก๋า (aged) ที่แช่ด้วยโซเดียมซัลไฟต์ (SS) เข้มข้น 0, 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ และ ไคไทโอรีทอล เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (DTT) สกัดด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ประกอบด้วยสารละลาย SDS เข้มข้น ร้อยละ 1 ใช้ปริมาณอะคริลาไมด์ ร้อยละ 12.5.....133
5.7	ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจาก ข้าวขาวดอกมะลิ105 เก๋า (aged) ที่แช่ด้วยโซเดียมซัลไฟต์ (SS) เข้มข้น 0, 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ และ ไคไทโอรีทอล เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (DTT) สกัดด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ใช้ปริมาณอะคริลาไมด์ ร้อยละ 15.....134
5.8	ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจาก ข้าวขาวดอกมะลิ105 เก๋า (aged) ที่แช่ด้วยโซเดียมซัลไฟต์ (SS) เข้มข้น 0, 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ และ ไคไทโอรีทอล เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (DTT) สกัดด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ประกอบด้วยสารละลาย SDS เข้มข้น ร้อยละ 1 ใช้ปริมาณอะคริลาไมด์ ร้อยละ 15.....134

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ข้าว (rice) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวตระกูลหญ้า (Family : *Grammineae* หรือ *Poaceae*) อยู่ในสกุลออริซา (Genus: *Oryza*) ถือกำเนิดขึ้นครั้งแรกที่บริเวณแถบเทือกเขาหิมาลัยทางด้านทิศตะวันตก (ศรีศักร วัลลิโภดม, 2548 อ้างถึงใน ยอดหทัย เทพธรา และ กัญญวิมว์ กิรติกร, 2548) มักเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนและอบอุ่น (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2550) ข้าวที่นิยมปลูกทั่วโลกมีอยู่ 2 ชนิด คือ ข้าวปลูกเอเชีย (*Oryza sativa* Linn.) และข้าวปลูกแอฟริกา (*Oryza glaberrima* Steud.) ในปัจจุบันพบว่าประชากรโลกมากกว่าครึ่งหนึ่งบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก โดยร้อยละ 90 อยู่ในกลุ่มประเทศแถบเอเชีย (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2550)

ประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิตข้าวได้เพียงพอต่อการบริโภคในประเทศและส่วนที่มากเกินความต้องการ สามารถส่งขายเป็นสินค้าออกยังต่างประเทศ สร้างรายได้ให้ประเทศเทียบเท่ากับสินค้าเกษตรเศรษฐกิจอื่น ๆ เช่น ยางพารา กุ้งแช่แข็ง หรือเนื้อไก่ ฯลฯ การผลิตข้าวยังก่อให้เกิดการจ้างงานมากถึงร้อยละ 60 ของแรงงานภายในประเทศ (มรกต ตันติเจริญ, 2548 อ้างถึงใน ยอดหทัย เทพธรา และ กัญญวิมว์ กิรติกร, 2548) ในช่วงปี 2549-2553 ไทยเป็นประเทศผู้ส่งออกข้าวอันดับหนึ่งในตลาดโลก เมื่อเทียบกับเวียดนาม อินเดีย ปากีสถาน สหรัฐอเมริกา และจีน โดยในปี 2553 ไทยมียอดส่งออกสูงประมาณ 8.5 ล้านตันข้าวสาร (นิรนาม, ออนไลน์, 2553) นอกจากจำนวนผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ที่สูงแล้ว คุณภาพที่ดีของเมล็ดเป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงควบคู่กัน เพราะถูกใช้เป็นตัวกำหนดราคาข้าว จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อความสามารถแข่งขันทางการค้าในตลาดโลก (งามชื่น และคณะ 2545) ปัจจุบันไทยมีข้าวคุณภาพส่งออกหลายชนิดโดยเฉพาะข้าวหอมมะลิ (jasmine rice) ซึ่งมีชื่อเสียงเป็นที่รู้จักทั่วโลกในเรื่องคุณภาพความนุ่ม และกลิ่นหอมเฉพาะตัวของข้าวสุก คุณภาพของข้าวที่ดีนั้น นอกจากขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ข้าว และสภาวะในการปลูกแล้ว เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวที่ดี ช่วยช่วยรักษาคุณภาพของข้าวให้อยู่ในสภาพที่ดีจนถึงมือผู้บริโภคได้ ปัญหาที่ทำให้ข้าวมีคุณภาพด้อยลงเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น ปัญหาข้าวที่มีความชื้นสูง การปลอมปนจากข้าวที่ด้อยคุณภาพ ปัญหาสิ่งเจือปนจำพวกเศษวัสดุต่าง ๆ รวมทั้งตัว และไข่ของแมลง เช่น มอดข้าวสาร หรือด้วงงวง (*Sitophilus oryzeal*) มอดแป้ง (*Tribolium castaneum* Herbst) และ ปัญหาความไม่สม่ำเสมอของคุณภาพข้าวสุกจากการผสมหรือปลอมปนด้วยข้าวหลายสายพันธุ์ (blend) การเสียดินหอม

เฉพาะตัวจากผลของความร้อน และความชื้น ปัญหาการขาดการสื่อสารข้อมูลที่ถูกต้องเกี่ยวกับวิธีการหุงต้มที่เหมาะสมให้แก่ผู้บริโภคชาวต่างชาติ ปัญหาหีบห่อ หรือบรรจุภัณฑ์ที่ไม่เหมาะสม การขาดการพัฒนา รวมทั้งปริมาณผลผลิตข้าวคุณภาพสูง ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด ปัญหาที่ได้กล่าวมาทั้งหมดมีวิธีการที่สามารถป้องกัน และแก้ไขได้แล้วในทางอุตสาหกรรม ยกตัวอย่างเช่น การลดความชื้นในข้าวด้วยเครื่องมือ การนำระบบ HACCP และ ISO 9002 มาใช้ ควบคุมคุณภาพ ในโรงสี โกดัง หรือโรงงานอุตสาหกรรม การนำข้อกำหนดมาตรฐานสินค้าข้าวมาใช้เป็นตัวคัดกรอง และควบคุมคุณภาพข้าว การพัฒนารูปแบบบรรจุภัณฑ์ และระบบการบรรจุข้าว และการพัฒนาพันธุ์ข้าวเจ้าหอมคลองหลวง 1 ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี และปทุมธานี 1 ที่มีคุณภาพ ข้าวสวยใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์หอมมะลิ ขึ้นมาเพื่อลดปัญหาข้าวคุณภาพขาดตลาด เป็นต้น (งามชื่น คงเสรี, ออนไลน์, 2551) แม้จะผ่านกระบวนการผลิตที่ดีเพื่อควบคุมคุณภาพข้าวให้ได้มาตรฐานและยอมรับได้แล้วก็ตาม การเก็บข้าวเปลือก หรือข้าวสารในโกดังหรือโรงสี เป็นระยะเวลานาน ๆ ก็ทำให้คุณภาพข้าวด้อยลงได้ โดยข้าวใหม่ที่มีเนื้อสัมผัสนุ่มเหนียวจะมีการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางเคมี และกายภาพเกิดขึ้นเรื่อย ๆ จนกลายสภาพเป็นข้าวเก่าที่มีความแข็งแรงทนทานหลังการเก็บรักษาที่เรียกว่ากระบวนการเก่า (aging) โดยหากเป็นข้าวที่เก่าเมื่อนำมาหุงจะได้รับความนิยมน้อยจากกลุ่มผู้บริโภค ต่างจากแป้งข้าว ที่นำมาเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ขนม เส้นก๋วยเตี๋ยวชนิดต่าง ๆ อาหารหมักดอง หากเตรียมจากแป้งข้าวที่ยังใหม่อยู่ หรือผสมทั้งข้าวเก่า และใหม่ที่ได้รับซื้อจากเกษตรกร จะไม่ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพตามต้องการ (Teo, Karim, Cheah, Norziah and Seow, 2000) โดยพบว่าอุณหภูมิในการเก็บรักษาที่สูงทำให้ข้าวเก่าเร็วขึ้น (Chrastil, 1994; Zhou, Robards, Helliwell and Blanchard, 2003) เช่นเดียวกันกับข้าวที่ผ่านกระบวนการเร่งอายุการเก็บที่อุณหภูมิสูง จะเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นเร็วกว่าข้าวที่เก็บที่อุณหภูมิปกติด้วย (Gujral and Kumar, 2003) วิธีการหลักสำหรับชะลอความเก่าหรือเสื่อมคุณภาพข้าวจากการเก็บรักษาทำได้ โดยใช้วิธีเก็บในห้องเย็น ประมาณ 15 องศาเซลเซียส (Tananuwong and Malila, 2011) รวมทั้งการเก็บรักษาข้าวสารในบรรจุภัณฑ์ ที่ป้องกันการผ่านเข้าออกของอากาศ และการปิดผนึกด้วยระบบสุญญากาศ (vacuum) การบรรจุข้าวในสภาวะปรับแต่งบรรยากาศซึ่งก็สามารถชะลอการเสื่อมคุณภาพได้ในระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น การหาทางเลือกหรือวิธีการใหม่ ๆ ที่ช่วยในการชะลอหรือปรับปรุงข้าวที่เสื่อมคุณภาพข้าวให้ดีขึ้นได้ ก็น่าจะเป็นสิ่งที่มีประโยชน์ และน่าสนใจ เพื่อเพิ่มทางเลือกที่หลากหลายให้ผู้ประกอบการนำไปใช้ประกอบการพิจารณา เพื่อเลือกวิธีที่เหมาะสมในการแก้ปัญหาข้าวเสื่อมคุณภาพจากการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานต่อไป มีหลายงานวิจัยที่พบว่าคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของข้าว นอกจากเกี่ยวข้องกับส่วนของสสาร ยังเป็นผลมาจากโปรตีนที่อยู่ในเมล็ดข้าวอยู่ด้วย ถึงแม้จะมีปริมาณน้อยแต่มีอิทธิพลมากกับคุณสมบัติของข้าว โดยเมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสใกล้เคียงกัน แต่ต่างกันที่ปริมาณโปรตีน มีผลให้เนื้อสัมผัสข้าวสุก

มีลักษณะต่างกัน (Juliano et al, 1985; Onate, Mundo and Juliano, 1964) ในด้านค่าการเกาะติดกันของเมล็ดข้าวสุก (Chrastil, 1994) และความแข็ง (Okadome et al, 1999) โดยข้าวที่มีปริมาณโปรตีนสูงจะมีความแน่นเนื้อมากกว่าข้าวที่มีโปรตีนต่ำ (Tamaki, Ebata, Tashiro and Ishikawa, 1993) จะเห็นได้ชัดเจนจากคุณสมบัติการพองตัว คุณสมบัติทางความร้อน (Teo, Karim, Cheah, Norziah and Seow, 2000) รวมทั้งคุณสมบัติการเกิดเพลสต์ของฟลาร์วข้าวสายพันธุ์เดียวที่มีปริมาณโปรตีนแตกต่างกัน จะมีการเปลี่ยนแปลงความหนืดต่างกัน แต่ความหนืดจะมีค่าใกล้เคียงกันภายหลังกำจัดโปรตีนออกไป (Fitzgerald and Reinke, 2006) กลูทีลิน คือโปรตีนในข้าวที่มีชื่อเรียกว่า(อริซินิน) มีมากกว่าร้อยละ 80-90 และมีหมู่ซัลไฮดริลภายในโครงสร้าง อย่างไรก็ตามปริมาณโปรตีนจะไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังการเก็บรักษา เมื่อนำมาเชื่อมโยงกับผลการวิจัยของ Saleh and Meullenet (2007) ที่พบว่า การทำลายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีน หรือโปรตีนกับสตาร์ช (protein's intermolecular interaction) บางส่วนด้วยการแช่ข้าวก่อนหุงในเอนไซม์โปรติเอส ทำให้สตาร์ชสามารถดูดซับน้ำได้เพิ่มขึ้น และข้าวสุกมีเนื้อสัมผัสนุ่มและเหนียวขึ้นด้วย บ่งชี้ได้ว่าการเก่าของข้าวในระหว่างการเก็บ น่าจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหรือคุณสมบัติทางเคมีที่เกิดขึ้นในโปรตีนภายหลังการเก็บ โดยค่าการละลายได้ของโปรตีนลดลง โปรตีนเกาะกลุ่มกันมากขึ้น จึงทำให้ขนาดโมเลกุลของโปรตีนใหญ่ขึ้น สอดคล้องกับปริมาณหมู่ไดซัลไฟด์ที่เพิ่มขึ้น (Chrastil, 1990; Chrastil and Zarins, 1992; Chrastil, 1994; Ohno and Ohisa, 2005) และมีการเชื่อมกันระหว่างโมเลกุลของโปรตีนเกิดเป็นโครงข่ายตาข่าย (protein-protein network) ขัดขวางการดูดซับน้ำของเมล็ดสตาร์ช และมีผลต่อการลดลงของค่าการเกาะกันของเมล็ดข้าวสุกที่เกิดขึ้นได้ภายหลังการเก็บ(Saleh, and Meullenet,2007) โดยที่อุณหภูมิสูงแสดงการจับตัวกันของโปรตีนเพิ่มขึ้นผ่านพันธะไดซัลไฟด์เกิดเป็นโครงข่ายตาข่ายโปรตีนเพิ่มขึ้น (Prudencio Ferreir and Areas, 1993) การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมี และกายภาพของโปรตีนในเมล็ดข้าว ซึ่งเกิดขึ้นภายหลังการเก็บรักษาในสภาวะก่อนและหลังให้ความร้อน เป็นเรื่องที่ควรให้ความสนใจและศึกษาควบคู่กันไป โดยน่าจะเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มพูนความรู้ไปสู่ความเข้าใจในในเรื่องกลไกการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของข้าวที่เป็นผลมาจากโปรตีน และสามารถนำไปประยุกต์ใช้แก้ไขปัญหการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของข้าวสุกภายหลังการเก็บรักษาได้ มีรายงานผลการวิจัยจำนวนหนึ่งพบว่า สารรีดิวซ์บางชนิด จำพวก thiol-reducing agents เช่น ไคโทโอริทอล (DTT) และ เบต้า-เมอร์แคปโทเอทานอล (BME) ซึ่งเป็นสารกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงในการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีน และใช้ศึกษาขนาดโมเลกุลและหน่วยย่อยของโปรตีนนั้น มีผลทำให้ค่าเนื้อสัมผัสของข้าวสุก และความหนืดเปลี่ยนแปลงไป (Hamaker and Griffin, 1990; 1991; 1993; Fitzgerald and Reinke, 2006; Xie, Chen, Duan, Zhu and Liao, 2008;) ในปี 2005 Benjakul, Thongkaew และ Vissessanguan ได้นำเสนอผลงานวิจัยเรื่องการเติมสารรีดิวซ์ 3 ชนิดซึ่งสามารถใช้ในอาหารได้

คือ โซเดียมไบซัลไฟท์ กรดแอสคอร์บิก และ ซิสทีอีน เพื่อเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส (Transglutaminase) และ Ca^{2+} ATPase โดยทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (ซึ่งมีปริมาณสูงในเนื้อปลาแช่แข็ง ทำให้เกิดเจลคุณภาพต่ำ) ที่บริเวณส่วนเร่ง (active site) ทำให้โมเลกุลของไมโอซินโปรตีนกลับมาทำงานได้ปกติ (renaturation) ทำให้คุณภาพเจลของผลิตภัณฑ์ซูริมิจากเนื้อปลาแช่แข็งจากปลา 4 ชนิด มีคุณภาพดีขึ้นได้ ผลที่เกิดขึ้นจากสารรีดิวซิงซ์ถูกศึกษาอย่างกว้างขวางในกลุ่มปลาทะเล โดยให้ผลในการปรับปรุงคุณภาพของเจลอย่างมาก ในปี 2007 Ohno, Tomatsu, Toeda และ Ohisa ได้นำสารรีดิวซิงซ์ในกลุ่มที่ใช้ได้กับอาหาร มาใช้ในการศึกษาผลที่เกิดขึ้นกับโปรตีน และเนื้อสัมผัสของข้าวญี่ปุ่นสายพันธุ์ akitakomachi ที่เก็บไว้เป็นเวลา 5 เดือน พบว่าการใช้สารละลายใน กลุ่มโซเดียมซัลไฟท์ และซิสทีอีน เข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ มีผลทำให้เนื้อสัมผัสของข้าวมีความนุ่มและเหนียวขึ้นได้ และอธิบายผลที่เกิดขึ้นว่าเกิดจากพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีนที่เกิดขึ้นระหว่างการเก็บข้าวถูกทำลายไป โดยการปรับปรุงคุณภาพของข้าวทำให้มีเนื้อสัมผัสที่ดีขึ้นได้

จากงานวิจัยและผลการศึกษาที่กล่าวมาแล้วนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่อยู่ภายในเมล็ดข้าวมีผลต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของข้าว ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในเชิงคุณภาพและปริมาณนั้นเกิดขึ้นเมื่ออุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาข้าวเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดคุณลักษณะของข้าวไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคโดยเฉพาะคุณภาพการหุงต้ม การปรับปรุงคุณภาพการหุงต้มของข้าวเก่าที่เก็บไว้เป็นระยะเวลานานและไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค ให้มีลักษณะเนื้อสัมผัสเหมือนหรือใกล้เคียงกับข้าวที่ผู้บริโภคต้องการจึงถือเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ ซึ่งการนำสารในกลุ่มของรีดิวซิงซ์มาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพข้าวถือเป็นอีกหนทางเลือกสำหรับปรับปรุงคุณภาพข้าว ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาอย่างจริงจังถึงประสิทธิภาพ และความเหมาะสมของสารรีดิวซิงซ์แต่ละตัว รวมไปถึงปริมาณที่เหมาะสมจะนำมาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพข้าวเก่า และผลที่เกิดขึ้นในทางกายภาพและเคมีของเมล็ดข้าวจากการใช้สารรีดิวซิงซ์ เพื่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจถึงการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเคมีกายภาพ และลักษณะเนื้อสัมผัสของข้าวในระหว่างการเก็บรักษา รวมถึงผลของการใช้สารรีดิวซิงซ์ต่อคุณสมบัติต่าง ๆ ของข้าวในระหว่างการเก็บรักษา

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของข้าวที่เกิดขึ้นก่อนและหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิการเก็บรักษาต่างกัน และผลที่เกิดขึ้นในข้าวเร่งความเก่า

1.2.2 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของโปรตีนที่เกิดขึ้นภายหลังการเก็บรักษา

1.2.3 เพื่อศึกษาหาสภาวะการใช้สารรีดิวซิงซ์จำนวน 2-3 ชนิดต่อการปรับปรุงเนื้อสัมผัส และคุณสมบัติการเกิดเพสท์ของข้าวเก่าพันธุ์หอมมะลิ105

1.2.4 เพื่อศึกษาผลของชนิดต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของโปรตีน

1.3 สมมุติฐานของงานวิจัย

การเก็บรักษาข้าวสภาวะการต่างกันมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางกายภาพของ และเคมีของข้าวที่ต่างกันด้วย โปรตีนในข้าวจะมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพเกิดขึ้นหลังการ เก็บซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ส่งผลต่อค่าเนื้อสัมผัส และคุณสมบัติในการเกิดเพสท์ของข้าว, สารรีดิวซิงซ์ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและขนาดของโปรตีนที่มีในข้าว จึงอาจทำให้ข้าวเก่ามี ลักษณะเนื้อสัมผัสเหมือนหรือคล้ายคลึงกับข้าวใหม่ โดยสารรีดิวซิงซ์แต่ละชนิดอาจให้ผลในการ ปรับปรุงเนื้อสัมผัสข้าวสุกแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปริมาณ และระยะเวลาที่ใช้แช่ข้าว

1.4 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพ และเคมี เนื้อสัมผัสของ ข้าวสุก และคุณสมบัติการเกิดเพสท์ ของข้าวภายหลังการเก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เปรียบเทียบ กันระหว่างฟลาร์วกับสตาร์ช ในส่วนของโปรตีนทำการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงโปรตีนก่อน และหลังการเก็บจากข้าวโดยศึกษาความสามารถในการละลาย ค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิก ปริมาณหมู่ได ซัลไฟด์ และขนาดโมเลกุลของโปรตีนทั้งในข้าวสารและข้าวสุก จากนั้นศึกษา ชนิด ปริมาณของ สารรีดิวซิงซ์ที่มีผลต่อเนื้อสัมผัสของข้าว และคุณสมบัติการเกิดเพสท์ รวมไปถึงผลต่อคุณสมบัติ ของโปรตีนดังที่กล่าวมาข้างต้น

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบถึงคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของข้าวที่เก็บในสภาวะต่างกัน โดยสามารถ นำผลที่ได้มาประกอบการตัดสินใจ ในการเลือกสภาวะการเก็บที่จะให้คุณภาพของข้าว เพื่อต้องการ ปรับเปลี่ยนคุณภาพข้าวเก่าให้ได้ตามต้องการ

1.5.2 เพื่อสร้างองค์ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของ โปรตีนภายหลัง การเก็บรักษา อันก่อให้เกิดความเข้าใจในเรื่องผลของโปรตีนที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของ ข้าวภายหลังการเก็บ และผลของสารรีดิวซิงซ์ที่มีต่อโปรตีนข้าวเก่าซึ่งนำไปสู่การประยุกต์ใช้ สารรีดิวซิงซ์ในข้าวเก่า

1.5.3 ทราบถึงปริมาณ และชนิดของสารรีดิวซิงซ์ ที่เหมาะสมและให้ประสิทธิภาพสูงสุด ในการปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของข้าวเก่าให้มีลักษณะเหมือนข้าวใหม่ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงคุณลักษณะเนื้อสัมผัสของข้าวเก่าต่อไป

1.6 รายการอ้างอิง

- งามชื่น คงเสรี และ กิตติยา กิจวรดี (2545). **คุณภาพข้าวและการตรวจสอบข้าวปนในข้าวหอมมะลิไทย**. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ; สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : จริวิวัฒน์เอ็กซ์เพรส.
- งามชื่น คงเสรี. (2551). กลยุทธ์การเพิ่มศักยภาพการส่งออกสู่ตลาดคุณภาพ. **ข้าว: ผลิตภัณ์จากข้าว** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://library.uru.ac.th/webdb/images/rice_potential_development.html.
- มาลินี อัสวดิษฐ์เลิศ และ ศิริพร วัฒนศรีรังกุล. (2550). **ข้าวทนน้ำท่วม: ทางเลือกใหม่เพื่อชาวนาและคนไทย**, ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.nstda.or.th/th/index.php?option=com_content&task=blogsection&id=7&Itemid=61&limit=9&limitstart=9
- มรกต ดันติเจริญ. (2548). ความหลากหลายทางพันธุกรรมในข้าวพื้นเมืองกับการพัฒนาในระบบปลูกข้าวไทย. ใน ยอดหทัย เทพธรา และ กัญญวิมว กิริติกร (บรรณาธิการ). **ข้าว มั่น กุ้ง: ผลผลิตคู่ชีวิตคนไทย** (หน้า 187). กรุงเทพฯ: มูลนิธิบัณฑิตยสภาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.
- อรอนงค์ นัยวิกุล. (2550). **ข้าว : วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 30.
- ศรีศักร วัลลิโภดม. (2548). ประวัติศาสตร์ข้าวในประเทศไทย. ใน ยอดหทัย เทพธรา และ กัญญวิมว กิริติกร (บรรณาธิการ). **ข้าว มั่น กุ้ง: ผลผลิตคู่ชีวิตคนไทย** (หน้า 187). กรุงเทพฯ: มูลนิธิบัณฑิตยสภาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.
- Benjakul, S., Thongkaew, S. and Vissessanguan, W. (2005). Effect of reducing agents on physicochemical properties and gel-forming ability of surimi produced from frozen fish. **European Food Research and Technology** 220: 316-321.
- Chrastil, J. (1990). Protein-starch in rice grains: Influence of storage on oryzenin and starch. **J. Journal of Agricultural and Food Chemistry** 38: 1804-1809.
- Charstil, J and Zarins, Z.M. (1992). Influence of Storage on Peptide Subunit Composition of Rice Oryzenin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 40(6): 927-930.

- Fitzgerald, M.A. and Reinke, R.F. (2006). Effect of protein and nutrition on cooking quality. **Rice grain quality III**. NSW: RIRDC.
- Gujral, H.S. and Kumar, V. (2003). Effect of accelerated aging on the physicochemical and textural properties of brown and milled rice. **Journal of Food Engineering**. 59: 117-121
- Hamaker, B.R. and Griffin, V.K. (1990). Changing the viscoelastic properties of cooked rice through protein disruption. **Cereal Chemistry** 67(3): 261-264.
- Juliano, O.B. (1985). **Rice chemistry and technology**. USA: The American Association of Cereal Chemists.
- Okadome, H., Kurihara, M., Kusuda, O., Toyoshima, H., Kim, J., Shimotsubo, K., Mastuda, T. and Ohtubo, K. (1999). Measurements of physical properties of cooked grains with different nitrogenous fertilizers. **Japanese Journal of Crop Science** 68(2): 211-216.
- Ohno, T. and Ohisa, N. (2005). Studies of Textural and Chemical Changes in Aged Rice Grains. **Journal of Food Science & Technology**. 11(4): 385-389.
- Ohno, T., Tomatsu, M., Toeda, K. And Ohisa, N. (2007). Texture of cooked rice prepared from aged rice and its improvement by reducing agents. **Bioscience Biotechnology & Biochemistry** 71(12). 2912-2920.
- Onate, L.U., Del Mundo, A.M. and Juliano, B.O. (1978). Relationship between protein content and eating quality of milled rice. **Philippine agricultural scientist** 47: 441.
- Prudencio-Ferreira, S.H. and Areas, J.A.G. (1993). Protein-protein interactions in the extrusion of soya at various temperatures and moisture contents. **Journal of Food Science** 58: 378-384.
- Saleh, M.I. and J.-F. Meullenet. 2007. The effect of moisture content at harvest and degree of milling (based on surface lipid content) on the texture properties of cooked long-grain rice. **Cereal Chemistry**. 84(2):119-124.
- Tamaki, M., Ebata, M., Tashiro, T. And Ishikawa, M. (1993). Physico-ecological studies on quality formation of rice kernel. II. Changes in quality of rice kernel during grain. **Japanese Journal of Crop Science** 62(4): 540-546.
- Teo, C.H., Karim, A.A., Cheah, P.B., Norziah, M.H. and Seow, C.C. (2000). On the roles of protein and starch in the aging of non-waxy rice flour. **Food Chemistry**. 67: 229-236.
- Xie, L., Chen, N., Duan, B., Zhu, Z. and Liao, X. (2008). Impact of proteins on pasting and cooking properties of waxy and non-waxy rice. **Journal of Cereal Science** 47: 372-379.
- Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S., Blanchard, C. and Baxter, G. (2003). Rice Aging. I. Effect of changes in protein on starch behaviour. **Starch/Starke**. 55(3-4): 162-169.

บทที่ 2

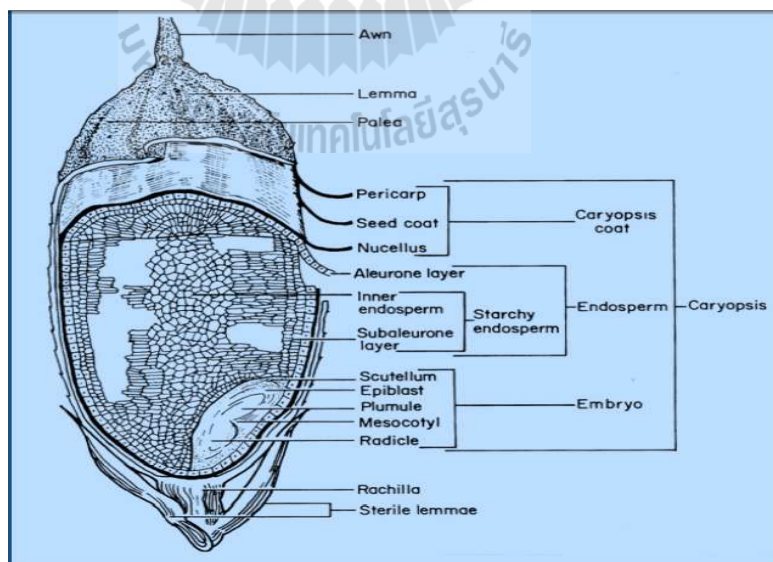
ปรัทัศนัวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว

เมล็ดข้าว (rice grain, rice seed หรือ rice fruit) ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก ดังนี้

2.1.1 แกลบ (hull, husk)

แกลบ หรือ เปลือกหุ้มเมล็ด ทำหน้าที่ห่อหุ้มเมล็ดข้าว ป้องกันการเปลี่ยนแปลง หรือการสูญเสียความชื้นของเมล็ด และการกัดทำลายของแมลง โดยมีคิดเป็นสัดส่วนต่อน้ำหนัก ข้าวเปลือกทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 18-20 (Kestin, Moss, Clifton, and Nestel, 1990; Yoshida, 1981) มีคุณค่าทางอาหารต่ำเพราะประกอบด้วย ซิลิกา , crude และ dietary ไฟเบอร์ ในปริมาณสูงเมื่อเทียบกับ สตาร์ช โปรตีน ไขมัน และแร่ธาตุต่าง ๆ (Kestin et al, 1990; Marshall and Wadsworth, 1994) มีส่วนน้อยที่ใช้ รองพื้นโรงเรือนเลี้ยงไก่ หรือใช้เป็นแหล่งอาหารหยาบของสัตว์บางประเภท และในบางประเทศนำไปใช้เป็นแหล่งเชื้อเพลิง (Marshall and Wadsworth, 1994)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างเมล็ดข้าว

ที่มา: Agriwork, www, 2010

2.1.2 ผลแท้ (true fruit หรือ caryopsis grain)

ผลแท้ หรือ ข้าวกล้อง (caryopsis or brown rice) (Juliano, 1985) ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก ได้แก่ เอ็มบริโอ (embryo หรือ germ) และเอ็นโดสเปิร์ม (endosperm) (Blakeney, 1996) ซึ่งจะถูกลอกหุ้มไว้ด้วยชั้นที่มีลักษณะแตกต่างกัน 4 ชั้น ได้แก่ pericarp, seed coat, nucellus และ aleurone ตามลำดับ (Marshall and Wadsworth, 1994)

เนื่องจากข้าวขาวนิยมนำมาใช้ และบริโภคมากกว่าข้าวกล้องจึงถูกนำไปผ่านกระบวนการขัดสี (Luh, Barber, S. and Berber, C. 1991) เพื่อกำจัดส่วนของเยื่อหุ้มทั้ง 4 ออก โดยแยกออกได้อีก 2 ส่วน คือ รำ (bran) และข้าวขาว (milled rice หรือ starchy endosperm) โดยแต่ละส่วนของข้าวจะมีสารอาหารต่าง ๆ แสดงให้เห็นในตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 2.1 ร้อยละส่วนประกอบโดยประมาณของส่วนต่าง ๆ ของในเมล็ดข้าวคิดเทียบเป็นน้ำหนักแห้ง

ส่วนประกอบ	ข้าวเปลือก	ข้าวกล้อง	ข้าวขาว	แกลบ	รำ	เอ็มบริโอ
คาร์โบไฮเดรต	62.1	77.2	90.2	1.8	2.4	48.3-55.4
ไขมัน	2.1-2.7	2.1-3.3	0.4-0.6	0.4-0.7	19.3-23.8	11.7-14.4
โปรตีน (N x 5.95)	6.7-8.3	8.3-9.6	7.3-8.3	2.3-3.2	13.2-23.9	13.0-14.4
เส้นใย (crude fiber)	8.4-12.1	0.7-1.2	0.3-0.6	40.1-53.4	2.8-4.1	2.7-3.7
เถ้า	3.4-6.0	1.2-1.8	0.4-0.9	15.3-24.4	6.8-10.1	6.1-8.5
ใยอาหาร (dietary fiber)	19.1	4.5	2.7	77.3	-	-

ที่มา: Pomeranz และ Ory. (1982)

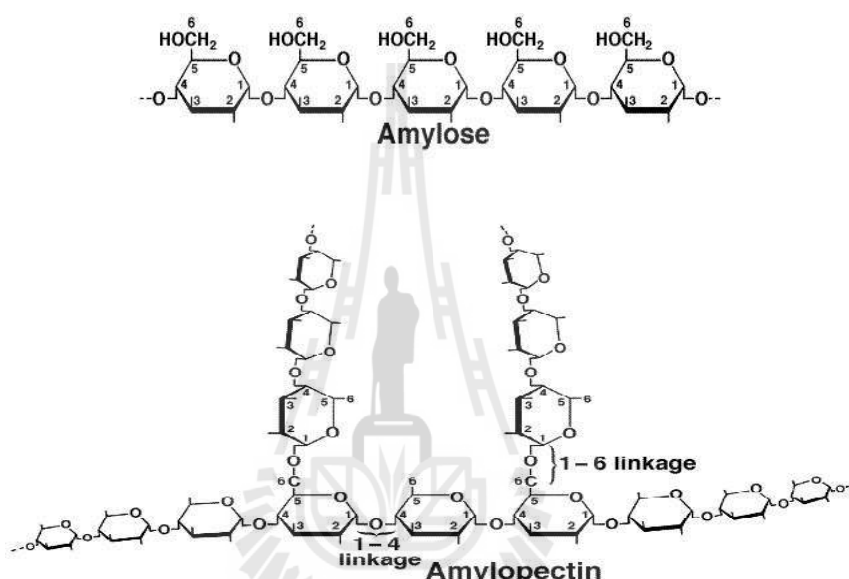
คุณภาพของข้าวนั้น ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีในเมล็ดข้าว ซึ่งได้แก่ โปรตีนไขมัน คาร์โบไฮเดรต (Juliano, 1985) และน้ำ หรือ ความชื้น (อรอนงค์, 2550) โดยจะอธิบายโดยละเอียดได้ดังนี้

2.2 องค์ประกอบเคมี

2.2.1 คาร์โบไฮเดรต

พบมากที่สุดในเมล็ดข้าว โดยคิดเป็นร้อยละ 90 คาร์โบไฮเดรต หรือสตาร์ช คือพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทหนึ่ง ซึ่งโมเลกุลของสตาร์ชจะรวมตัวกันเกิดเป็นกลุ่มก้อนที่เรียกว่า เม็ดสตาร์ช

(Starch Granules) มีขนาดเล็กเท่ากับ 3 -5 ไมครอน มีลักษณะเป็นรูปร่างหลายเหลี่ยม โดยเม็ดสตาร์ช จะรวมตัวกันเป็นกลุ่มประมาณ 20-60 granules อยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่า แอมิโลพาลัส มีขนาดตั้งแต่ 7 ถึง 39 ไมครอน (Champagne, 1980; Hoshikawa, 1968; Hayakawa, Seo and Igave, 1980) โดยในเม็ดสตาร์ชประกอบด้วยสายพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด ที่มีลักษณะทางโครงสร้างแตกต่างกัน คือ อะไมโลส (amylose) เป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นของกลูโคสที่มีหลายรูปแบบ ทั้งสายตรง พันเกลียว หรือสายเกลียวคู่ หรือแบบไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4 และ



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน

ที่มา: Moore, Clark and Vodopich, www, 1998

อะไมโลเพคติน (amylopectin) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์แบบมีกิ่งก้านในลักษณะโซ่กิ่งเกลียวคู่ ที่เชื่อมกึ่งด้วยพันธะแอลฟา-1,6 ที่เรียกว่า อะไมโลเพคติน ทั้งนี้บางส่วนของสายอะไมโลสอาจมีกิ่งก้านอยู่เล็กน้อย โดยทั้งอะไมโลส และอะไมโลเพคตินมีการจัดเรียงตัวกันแน่นรอบจุดกึ่งกลางของเม็ดสตาร์ชตามแนวรัศมี โดยอะไมโลส และอะไมโลเพคตินสายตรงยังสามารถรวมตัวกับลิปิดได้ด้วย โดยในปี 1996 Juliano ได้แบ่งกลุ่ม ของข้าวหรือแป้งข้าวออกตามปริมาณอะไมโลสได้ 4 กลุ่ม คือ waxy (ร้อยละ 1-2), low (ร้อยละ 7-20), intermediate (ร้อยละ 20-25) และ High (มากกว่า 25) โดยคิดเทียบจากสตาร์ช ร้อยละ 100 โดยอาศัยการวัดสีน้ำเงินที่เกิดจากสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไอโอดีนกับอะไมโลส โดยสัดส่วนของอะไมโลสที่ต่างกันมีผลต่อคุณภาพการหุงต้ม และคุณภาพการกินตลอดจนการนำไปใช้ประโยชน์

2.2.2 ลิพิด

พบปริมาณน้อยในกลุ่มของธัญพืชทั่วไปที่ยังไม่ผ่านการขัดสี รวมถึงข้าวโดยในเมล็ดอยู่ที่ร้อยละ 3 พบว่าไขมันจะลดจำนวนลงเกือบครึ่งหลังผ่านการขัดสี (Fujino, Kuwata, Mano, Ohnishi, 1996) โดยข้าวขาวที่ผ่านการขัดสีแล้วจะมีไขมันเหลืออยู่เพียงร้อยละ 0.3-0.5 เท่านั้น (Hoseney, 1986) ไขมันจะกระจายตัวอยู่ทั่วไปในเมล็ดข้าว พบมากสุดในส่วนของรำ และเจิร์ม ไขมันในข้าวแบ่งออกเป็น 2 ประเภทได้แก่ nonstarch lipids ที่กระจายตัวอยู่ในส่วนของ ชั้น aleurone เจริม และโปรตีน, และ starch lipids ซึ่งอยู่ทั้งภายในและภายนอกเมล็ดสตาร์ชทั้งที่อยู่ชิดกับเมล็ดสตาร์ชและที่บริเวณผิว (Choudhury and Juliano, 1980) มีทั้งที่เป็นไขมันสายตรง (straight-chain) และมีกิ่งก้าน (branch chain) (Fujino, 1989) โดยแยกย่อยออกเป็นชนิดไม่มีขั้ว เช่น กรดไขมัน และ ไตรกลีเซอไรด์ และชนิดมีขั้ว เช่น ฟอสโฟลิพิด และไกลโคลิพิด โดยไขมันในข้าวส่วนใหญ่เป็น ไตรกลีเซอไรด์ (Henry and Kettlewell, 1996) ไขมันสามารถรวมตัวกับโมเลกุลของสตาร์ช โดยไขมันที่อยู่ด้านนอกจะจับกับปลายสายของอะไมโลเพกตินที่ผิวหน้าของสตาร์ช ขณะที่ไขมันภายในเมล็ดสตาร์ชรวมตัวอย่างแน่นหนา กับสายเกลียวของอะไมโลสเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ที่เรียกว่า amylose-lipid complex (Ito, Sato and Fujino, 1979)

2.2.3 โปรตีน

ข้าวเป็นธัญพืชที่มีโปรตีนในปริมาณค่อนข้างต่ำ ซึ่งข้าวแต่ละพันธุ์จะมีโปรตีนในปริมาณที่มากน้อยแตกต่างกันไป โดยในข้าวขาวจะมีปริมาณโปรตีนค่าเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 8 ซึ่งส่วนใหญ่พบที่เอ็นโดสเปิร์มคิดเป็นร้อยละ 95 และอยู่ในรูปของโปรตีนบอดี (protein bodies) มีขนาดตั้งแต่ 1-4 ไมครอน (Lasztity, 1996) Osborne (1924) ได้แบ่งประเภทของโปรตีนตามคุณสมบัติการละลายออกเป็น 4 ชนิด คือ 1.โปรตีนที่ละลายได้ในน้ำ เรียกว่า อัลบูมิน (albumin) 2. โปรตีนที่ละลายในสารละลายเกลือ เรียกว่า โกลบูลิน (globulin) 3. โปรตีนที่ละลายในสารละลายแอลกอฮอล์ เรียกว่า โปรลามิน (prolamin) 4. โปรตีนที่ละลายได้ในด่าง เรียกว่า กลูตลีน (glutelin) หรือเรียกอีกชื่อว่า ออไรซินิน (oryzenin) ซึ่งกลูตลีน ถือเป็นโปรตีนหลักในข้าว (storage protein) เพราะมีปริมาณสูงสุดคิดเป็น ร้อยละ 60-90 และยังเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพสูง เนื่องจากภายในโครงสร้างมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายอยู่ในปริมาณสูง เมื่อเทียบกับโปรตีนจากธัญพืชแหล่งอื่น ๆ โดยจากการศึกษาของ Saito และคณะ (2010) พบว่า การกระจายตัวของโปรตีนในเมล็ดข้าวไม่สม่ำเสมอโดยที่บริเวณผิวด้านนอกจะมีโปรตีนอยู่หนาแน่น โดยเฉพาะที่ชั้นแอรูโรน (aleurone) ความหนาแน่นของโปรตีนจะลด ลงเรื่อย ๆ เมื่อเข้าสู่ภายในใจกลางของเอ็นโดสเปิร์ม โปรตีนแต่ละชนิดก็จะมีการกระจายตัวภายในเมล็ดข้าวแตกต่างกัน โดยโปรตีนอัลบูมิน และ โกลบูลิน นั้นพบมากที่บริเวณเจิร์ม และชั้น aleurone ขณะที่โปรตีนกลูตลีน และโปรลามิน จะพบมากที่บริเวณเอ็นโดสเปิร์ม โดยรูปร่าง

ของโปรตีนที่อยู่ภายในเมล็ดข้าวนั้นมีทั้งแบบที่เป็นทรงกลม (spherical) และผลึก (crystalline) โดยจะพบมากเฉพาะทรงกลมที่มีขนาดเล็ก กระจายอยู่ทั่วไปภายในเมล็ดข้าวโมเลกุลโปรตีนสามารถเชื่อมเข้าหากันด้วยโปรตีนร่างแหที่มีลักษณะของคล้ายเส้นใย (protein fibrils) โมเลกุลโปรตีนจะแทรกตัวอยู่ระหว่างเม็ดสตาร์ช และมีบางส่วนที่สามารถเชื่อมโยงกับโมเลกุลของสตาร์ชด้วย (Marshall and Wadsworth, 1994) โดยกลุ่มโปรตีนแต่ละชนิดล้วนมีลักษณะโครงสร้าง และองค์ประกอบที่แตกต่างกันไป ดังนี้

อัลบูมิน (Albumin) เป็นกลุ่มโปรตีนทรงกลมที่มีขนาดเล็ก ซึ่งมีกรดอะมิโนซิสทีนอยู่ภายในโครงสร้าง (Shewry, Napier and Tatham, 1995) ประกอบด้วยโปรตีนขนาดต่าง ๆ กัน อยู่ในช่วง 10-200 กิโลดาลตัน จากการศึกษาขนาดโมเลกุลด้วยเทคนิค เจลฟิวเตรชัน โครมาโทกราฟี (คอลัมน์ เซฟาเดกซ์ จี-100) ในการแยก พบว่าประกอบด้วยโปรตีนที่เป็นหน่วยย่อย 3 ถึง 4 หน่วย ขณะที่การใช้เทคนิคพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE) กลับพบโปรตีนหน่วยย่อยถึง 9-11 หน่วย (Lasztity, 1996) โดยขนาดและปริมาณของหน่วยย่อยอาจแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดและพันธุ์ข้าว โปรตีนอัลบูมินประกอบด้วยกรดอะมิโนไลซีนในปริมาณสูงสุด ขณะที่กรดอะมิโนกลูตามิกมีในปริมาณต่ำสุด ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว โปรตีนอัลบูมิน คือกลุ่มของเอ็นไซม์ แอคทีฟโปรตีน และฮิสโตน โดยการสกัดอัลบูมินด้วยน้ำอาจมีโกลบูลินบางส่วนปะปนออกมาด้วย (Juliano, 1985)

โกลบูลิน (globulin) โดยปกติแล้วจะพบมากในกลุ่มพืชใบเลี้ยงคู่ แต่ก็ยังสามารถพบได้ในกลุ่มธัญพืช รวมทั้งข้าวซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Shewry et al, 1995) ซึ่งถือเป็นโปรตีนที่มีปริมาณมากเป็นอันดับสองรองจากกลูเตลิน (Juliano, 1985; Agboola, Ng and Mills, 2005) โดยคิดเป็นร้อยละ 10-12 ของโปรตีนทั้งหมดที่พบในเมล็ดข้าว (Ju, Hettiarachchy and Rath, 2001) ประมาณเกือบร้อยละ 70-80 ของโกลบูลินจะกระจายตัวอยู่ในเอ็นโดสเปิร์ม ซึ่งได้แก่โปรตีน 11S และ 12S ที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 55 กิโลดาลตัน โดยสามารถแยกโปรตีนออกเป็น 2 หน่วยย่อยคือ หน่วยย่อยที่เป็นกรด และหน่วยย่อยที่เป็นเบส ที่มีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 28-31 กิโลดาลตัน และ 20-22 กิโลดาลตัน ตามลำดับโดยที่หน่วยย่อยเหล่านี้เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Shotwell, 1999 quoted in Shewry and Halford, 2002 ; Takaiwa, Ogawa and Okita, 1999 quoted in Shewry and Halford, 2002) นอกจากนี้ยังพบโปรตีนกลุ่มอื่นที่เป็น 3 หน่วยย่อย คือ แอลฟา1 แอลฟา2 และแอลฟา3 ซึ่งมีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันอยู่ที่ 16-130 กิโลดาลตัน โปรตีนในกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนกลูตามิกและอาร์จินีนในปริมาณที่สูง (Lasztity, 1996) โครงสร้างโดยรวมของโปรตีนโกลบูลินในข้าวนี้คล้ายคลึงกับโปรตีนกลูเตลินที่พบในในเมล็ดข้าวสาลี โดยประกอบด้วยสายพอลิเมอร์ของโปรตีน ซึ่งมีการเชื่อมต่อกันระหว่างสายโปรตีนด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Huston and Mohammad, 1976; Cagampang, Perdon and Juliano, 1976) เมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างของ

โปรตีนชนิดนี้ด้วย เทคนิคFT-IR พบว่าโครงสร้างส่วนใหญ่คิดเป็น50 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปเป็นลักษณะเบต้าชีต (beta-sheet) ซึ่งเหมือนกับโปรตีนโกลบูลินที่พบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวทั่วไปอีกร้อยละ 30 เป็นโครงสร้างแบบแอลฟา-เฮลิคส์ (alpha-helices) และร้อยละ 20 เป็นโครงสร้างเรณดอมคอยด์ (random coils) ตามลำดับ โดยจุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric) ของโปรตีนโกลบูลินจะอยู่ในช่วงพีเอช 5-7 ซึ่ง โดยค่าพีเอชของสารละลายโปรตีน ความเข้มข้นของสารละลายเกลือ รวมถึงความร้อน ถือเป็นปัจจัยหลักมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโกลบูลินทั้งสิ้น นอกจากนี้ยังพบว่า การเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) เข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ทำให้โปรตีนเปิดตัว ขณะที่โครงสร้างเบต้า-ชีต จะถูกทำลายลงเมื่อมีการเติมสารละลายไดไทโอไธทอล (DTT) เข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ (Ellepola, Choi, Young-Ma, 2005)

โพรลามิน (prolamin) โพรลามินเป็นกลุ่มโปรตีนที่พบในพืชตระกูลหญ้า และธัญพืชอีกหลายชนิดรวมถึงข้าว โดยปกติแล้วจะมีปริมาณมากถึงหนึ่งในส่วนของโปรตีนทั้งหมดที่มีในธัญพืชทั่วไป ยกเว้น ข้าวโอ๊ตและข้าว ที่มีอยู่เพียงร้อยละ 5-10 โปรตีนกลุ่มนี้จะละลายในเอทานอล เข้มข้นร้อยละ 60-70 หรือละลายในโพรเพน-1-อล (propan-1-ol) ร้อยละ 50 พอลิเมอร์ของโพรลามินประกอบด้วยกรดอะมิโนกลูตามีน และโกลีนในปริมาณที่สูง ขณะที่พบไลซีน และทรีปโตเฟน ในปริมาณที่ต่ำ สายพอลิเมอร์ของโพรลามินนั้นเชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Shewry et al. 1995) ทั้งนี้โพรลามินที่พบในข้าวจะมีปริมาณต่ำกว่าธัญพืชชนิดอื่นก็ตาม (Lasztity, 1996) แม้ว่าในข้าวจะมีปริมาณมากเป็นอันดับสองรองจากกลูเตลิน (Evers, Blakeney and O'Brien, 1999; Takaiwa, 1998 quoted in Shimamoto,K) โดยขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 13 ถึง 16 กิโลดาลตัน (Luthe, 1992 quoted in Linskens and Jackson, 1992) ภายในโครงสร้างโปรตีนประกอบด้วยแอลฟา-เฮลิคส์ และเรณดอมคอยด์เป็นส่วนใหญ่ (Y. Mawal, M. Mawal, Sainani and Ranjekar, 1990)

กลูเตลิน (glutelin) จัดเป็นกลุ่มโปรตีนโมเลกุลใหญ่ (High molecular weight storage protein) และมีปริมาณมากที่สุด จึงถือว่าเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในเมล็ดข้าว โมเลกุลของกลูเตลินที่แยกได้ด้วยเจลฟิวเรชั่น โครมาโตกราฟีโดยใช้คอลัมน์เซฟาโรส (gel filtration chromatography on Sepharose columns) นั้นมีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ 10^5 และที่ใหญ่กว่า 10^7 ดาลตันโดยมีพันธะไดซัลไฟด์ เป็นพันธะหลักในการเชื่อมระหว่างโมเลกุล ของโปรตีน ซึ่งการใช้สารรีดิวซิงซ์ เช่น 2-เมอร์แคปโทเอทานอล (2-mercaptoethanol) มีผลในการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ ทำให้กลูเตลินมีขนาดโมเลกุลเล็กลงเท่ากับ 60 กิโลดาลตัน (Lasztity, 1996)โปรตีนที่ผ่านตัดทำลายพันธะไดซัลไฟด์แล้ว เมื่อนำมาแยกขนาดด้วยเทคนิค SDS-PAGE จะพบกลุ่มของกลูเตลิน 5 กลุ่ม ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาดเล็กโมเลกุลเท่ากับ 22, 37, 38, 39 และ 57 กิโลดาลตัน ตามลำดับ Tanaka, Sugimoto, Ogawa และ Kasai (1980) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนกลูเตลินที่พบได้ในข้าวนั้นประกอบขึ้นจากหน่วยย่อยขนาดเล็กของโปรตีนหลาย ๆ หน่วยที่ต่างกัน

โดยแบ่งแยกหน่วยเล็กเหล่านี้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ acidic (α) subunits ที่มีขนาดโมเลกุล 40 ถึง 60 กิโลดาลตัน และ basic (β) subunits ที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 20 กิโลดาลตัน หน่วยย่อยกลูติลินเหล่านี้ จะเชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์เกิดเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ประมาณ 360 กิโลดาลตัน โดย Beveridge, Toma และ Nakai (1974) อธิบายว่าหนึ่งโมเลกุลของกลูติลินประกอบด้วย หมู่ซัลไฮโดรไรอิสระ (SH) จำนวน 1.4 หมู่ และมีพันธะไดซัลไฟด์ (SS) เท่ากับ 1.1 พันธะ แสดงว่า acidic (α) และ basic (β) subunits ต่างประกอบด้วยหมู่ซัลไฮโดรไรและไดซัลไฟด์ (Luthe, 1992 quoted in Linskens and Jackson, 1992) โดย acidic (α) และ basic (β) subunits มีค่า isoelectric point อยู่ที่ 6.5 ถึง 7.5 และ 9.4 ถึง 10.3 ตามลำดับ (Wen and Luthe, 1985) โมเลกุลของกลูติลินจะบรรจุอยู่ในส่วนของโปรตีนบอดีII (PBII) (Tanaka et al, 1980) โดยในโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนกลูตามีน แอสพาราจีน ไกลซีน อาร์จินีน ลิวซีน และอะลานีนในปริมาณที่สูง (Wen and Luthe, 1985) แต่พบโพรลามีนในปริมาณที่ต่ำ (Laszity, 1996) โครงสร้างโปรตีนประกอบด้วย แอลฟา-เฮลิคส์ และเรนคอมคอยด์เป็นส่วนใหญ่ (Mawal, et al. 1990) โดยจากการศึกษาของนักวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าขนาดโมเลกุลและกรดอะมิโนของหน่วยย่อยแอลฟา และเบต้ากลูติลินที่พบในข้าวมีความใกล้เคียงทั้งขนาดโมเลกุล และชนิดกรดอะมิโนหน่วยย่อยแอลฟา และเบต้าโกลบูลินที่พบในเมล็ดธัญพืชชนิดอื่น (Luthe, 1983; Wright and Boulter, 1974) แสดงว่าโปรตีนกลูติลินที่พบในข้าวนี้มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนโกลบูลินที่เป็น storage protein ที่มีในเมล็ดธัญพืชชนิดอื่นอย่างมาก ยกเว้นคุณสมบัติการละลายที่แตกต่างกัน ซึ่งเกิดจากลักษณะโครงสร้างโปรตีนเองที่จับอยู่กับคาร์โบไฮเดรตในปฏิกิริยาไกลโคซิเลชัน (Wen and Luthe, 1985) โปรตีนทั้ง 4 ชนิดถือเป็นโปรตีนที่อยู่ภายนอกเม็ดสตาร์ช แต่ยังมีโปรตีนอีกประเภทหนึ่งที่เกี่ยวข้อง และพบได้ภายในเม็ดธัญพืชทั่วไปรวมทั้งข้าวด้วย ซึ่งก็คือ granular association protein

granular association protein คือ โปรตีนกลุ่มหนึ่ง ที่เกาะหรือเชื่อมกับเม็ดสตาร์ชอย่างแน่นหนา โดยแบ่งออกเป็นสองกลุ่มหลัก ๆ คือ 1. storage proteins คือ กลุ่มของโปรตีนเหลืออยู่หลังการสกัด และจะถูกดูดซับที่ผิวของสตาร์ช และ 2. starch granule-associated proteins (SGAPs) เป็นโปรตีนที่เกาะติดอยู่ที่ผิวหรือ รวมอยู่กับเม็ดสตาร์ช (Baldwin, 2001) โดยสตาร์ชของพืชหลายชนิดจะมีลักษณะและปริมาณของ SGSP แตกต่างกันไป โดยมีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 5-140 กิโลดาลตัน โดยกลุ่ม low molecular weight proteins ซึ่งมีโมเลกุลประมาณ 5-30 กิโลดาลตัน จัดเป็นโปรตีนในกลุ่ม surface granule associated proteins ขณะที่กลุ่ม high molecular weight proteins ที่มีโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 60-149 กิโลดาลตัน จัดเป็นโปรตีนในกลุ่ม internal granule associated proteins (Baldwin, 2001) การสกัดโปรตีนเหล่านี้ โดยกลุ่มของ surface โปรตีนสามารถสกัดด้วย สารละลายเกลือ (Lowry, Sargeant and Schofield, 1981; Rayas-Duarte, Robinson and Freeman, 1995) แอลกอฮอล์ (Morris, Greenblatt, Bettge and Malkawi, 1994) หรือ ดีเทอร์เจนต์

จำพวก SDS ที่มีการเติม 2-เมอร์แคปโทเอทานอล (Skerritt, Frend, Robson and Greenwell, 1990; Seguchi and Yamada, 1980) และ ไดไทโอไธเรออล (Dithiothreitol, DTT) (Skerritt et al, 1990) เป็นต้น ขณะที่ internal โปรตีนซึ่งอยู่ภายในเม็ดสตาร์ชและมีขนาดใหญ่ขึ้น ต้องอาศัย การพองตัวหรือการเกิดเจล ของเม็ดสตาร์ชก่อน โดยใช้อุณหภูมิตั้งแต่ 50 องศาเซลเซียสขึ้นไป ร่วมกับการใช้ตัวทำละลายจำพวก สารรีดิวซิงซ์ เช่น SDS (Skerritt et al, 1990; Sulaiman, and Morrison, 1990) DTT รวมทั้งยูเรียร่วมด้วย (Hamaker, Griffin and Moldenhauer, 1991) ซึ่งยูเรียจะทำลายโครงสร้างของสตาร์ชทำให้เกิดการพองตัวที่อุณหภูมิต่ำได้ (Shure, Wessler and Fedoroff, 1983) โดยนอกจากอุณหภูมิที่สูงแล้วการเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลาย มีผล ให้สามารถสกัดโปรตีนได้เพิ่มขึ้น (Schofield and Greenwell, 1987) นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้ เอนไซม์ในกลุ่ม starch-degrading enzymes เช่น porcine alpha-amylase ในการทำลาย โครงสร้างของสตาร์ชก็มีผลในการปลดปล่อย SGAP ออกจากเม็ดสตาร์ช ได้ในระดับหนึ่ง เช่นกัน (Denyer, Hylton, Jenner and Smith, 1995; McDonald and Preiss, 1985) ถึงแม้จะไม่ เทียบเท่ากับวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ ก็ตาม (Rahman et al, 1995) ส่วนของโปรตีนที่ สกัดออกมาได้นั้น สามารถแยกออกด้วยการตกตะกอนด้วย อะซิโตน อัตราส่วน 2 หรือ 4 เท่า ที่ อุณหภูมิ 4 ถึง -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Skerritt et al, 1990; Rahman et al, 1995) หรือ ตกตะกอนด้วย ไดเอทิล อีเทอร์/เอทานอล ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 (Oda and Schofield, 1997; Dubreil, Compoin and Marion, 1997) โดย granule associated proteins มีส่วนเกี่ยวข้องกับ คุณสมบัติทางความหนืดของสตาร์ชที่ถูกให้ความร้อน (Hongprabhas, Israkarn and Rattanawat tanaprakit, 2006) เม็ดสตาร์ชที่ไม่มี SGAP ในโครงสร้างจะแตกง่าย และไม่สามารถ คงรูปได้หลังผ่านการเจลาติไนซ์ (Han and Hamaker, 2002) โดย Oates (1990) ได้ให้คำอธิบาย ไว้ว่าการพองตัวเม็ดสตาร์ชในกลุ่ม legume ที่เกิดขึ้นได้น้อยนั้นเป็นผลมาจาก peptide bridges ของสายโปรตีน ช่วยยึดโครงสร้างของเม็ดสตาร์ช ทำให้เม็ดสตาร์ช คงรูปอยู่ได้ นอกจากนี้แล้ว การเติมสารบางอย่าง เพื่อวัตถุประสงค์ในการเชื่อมกันของโปรตีนที่อยู่ในเม็ดสตาร์ช ได้แก่ แคลเซียมแลคเตส นั้นสามารถช่วยรักษาโครงสร้างของสตาร์ชถั่วเขียวและมันสำปะหลังได้แก่ granule envelope และ starch ghost remnant (โครงสร้างของเม็ดสตาร์ชที่เหลืออยู่หลังจาก พอร์ลิเมอร์เกือบทั้งหมดภายในเม็ดสตาร์ช ถูกปลดปล่อยออกมา) ภายหลังให้ความร้อน เอาไว้ได้ (Israkarn, P. Hongprabhas and P. Hongprabhas, 2006) cysteine ถูกใช้เพื่อทำลาย พันธะไดซัลไฟด์ ของ SGAP ทำให้โครงสร้างเกิดการยืดหยุ่นมากขึ้นเม็ดสตาร์ชพองตัวได้ดีขึ้น และแตกตัวได้ดีขึ้นด้วย เมื่อให้ความร้อนแสดงให้เห็นว่า SGAP มีหน้าที่ส่วนหนึ่งในการรักษา โครงสร้างของเม็ดสตาร์ชให้หลงเหลือโครงร่างหรือคงรูปอยู่ได้หลังผ่านการเจลาติไนซ์ (Hamaker and Griffin, 1993)

2.2.4 น้ำ หรือความชื้น

น้ำเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพเมล็ดข้าว น้ำในข้าวมี 2 ประเภท คือ น้ำอิสระ (free water) คือ น้ำส่วนใหญ่ที่อยู่ในเมล็ด โดยน้ำส่วนนี้จะไม่เกิดพันธะ หรือรวมตัวกับองค์ประกอบอื่น ๆ ในเมล็ด น้ำส่วนนี้มักจะลดปริมาณลงไปเรื่อย ๆ จากการระเหยออกหรือการอบแห้งข้าวเพื่อไล่ความชื้นในกรณีที่เมล็ดข้าวมีความชื้นสูงเกินกำหนด และอีกประเภท คือ น้ำเกาะติด (bond water) แม้ว่าน้ำส่วนนี้จะมีปริมาณน้อย แต่ก็สามารถเชื่อมโยงกับองค์ประกอบอื่น ๆ อย่างแน่น และถูกกำจัดออกจากโครงสร้างหลักได้ยาก (Henry and Kettlewell, 1996) ความชื้นปกติของข้าวที่เก็บรักษาได้จะอยู่ที่ประมาณร้อยละ 13 และจะระเหยออกไปเรื่อย ๆ ในระหว่างการเก็บรักษา อย่างไรก็ตาม ความชื้นที่เหมาะสมในการรักษาข้าวให้คงคุณภาพได้นานจะอยู่ที่ร้อยละ 12 นอกจากนี้ความชื้นที่เหมาะสมในข้าวนั้นยังง่ายต่อการขัดสี ทำให้ได้ข้าวที่เต็มเมล็ด ทั้งนี้ปริมาณความชื้นที่มีในข้าวเปลือก และข้าวสาร ยังถูกใช้เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาคุณภาพข้าว ซึ่งสามารถบ่งชี้ถึงน้ำหนักแท้จริงของข้าวได้ จึงมีส่วนสำคัญในการกำหนดราคาซื้อขายข้าว (Juliano, 1985)

2.3 คุณภาพข้าว

ข้าว ถือว่าเป็นพืชที่แตกต่างจากธัญพืชชนิดอื่น ๆ เพราะจะถูกบริโภคในรูปแบบเมล็ดข้าวมากกว่าแบบอื่น ๆ การเลือกซื้อข้าวเพื่อนำมาบริโภคนั้น นอกจากชนิดหรือพันธุ์ข้าวที่ดีซึ่งต้องคำนึงถึงเป็นอันดับแรกแล้ว คุณภาพของเมล็ดข้าวก็เป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึง คุณภาพเมล็ดนั้นมีได้หลายความหมายขึ้นอยู่กับการศึกษาตามวัตถุประสงค์ หรือความต้องการของการนำไปใช้ว่าจะเกี่ยวข้องกับรวมถึงให้ความสำคัญกับคุณภาพแบบไหน ยกตัวอย่างเช่น ในเชิงการตลาดหรือการค้าข้าว ลักษณะปรากฏต่าง ๆ ของเมล็ดข้าวเป็นสิ่งที่ใช้บ่งบอกถึงคุณภาพข้าว ในกลุ่มอุตสาหกรรมการแปรรูปผู้ผลิตหรือเจ้าของโรงโม่แป้ง จะให้ความสำคัญกับคุณภาพของการขัดสี ส่วนของกลุ่มผู้ผลิตในอุตสาหกรรมอาหารจะให้ความสำคัญกับคุณภาพการแปรรูป ขณะที่นักโภชนาการก็จะให้ความสำคัญกับคุณภาพของข้าวในเรื่องคุณค่าสารอาหาร ในกลุ่มของผู้บริโภคเอง จะให้ความสำคัญกับคุณภาพการหุงต้ม และคุณภาพการกินเป็นหลัก ทั้งนี้คุณภาพข้าวที่ดี หรือด้อยนั้นจะมาจากความพอใจส่วนตัวของผู้บริโภคแต่ละคน ซึ่งโดยทั่วไปแล้วคุณภาพข้าวจะถูกแยกออกเป็นภาพกว้าง ๆ ได้ 4 ลักษณะ คือ 1. คุณภาพการขัดสี (milling quality) 2. คุณภาพการหุงต้ม คุณภาพการกิน คุณภาพการแปรรูป (cooking eating and processing quality) 3. คุณภาพด้านสารอาหาร (nutritive quality) 4. มาตรฐานความสะอาด ความสมบูรณ์ของเมล็ด และสิ่งปนเปื้อน (specific standards for cleanliness soundness and purity) (Web, 1991) โดยในหัวข้อนี้จะเน้นเฉพาะคุณภาพในข้อ 1 และ 2 เท่านั้น

ลักษณะปรากฏของเมล็ด (grain appearances) เช่น ขนาด รูปร่าง สีของเมล็ด ความใส ความเลื่อมมัน รวมถึงความสม่ำเสมอของเมล็ด เป็นสิ่งจำเป็นที่ผู้บริโภครู้จักในการพิจารณาในการเลือกซื้อ ซึ่งสามารถวัดคุณภาพได้ทั้งจากสายตาของผู้บริโภคเอง หรือจากการวัดด้วยเครื่องมือ (Ikehashi and Khush, 1979) เช่นนั้นแล้ว ข้าวเต็มเมล็ด จึงจัดเป็นข้าวที่มีคุณภาพสูง และเป็นที่ต้องการของผู้ขายและผู้บริโภค ซึ่งมีความสัมพันธ์ และเกี่ยวข้องโดยตรงกับคุณภาพการขัดสี (quality of milled rice) ขึ้นอยู่กับ รูปร่างหรือสรีรวิทยาของเมล็ดข้าว ลักษณะข้าวที่เป็นท้องไข (chalky grain) การทำแห้ง ความชื้นของเมล็ด รวมไปถึงคุณภาพ และประสิทธิภาพของเครื่องมือที่ใช้กระเทาะ ขัดสีใช้ด้วย

คุณภาพในการหุงต้ม (cooking quality) ถือว่ามีความสำคัญอย่างมากต่อการยอมรับของผู้บริโภค โดยคุณภาพข้าวหลังหุงสุก และคุณภาพการแปรรูปนั้น ส่วนหนึ่งมีผลมาจากพันธุ์ข้าวที่แตกต่างกัน ดังที่ได้กล่าวไปแล้วว่าผู้บริโภคที่ต่างกันย่อมต้องการข้าวในลักษณะต่างกันโดยขนาด หรือความยาวของเมล็ดที่ต่างกันนั้น ไม่สามารถเป็นเกณฑ์ที่ใช้บ่งบอกถึงคุณภาพของข้าวสุกที่ดีได้ คุณภาพการหุงต้มที่สัมพันธ์เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติทางเคมี และกายภาพภายในเมล็ดข้าว เนื่องจากเกือบร้อยละ 90 ของเมล็ดข้าวคือสตาร์ช Julianio, Bautista, Lugay และ Reyes (1964) รายงานว่า ปริมาณอะไมโลสในข้าวมีความสัมพันธ์เชิงบวก กับอุณหภูมิในการเกิดเจลลิตไนซ์ของสตาร์ชเอง โดยกลุ่มข้าวที่มีอะไมโลสในปริมาณสูงนั้น จะเป็นข้าวที่มีค่าอุณหภูมิในการเกิดเจลลิตไนซ์ที่สูงด้วย โดยผลจากการวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า ข้าวกลุ่มอะไมโลสสูง จะให้ลักษณะข้าวสุกที่ แห้ง แข็ง และร่วน ขณะที่ข้าวในกลุ่มอะไมโลสดำ จะให้ลักษณะข้าวสุกที่นุ่มเหนียว ซึ่งเกิดจากการเกิดเจลลิตไนซ์ของสตาร์ช โดยข้าวแต่ละชนิดมีอุณหภูมิการเกิดเจลลิตไนซ์แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับขนาดและองค์ประกอบภายในเมล็ดสตาร์ช คืออะไมโลสด้วย

การทราบถึงปริมาณอะไมโลส และอุณหภูมิในการเกิดเจลลิตไนซ์ของสตาร์ช ไม่สามารถบ่งบอกถึงคุณภาพการหุงต้มของข้าวได้เสมอไป Halick และ Kelly (1959) แสดงให้เห็นว่า ในข้าวสองพันธุ์ คือ Century Patna 231 กับ Toro ซึ่งมีปริมาณอะไมโลสเฉลี่ยเท่ากัน แต่กลับแสดงการเกิดเจลลิตไนซ์ของข้าวที่ต่างกัน ซึ่งมีผลต่อคุณภาพการหุงต้มที่ต่างกันอย่างน่าประหลาด แสดงให้เห็นว่าน่าจะมีปัจจัยหรือองค์ประกอบอื่นในข้าว เช่น ผนังหุ้ม (cell wall), คาร์โบไฮเดรต, แร่ธาตุ, ไขมัน รวมถึงโปรตีน ที่มีผลต่อการลักษณะการเกิดเจลลิตไนซ์ของสตาร์ช และคุณภาพการหุงต้มของข้าว นอกเหนือจากสตาร์ช (Dawson, Batcher and Little, 1960)

2.4 โปรตีนกับคุณภาพข้าว

โปรตีนมีผลต่อคุณภาพของข้าวโดยตรง โปรตีนจากข้าวถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของแหล่งโปรตีนคุณภาพสำหรับมนุษย์ เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนในธัญพืชชนิดอื่น เพราะมีกรดอะมิโนไลซีน

(lysine) ซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการในปริมาณสูงดังที่ได้กล่าวไปแล้วในหัวข้อที่เกี่ยวกับโปรตีน ก่อนหน้านี้ (IRRI, 1967) โปรตีนที่อยู่ภายในเมล็ดข้าวมีผลต่อลักษณะสีเหลืองของเมล็ดที่เกิดขึ้น หลังการเก็บ (Juliano, 1965) โปรตีนจะเพิ่มปริมาณขึ้นตามการเจริญของเมล็ดข้าว (Okabe, 1979) โดยการเพิ่มธาตุอาหารไนโตรเจนให้กับต้นข้าวในระหว่างที่ต้นข้าวมีการเจริญ ส่งผลให้กลูทีนที่เป็นกลุ่มโปรตีนหลักในเมล็ดข้าวเพิ่มปริมาณขึ้น และยังส่งผลให้ปริมาณโปรตีนเฉลี่ยของเมล็ดเพิ่มขึ้นด้วยตามลำดับ (Tamaki, Ebata, Tashiro and Ishikawa, 1989) ปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวสามารถสะท้อนถึงคุณภาพของข้าวซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับคุณภาพการกิน แสดงออกผ่านทางค่าเนื้อสัมผัสข้าวสุก โดยเมื่อเปรียบเทียบในข้าวพันธุ์เดียวกัน ที่มีปริมาณโปรตีนต่างกัน ข้าวที่มีโปรตีนร้อยละ 10 มีผลทำให้ค่าการเกาะติดกันของเมล็ดข้าว stickiness, chewiness และ adhesiveness ของข้าวสุกอยู่ในระดับที่ต่ำ (Yanase, Ohtsubo, Hashimoto, Sato and Taranishi, 1984) ขณะที่โปรตีนร้อยละ 6-8.5 ทำให้ค่าการเกาะติดกันของเมล็ดข้าว และ chewiness มีค่าสูงขึ้น (Tamaki et al, 1989) ซึ่งเป็นผลจากการกระตุ้นตัวของโปรตีนเป็นชั้น รอบ ๆ เม็ดสตาร์ช โดยเฉพาะโปรตีนที่อยู่ผิวด้านนอกของเมล็ดข้าว (Primo, Casas, S. Barber, and C.B. Barber, 1962) มีส่วนขัดขวางการดูดซับน้ำของเม็ดสตาร์ช (Yanase et al, 1984) ทำให้เม็ดสตาร์ชมีค่าการพองตัว (swelling) ต่ำ (Little and Dawson, 1960) เมื่อเปรียบเทียบข้าวชนิดเดียวกันที่มีอะไมโลสเท่ากันแสดงถึงเนื้อสัมผัสข้าวสุกที่ต่างกัน (Juliano et al, 1965; Onate, Mundo and Juliano, 1964) ข้าวที่มีโปรตีนสูงจะให้ค่า cohesiveness (Juliano et al, 1965) และการเกาะติดกันของเมล็ดข้าวสุก (Primo et al, 1962) ลดน้อยลง นอกจากนี้ปริมาณโปรตีนที่ต่างกันมีผลให้ระดับความแข็งของเมล็ดข้าวต่างกันส่งผลต่อคุณภาพการขัดสีที่ต่างกันด้วย (Juliano et al, 1965) และได้มีการศึกษาถึงอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสตาร์ช และโปรตีน โดยใช้การวิธีการจำลองระหว่างโปรตีนสกัด (กลูทีน) กับสตาร์ช และโปรตีนที่อยู่ในข้าวต่อการเกิดสตาร์ชเจลดิไนซ์ (Chrastil, 1990; Hamaker, Griffin and Moldenhauer, 1991; Juliano, Bautista, Lugay and Reyes, 1964) โดย Chrastil (1990) พบว่าการลดลงของ protein starch-binding ratio นั้นมีผลให้เกิดการลดลงของค่า stickiness ของแป้ง แม้ในการศึกษาผลโดยตรงของโปรตีนต่อการเกิดเจลดิไนซ์ของสตาร์ชในขณะหุงต้มข้าวนั้นยังคงมีข้อจำกัดในเรื่องการขาดเครื่องมือที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์หรือตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลง จากการรายงานของ Hamaker และ Griffin ในปี 1990 ซึ่งทดลองทำลายโครงสร้างของโปรตีนด้วยวิธีการทางเคมี โดยการเติมสารรีดิวซิงซ์ ซึ่งมีคุณสมบัติในการตัดพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งถือเป็นพันธะโควาเลนต์ที่แข็งแรงและมีหน้าที่ในการเชื่อมสายหรือโมเลกุลโปรตีนเข้าด้วยกัน และการเติมเอนไซม์โปรตีนเอสเพื่อย่อยโปรตีนในข้าวโดยใส่ในสารละลายที่ใช้หุงข้าว มีผลทำให้ค่าการเกาะติดกันของเมล็ดข้าวสุกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากพันธุ์ข้าว 7 พันธุ์ในทั้งหมด 9 พันธุ์ โดยลักษณะเนื้อสัมผัสของข้าวสุก

นั้นขึ้นกับ การพองตัว (swelling) และ การกระจายตัวของเม็ดสตาร์ชหลังการเจลาติไนซ์ (Tester and Morrison, 1990; Hamaker and Griffin, 1990; Deshpande and Bhattacharya, 1982) ซึ่งเกี่ยวข้องกับโดยตรงกับคุณสมบัติทางความหนืดของแป้งข้าว โดยผลของโปรตีนต่อคุณภาพของข้าวจึงถูกศึกษา และเปรียบเทียบความแตกต่างจากความหนืดร่วมด้วย โดย Hamaker และ Griffin ยังพบว่า แป้งข้าวอะไมโลสต่ำที่เติมไดโทโอริทอล หรือเอ็นไซม์โปรตีนเอส แสดงการเคลื่อนต่ำลงของเส้นกราฟความหนืดที่วัดด้วยเครื่องบาร์เบอร์เลนเดอร์ การลดลงของพิกความหนืดนี้แสดงว่า หลังทำลายโครงสร้างของโปรตีนแล้วมีผลทำให้เม็ดสตาร์ชเปราะ และแตกง่ายขึ้น โมเลกุลอะไมโลสจึงหลุดออกมาจากเม็ดสตาร์ชได้ง่ายโดยที่ระดับการพองตัวของเม็ดแป้งไม่จำเป็นต้องสูงมาก โปรตีนจึงมีส่วนสำคัญในการยึดโครงสร้างของสตาร์ชให้คงรูปอยู่ได้ในขณะได้รับความร้อนและแรงเฉือน อย่างไรก็ตามระดับการเกิดเจลาติไนซ์ของแป้งในกลุ่มที่มีอะไมโลสสูง กลับมีค่าสูงขึ้นใกล้เคียงกับความหนืดของแป้งข้าวอะไมโลสต่ำ แสดงให้เห็นว่าเม็ดแป้งสามารถพองตัวได้ดีขึ้นหลังจากใส่ เบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล ซึ่งเป็นสารรีดิวซิงซ์ลงไปในน้ำที่ผสมสำหรับวัดความหนืด ซึ่งเป็นผลมาจากการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีน เช่นกันโดยอาจมีความเกี่ยวข้องกับโปรตีนที่อยู่ในเม็ดสตาร์ช (Hamaker and Griffin, 1993) ก็ได้ แสดงให้เห็นว่าความแข็งแรงของเม็ดสตาร์ชนอกจากจะขึ้นกับองค์ประกอบและลักษณะเม็ดสตาร์ชแล้ว ผลส่วนหนึ่งยังมาจากโปรตีนด้วย โปรตีนจึงมีผลต่อการเกิดเจลาติไนซ์ของสตาร์ช และลักษณะเนื้อสัมผัสของเมล็ดข้าวสุก และแน่นอนว่าต้องสะท้อนถึงคุณภาพในการหุงต้มรวมถึงคุณภาพในการกินด้วย

2.5 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพข้าวระหว่างเก็บรักษา

หลังจากผ่านขั้นตอนการเก็บเกี่ยวจนได้ข้าวที่เป็นเมล็ดแล้ว ทั้งในรูปของข้าวสารและข้าวเปลือกที่มีปริมาณมากนี้จะถูกขายต่อให้กับโรงสี หรือพ่อค้าคนกลางเพื่อนำไปจัดจำหน่ายต่อไป หรือขายให้กับโรงงานแป้ง แปรรูป หรือ และบางส่วนอาจเก็บรักษาไว้ใน ยุ้งฉาง หรือโรงเรือนต่าง ๆ เพื่อบริโภคในครัวเรือน ซึ่งวิธีการเก็บรักษาที่ดีซึ่งจะสามารถป้องกันหรือชะลอการเสื่อมคุณภาพของข้าวให้เกิดขึ้นช้าลงได้นั้น ควรคำนึงถึงความสะดวกของเมล็ดที่จะนำมาเก็บรักษา อุณหภูมิ และ ความชื้นสัมพัทธ์ ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม ซึ่งต้องมีระบบระบายอากาศที่มีประสิทธิภาพดี เพื่อให้อุณหภูมิและความชื้นตัวอย่างมีความคงที่ตลอดเวลา (Rice Quality Workshop, online, 2003) โดยความชื้นของเมล็ดข้าวควรอยู่ในช่วงร้อยละ 12-14 และนอกจากนี้ยังต้องมีอุณหภูมิ ในช่วงที่ไม่ทำให้เกิดการเจริญของจุลินทรีย์ โดยการเก็บรักษาข้าวในภาชนะ หรือสถานที่ปิด จะต้องมีการเปิดพัดลม หรือเครื่องระบายอากาศอยู่ตลอดเวลา เพื่อให้

อุณหภูมิที่จุดต่าง ๆ ของตัวอย่างข้าวที่เก็บไว้มีค่าใกล้เคียง หรือเท่ากับอุณหภูมิของภาชนะหรือห้องเก็บ ไม่ให้เกิดการระเหย และการควบแน่นของไอน้ำเป็นหยดน้ำอยู่ภายใน อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางเคมีกายภาพ และคุณภาพของเมล็ดนั้นเริ่มต้นขึ้นตั้งแต่ก่อนการเก็บเกี่ยว และยังคงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาการเก็บ โดยขึ้นอยู่กับเวลา อุณหภูมิ ความชื้น รวมถึงอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นขององค์ประกอบต่าง ๆ ที่มีอยู่ภายในเมล็ดข้าวนั้นเอง โดยเรียกกระบวนการนี้ว่า การแก่ของข้าว (aging process) (Zhou, Robards, Helliwell and Blanchard, 2002) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอันดับแรกที่สามารถเห็นได้ด้วยตา คือ เมล็ดข้าวสารที่ผ่านการเก็บจะมีสีเหลืองขึ้น (Chrastil, 1990) กลิ่นและรสชาติของข้าวเปลี่ยนแปลง โดยเกิดกลิ่นที่ผิดปกติ (off-flavor) นี้เกิดจากสารประกอบกลุ่มคีโตน และแอลดีไฮด์ (Tani, Ohta and Kato, 1983) ซึ่งมาจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวของไขมัน กรดอะมิโน หรือวิตามิน (Obata and Tanaka, 1965) โดย Tran, Suzuki, Okadome, Ikezaki, Homma และ Ohtsubo (2005) พบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในข้าวสองทั้งสายพันธุ์ คือ กลุ่มของจาโปนิกา เช่น Nipponbare Koshihikari และ Hoshiyukata และกลุ่มอินดิกา เช่น Yumtoiro และ Hamasari ที่เก็บรักษา ที่อุณหภูมิห้องและ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 เดือน พบว่าปริมาณกรดไขมันในข้าวมีค่าเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะข้าวในกลุ่มอินดิกามีการเพิ่มขึ้นทั้ง 2 อุณหภูมิ สังเกตได้จากค่าพีเอชของน้ำที่ได้มาจากการหุงข้าวมีค่าลดลงซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Zhou, Robards, Helliwell และ Blanchard ในปี 2007 ที่พบการลดลงของค่าพีเอชในน้ำที่ได้มาจากการหุงข้าวเก่าอายุ 16 เดือนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Tran และคณะ ยังศึกษาพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย ซึ่งได้อธิบายว่าเกิดจากการสลายตัว หรือถูกย่อยของสตาร์ช รวมถึงน้ำตาลซูโครส และราฟิโนสที่เกิดขึ้นระหว่างการเก็บ ทำให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรต และน้ำตาลอิสระในข้าวลดลง และยังพบการลดลงของปริมาณกรดอะมิโนหลักในข้าว คือ กลูตามิก และแอสพาร์ติกด้วย ส่งผลให้เกิดกลิ่นเปรี้ยว และเหม็นหืนในข้าว และยังมีผลให้รสหวาน และความอร่อยที่มีในข้าวสุกตกลงหลังเก็บรักษา ส่งผลต่อการยอมรับของผู้บริโภคที่ลดลงไปด้วย ในสถานะเก็บรักษาทั้งที่อุณหภูมิห้อง (Tran et al, 2005) และที่ 37 องศาเซลเซียส (Zhou et al, 2007) พบว่าข้าวสุกจะมีเนื้อสัมผัสที่แข็งขึ้น บ่งชี้ลักษณะของเมล็ดสตาร์ชมีความแข็งเพิ่มขึ้นภายหลังการเก็บ สอดคล้องกับค่าการปลดปล่อย อะไมโลสอิสระ ปริมาณของแข็ง รวมทั้งปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ที่มีค่าลดลง และยังสัมพันธ์กับความต้องการน้ำสำหรับใช้ในการหุงข้าว (Charstil, 1990, Charstil, 1992, Shibuya, Iwasaki, Yanase and Chikubu, 1974) และเวลาที่ใช้ในการหุงข้าวที่เพิ่มขึ้นด้วย (Ramarathnam and Kulkarni,

1984; Zhou et al, 2007) ซึ่งเมล็ดข้าวสูกจะยังคงรูปได้ดีในลักษณะที่ไม่แตกหรือปริ มีการพองตัวของเมล็ดข้าวเพิ่มขึ้น (Charstil, 1990; Charstil, 1992) การขยายตัวของข้าวสูก (Tran et al, 2005) และปริมาตรของข้าวสูกจะเพิ่มขึ้น เมล็ดข้าวสูกมีลักษณะฟูมากขึ้น (Charstil, 1990; Normand, Hogan and Deobald, 1964; Bhattacharya, Desikachar and Subrahmanyam, 1964) หรือที่เรียกว่าหุงขึ้นหม้อ

เมื่อพิจารณาเนื้อสัมผัสของข้าวสูกพบว่า ความการเกาะกันของข้าวสูก (stickiness) มีค่าลดลง (Juliano, 1985; Tran, et al 2005). โดยหากเปรียบเทียบที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเท่ากัน การเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะต่าง ๆ จะเพิ่มสูงขึ้นในตัวอย่างที่เก็บอุณหภูมิสูง ขณะที่การเก็บที่อุณหภูมิต่ำในช่วง 4-5 องศาเซลเซียสจะมีการเปลี่ยนแปลงในด้านต่าง ๆ รวมถึงเนื้อสัมผัสเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Tran et al, 2005; Zhou et al, 2007) ในปี 2003 Noosuk, Hill, Pradipasena และ Mitchell ทดลองเก็บข้าวไทย 3 พันธุ์ที่มีอะไมโลสต่างกัน (สูง กลาง และต่ำ) ได้แก่ ข้าวกข6 ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และ ข้าวสุพรรณบุรี1 ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 เดือน แล้วตรวจสอบคุณสมบัติทางความหนืดของสตาร์ช ด้วยเครื่อง RVA พบว่า ค่าความหนืดสูงสุด (peak viscosity) และเบรคดาวน์ (breakdown) ของตัวอย่างมีค่าลดลง ขณะที่ ค่าเซทแบค (setback) และ อุณหภูมิการเกิดเพสท์ (pasting temperature) ไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sowbhagya และ Bhattacharyat (2001) ที่ศึกษาการเกิดเพสท์ของแป้งข้าว 15 พันธุ์ เก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 51 สัปดาห์ แสดงการลดลงของค่าเบรคดาวน์ ขณะที่ค่าเซทแบคมีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่ง Sowbhagya และ Bhattacharyat ได้อธิบายว่าน่าจะเกิดจากการจัดเรียงตัวใหม่ขององค์ประกอบภายในข้าว ทำให้เมล็ดข้าวทนทานต่อการพองตัว และการแตกสลายเมื่อได้รับความร้อน โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงนี้จะเกิดขึ้นเร็วในระยะเริ่มต้น และค่อย ๆ ช้าลงโดยไม่มีจุดสิ้นสุด โดยนอกจากระยะเวลาที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความหนืดแล้ว อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาก็มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความหนืดของแป้ง เช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นในเนื้อสัมผัสเช่นกัน โดยในปี 2003 Zhou, Robards, Helliwell และ Blanchard ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงความหนืดของข้าว 3 สายพันธุ์ คือ Koshihikari, Kyeema และ Doongara ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 16 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่า การเก็บที่อุณหภูมิต่ำมีการเปลี่ยนแปลงความหนืดเล็กน้อยซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ขณะที่ข้าวเก็บอุณหภูมิสูงแสดงการลดลงของค่าความหนืดสูงสุด และ เบรคดาวน์ โดย Zhou และคณะ ได้ให้คำอธิบายว่า คุณสมบัติทางความหนืด และการเจลาติไนซ์ของแป้งที่เปลี่ยนไปหลังการเก็บรักษาน่าจะเป็นผลของการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณผิวเมล็ดสตาร์ช โดยเกี่ยวข้องกับลักษณะประจุที่ผิวเมล็ดสตาร์ชเอง ที่เปลี่ยนไป มีผลต่อการขัดขวางการแพร่ผ่านของน้ำเข้าสู่เมล็ดสตาร์ช ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับไขมันและโปรตีนที่อยู่บริเวณพื้นผิวของเมล็ดสตาร์ชด้วย และในปี 2000 Teo, Karim, Cheah,

Narziah และ Seow ได้แสดงให้เห็นผลของโปรตีนต่อคุณสมบัติความหนืดของแป้งข้าวเจ้าพันธุ์ Makmur 77 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม non-waxy เก็บที่อุณหภูมิ 25, 35 และ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 สัปดาห์ แสดงค่าความหนืดที่เพิ่มขึ้นในทุกตัวอย่าง โดยจะเพิ่มสูงในตัวอย่างที่เก็บอุณหภูมิสูง ขณะที่ตัวอย่างสตาร์ชที่เก็บไว้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่าความหนืดเลย และสตาร์ชยังให้ค่าพิกความหนืดที่สูงกว่าแป้งข้าวด้วย ซึ่งบ่งบอกได้ว่าสตาร์ชมีการเปลี่ยนแปลงน้อยในระหว่างการเก็บรักษา เช่นนั้นการเปลี่ยนแปลงที่มีบทบาทต่อกระบวนการเก่าของข้าวน่าจะมีผลมาจาก โปรตีน โดยจากการศึกษาของ Zhou และ คณะในปี 2003 พบว่าการเติมเอนไซม์เซลลูเลส ในสารละลายแป้งข้าวเจ้าที่เก็บที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 สัปดาห์ แล้ววัดความหนืด มีผลทำให้เส้นกราฟความหนืดของตัวอย่างแป้งข้าวทั้ง 3 พันธุ์ ขยับเข้าใกล้เส้นกราฟความหนืดของแป้งข้าวใหม่ แสดงถึงน้ำสามารถแพร่ผ่านเข้าไปในโครงสร้างของสตาร์ชได้ดีขึ้น เมื่อโครงสร้างของผนังเซลล์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ แป้งที่ผ่านการเตรียมโดยบ่มในสารละลายโปรติเอสแสดงการเพิ่มขึ้นของค่าพิกความหนืดสูงสุด และเบรคดาวน์ และการลดลงของความหนืดสุดท้าย (final viscosity) อย่างชัดเจน โดยเส้นกราฟความหนืดของแป้งข้าวเจ้าพันธุ์ Doongara เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจะมีลักษณะคล้ายคลึงกับแป้งข้าวใหม่ ขณะที่ตัวอย่างข้าวเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 เดือนนั้น แม้จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเส้นกราฟความหนืดแต่การใช้เอนไซม์โปรติเอสก็ยังมีส่วนเพิ่มค่าพิกความหนืดสูงสุดให้กับตัวอย่างแป้งข้าวได้ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลายเบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล ซึ่งเป็นสารรีดิวซิงซ์ เพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีนที่พบว่ามีเพิ่มจำนวนขึ้นในระหว่างการเก็บข้าว (Chrastil and Zarins, 1992) โดยผสมกับแป้งข้าวพันธุ์ Doongara นั้นมีผลอย่างมากในการเพิ่มค่าพิกความหนืดสูงสุด และค่าความหนืดสุดท้าย โดยสังเกตเห็นได้ชัดเจนในตัวอย่างที่เก็บไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส บ่งชี้ว่าเมื่อสตาร์ชสามารถดูดซับน้ำ พองตัว และเกิดเจลาคีโนซ์ได้ดีขึ้น แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนระหว่างการเก็บรักษานั้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของข้าว

นักวิจัยกลุ่มหนึ่งได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่เกิดขึ้น ในข้าวระหว่างการเก็บรักษาพบว่าไม่เปลี่ยนแปลงในเชิงปริมาณ (Chrastil, 1990; Barber, 1972; Villarel, Resurreccion, Suzuki and Juliano, 1976) แต่กลับพบการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเคมี และเคมีกายภาพอื่น ๆ โดยในปี 1990 Chrastil ได้ศึกษาปริมาณหมู่ซัลไฮดริว และพันธะไดซัลไฟด์ในข้าว 2 สายพันธุ์ คือ Lemont และ Mercury ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์เมล็ดยาว และข้าวพันธุ์เมล็ดสั้นตามลำดับ โดยนำมาเก็บรักษาเอาไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลาระยะเวลานาน 1 ปี พบว่าการละลายของโปรตีนในกลุ่มกลูทีลินมีค่าลดลง และยังพบปริมาณหมู่ซัลไฮดริวที่ลดลง ขณะที่พันธะไดซัลไฟด์เพิ่มขึ้นใน

ระหว่างการเก็บ ซึ่งเชื่อมโยงกับการทดลองในปี 1992 โดย Chrastil ได้ทำการศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนกลูติน ในข้าว 3 พันธุ์ คือ Lemont, Mars และ S-201 ที่เป็นข้าวพันธุ์เมล็ดยาว ข้าวพันธุ์เมล็ดกลาง และข้าวพันธุ์เมล็ดสั้น ตามลำดับ โดยนำไปเก็บรักษา ในช่วง 4, 25, 39, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ปีพบว่าขนาดโมเลกุลเฉลี่ยของโปรตีนกลูตินมีค่าเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิการเก็บที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นของพันธะไดซัลไฟด์ในระหว่างการเก็บรักษาข้าวด้วย ต่อมาในปี 2005 Ohno และ Ohisa ได้ศึกษาขนาดโมเลกุลโปรตีนที่สกัดได้จากข้าวพันธุ์ Akitakomachi ที่ผ่านการเก็บรักษาที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าขนาดโมเลกุลโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงไป โดยพบว่ากลุ่มโมเลกุลขนาดเล็กมีปริมาณน้อยลง ขณะที่โปรตีนขนาดใหญ่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นภายหลังการเก็บรักษา นักวิจัยทั้งสองจึงทำการทดลอง เพื่อหาข้ออธิบายถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นของโปรตีนภายหลังการเก็บรักษาข้าง โดยทำการทดลองเปรียบเทียบโปรตีนสกัดที่เตรียมจากแป้งข้าวใหม่ ที่ผ่านการแช่สารละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น โปแทสเซียม ไอโอเดท เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารออกซิไดซ์ และสารละลายโซเดียมซัลไฟต์เข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารรีดิวซิงส์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำตะกอนแป้งที่ชะสารละลายออกแล้ว สกัดโปรตีนด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ที่มีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 1 และทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า สารออกซิไดซ์ มีผลทำให้โมเลกุลโปรตีนขนาดเล็กเชื่อมกันเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ขึ้น ในทางกลับกันสารรีดิวซิงส์ ที่มีคุณสมบัติในการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีนทำให้โมเลกุลใหญ่ให้แตกออกเป็นหน่วยย่อยขนาดเล็กได้ และเมื่อนำผลที่ได้มาพิจารณา จะพบว่า ความเชื่อมโยงเกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนของโปรตีนขนาดใหญ่ที่เกิดขึ้นในข้าวเก่านั้นเกิดจากการออกซิไดซ์หมู่ซัลไฮดริล ของโปรตีนที่เกิดขึ้นเองระหว่างการเก็บรักษา เกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์ที่เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วยนั่นเอง

2.6 พันธะเคมีและแรงยึดเกาะที่สำคัญในโปรตีน

โปรตีนในสภาพธรรมชาตินั้น จะมีการพับตัว (folding) เพื่อให้เกิดความเสถียรของโครงสร้างโปรตีนเอง ซึ่งต้องอาศัยแรงและพันธะเคมีมาเกี่ยวข้อง หรือแม้แต่การเกิดเจล ของโปรตีนก็เกี่ยวข้องกับแรง และพันธะเคมีเช่นเดียวกันโดยทั่วไปในโปรตีนนั้นมีแรง หรือพันธะเคมีที่เป็นพื้นฐานสำคัญ อยู่ 4 ชนิด ซึ่งอธิบายความหมายและความสำคัญโดยย่อได้ดังนี้

แรงแวนเดอร์วาลส์ (van der waals forces) คือแรงดึงดูดระหว่างอะตอมหรือโมเลกุลของโปรตีนที่ไม่มีขั้วซึ่งอยู่ใกล้ชิดกัน เกิดจากค่า dipoles ที่เปลี่ยนแปลงขึ้นลงตลอดเวลา เกิดจากการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนรอบ ๆ นิวเคลียสของอะตอมภายในโมเลกุลโปรตีน อย่างไรก็ตามแรงดึงดูด

ที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนเป็นแรงผลักที่เรียกว่า born repulsion ได้ เมื่อโมเลกุลเคลื่อนที่เข้ามาในระยะที่ใกล้กันมากเกินไป ซึ่งโดยปกติแล้วแรงดึงดูด และแรงผลักจะเกิดขึ้นได้ใกล้เคียงกัน (Visser and Koning, 1992) แรงแวนเดอร์วาลส์ ถือว่ามีส่วนต่อการเสถียรโครงสร้างโปรตีน เนื่องจากการจัดเรียงตัวของโซ่ข้างโปรตีนอยู่ในตำแหน่ง และระยะที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดแรงแวนเดอร์วาลส์ได้มาก

แรงประจุไฟฟ้า (electrostatic forces) เป็นแรงที่เกิดจากประจุลบ และประจุบวกของสายโซ่โปรตีน โดยค่าพลังงานพันธะ จำนวนประจุ ระยะทางระหว่างประจุบวกกับลบ และค่าพีเอชของตัวกลางหรือสารละลาย มีผลต่อแรงชนิดนี้

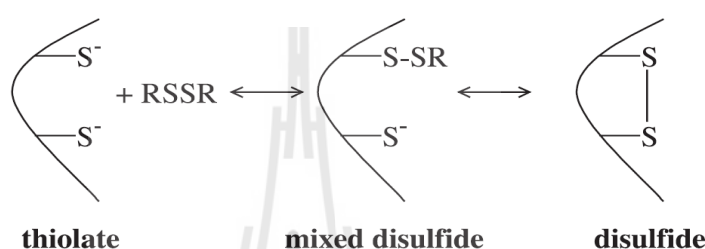
พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) เกิดขึ้นได้เมื่อมีกรดอะมิโนที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจน และกรดอะมิโนที่เป็นตัวรับไฮโดรเจน ซึ่งได้แก่ เซอรีน, ทรีโอนีน, ฮิสทีดีน, กลูตามีน และ แอสพาราจีน โปรตีนที่มีกรดอะมิโนเหล่านี้มาก ก็จะสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้มากตามไปด้วย เนื่องจาก พันธะไฮโดรเจนเป็นพันธะนอนโคเวเลนต์ มีค่าพลังงานพันธะต่ำ จึงทำให้ถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน

อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interactions) เกิดจากการจัดเรียงตัวหรือรวมกลุ่มกันระหว่างโซ่ข้างโปรตีนที่มีกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วหรือที่เป็นไฮโดรโฟบิกอยู่สูง เป็นปรากฏการณ์ทางเทอร์โมไดนามิกที่เกิดขึ้นเองเพื่อให้เกิดความเสถียรของโปรตีน โดยพิจารณากรณีที่เกิดขึ้นในสารละลายมีขั้ว เช่น น้ำ ซึ่งมีความเป็นไฮโดรฟิลิกสูงจะไม่จับกับโปรตีนกลุ่มไม่มีขั้ว ทำให้เกิดแรงผลักกันระหว่างโมเลกุลของน้ำ ซึ่งมีขั้วกับโปรตีนกลุ่มไม่มีขั้ว โปรตีนกลุ่มนี้จึงเลือกที่จะขดตัวเข้าใกล้กัน หรือขดตัวอยู่ภายในมากกว่าจะออกมาสัมผัสกับน้ำ เพื่อให้เกิดความเสถียรของโครงสร้าง ดังนั้นแรงไฮโดรโฟบิกจึงมีบทบาทสำคัญต่อโปรตีนที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูง ๆ และนอกจากนี้ความเป็นไฮโดรโฟบิกที่เพิ่มขึ้น ยังบ่งบอกว่าโปรตีนมีการเปิดตัว หรือสูญเสียสภาพธรรมชาติมากขึ้น จากการที่กรดอะมิโนไม่มีขั้วซึ่งเดิมจะขดตัว หรือจับกลุ่มกันอยู่ภายใน เกิดเคลื่อนที่ออกมาสัมผัสภายนอกมากขึ้น ซึ่งมีงานวิจัยที่ศึกษาเรื่องของพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของโปรตีนในตัวอย่างข้าว และใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนได้ โดยในปี 2001, Ju, hettiarachchy และ Rath ได้ติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของโปรตีนโกลบูลิน และกลูตินินสกัดจากแป้งข้าวในระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 45-95 องศาเซลเซียส พบว่าค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึงระดับ 79 และ 82 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นจุดอุณหภูมิที่โปรตีนทั้งสองเสียสภาพ (denaturation temperature) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิก จึงถูกนำมาใช้ในการอธิบายการเสียสภาพของโปรตีนได้ โดยในปี 2006, Paraman, Hettiarachchy, Schaefer และ Beck ศึกษาค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของโปรตีนที่สกัดจากแป้งข้าว โดยใช้สารละลายที่ต่างกัน 2 ชนิด คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ (พีเอช 11.0) โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.08 โมลาร์ (พีเอช 11.0) และเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เทอร์มามิล (Termamyl)

และ อะไมเลส (amylase) พบว่าการใช้สารละลายต่าง และเกลือสกัดโปรตีน จะให้ค่าพื้นผิวความเป็นไฮโดรโฟบิกเท่ากับ 579 และ 575 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการใช้เอนไซม์ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสในการสกัดซึ่งมีค่าเท่ากับ 984 และ 832 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่สูงบ่งบอกถึงการเปิดตัวหรือเสถียรภาพของโปรตีนที่มากกว่า ซึ่งมีผลจากการใช้ความร้อนร่วมด้วย ต่อมาในปี 2007 Paraman และคณะ ได้ทำการศึกษาการย่อยโปรตีนที่สกัดจากแป้งข้าวด้วยเอนไซม์ เปปซิน (pepsin) , อัลคาเรส (alcalase) และ ลิควิพานอล (liquipanol) โดยพบว่าที่ระดับการย่อยเริ่มต้นที่ร้อยละ 2-5 ความสามารถในการละลายของโปรตีนจึงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่เมื่อระดับการย่อยของเอนไซม์ทั้ง 3 เพิ่มขึ้นมากกว่าร้อยละ 13.5 ความสามารถในการละลายของโปรตีนจึงมีค่าลดลง เช่นเดียวกับค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกที่มีค่าลดลงด้วย ที่เป็นเช่นนี้เป็นเพราะในโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิกจำนวนมาก แม้จะถูกย่อยเป็น เปปไทด์สายสั้น ๆ แล้วก็สามารถที่จะกลับมารวมตัวกันได้ใหม่ได้ นอกจากนี้ยังเป็นผลมาจากการที่โปรตีนในข้าวเอง มีพันธะไดซัลไฟด์อยู่ในจำนวนมากทำให้โปรตีนส่วนนี้ไม่ถูกย่อย และยังคงเกาะตัวกันอยู่ ค่าการละลายของโปรตีนจึงไม่เพิ่มขึ้น และยังมีแนวโน้มลดลงแม้ระดับการย่อยจะเพิ่มขึ้นก็ตาม แสดงให้เห็นว่าค่าความเป็นไฮโดรโฟบิก นอกจากจะใช้บ่งบอกได้ถึง การเปิดตัว หรือการสลายตัวของโปรตีน หรือเปปไทด์แล้วยังสามารถบ่งบอกการรวมตัวกันของสายเปปไทด์ หรือโมเลกุลโปรตีนได้อีกด้วย ทั้งนี้ค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกที่เปลี่ยนแปลงไป ยังสามารถนำไปใช้ในการเลือกวิธีการที่เหมาะสมในการเตรียมโปรตีนสกัดจากข้าว ที่ทำให้โปรตีนเสถียรภาพน้อยที่สุดได้ด้วย โดยวิธีการที่เลือกใช้จะต้องเป็นวิธีที่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเพิ่มลดค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกมากเกินไป (Paraman, Hettiarachchy and Schaefer, 2008) และยังสามารถบ่งบอกได้ถึง การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนจาก ค่าที่เพิ่มขึ้นแสดงการเปิดตัวของโปรตีนด้านในออกสู่ด้านนอก ขณะที่การลดลงของค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกแสดงการเกาะกลุ่มกันของโปรตีน (Yongsawatdigul and Park, 2003)

พันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bonds) คือ พันธะโควาเลนต์ที่เกิดจากการเชื่อมกันของกรดอะมิโนซิสทีโอนที่มีในโครงสร้างโปรตีน โดย 1 พันธะเกิดจาก ซิสทีโอน 2 ตัว เนื่องจากมีค่าพลังงานพันธะสูงกว่า 50 กิโลแคลอรีต่อโมล (Visser and Koning, 1992) จึงเป็นพันธะที่มีความแข็งแรงมาก โดยโปรตีนที่มีจำนวนของพันธะไดซัลไฟด์สูงก็จะมีความทนทาน ยากแก่การทำลาย แม้จะอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่รุนแรง จึงสามารถ ทนอุณหภูมิที่สูง สภาวะกรด-ด่างสูง และสภาวะในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเข้มข้นสูง ๆ ได้ดี จึงมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อเสถียรภาพของโปรตีน โดยพันธะไดซัลไฟด์ สามารถเกิดขึ้นทั้งเกิดได้ทั้งภายในและ ภายนอกโครงสร้างโปรตีน โดยกลไกในการเกิดพันธะไดซัลไฟด์มี 2 ขั้นตอนในการเกิด ขั้นที่ 1 เริ่มจากออกซิเดชันของ หมู่ไทโอเลทกลุ่มแรก (กำจัดอะตอมไฮโดรเจนออก) ด้วยสารในกลุ่ม low molecular weight disulfide ได้แก่

cysteine, cystamine, เอนไซม์ในกลุ่ม protein disulfide isomerase, dithiobis(2-nitrobenzoic acid) หรือสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน เช่น ไอโอดีน ไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ รวมทั้งออกซิเจน ในอากาศ เกิดเป็นสารตัวกลางที่เรียกว่า mixed disulfide species ขั้นที่ 2 กลุ่ม low molecular weigh disulfide ใน mixed disulfide species ถูกกำจัดออก และแทนที่ด้วยหมู่ไทโอเลทอีกโมเลกุล เกิดเป็น พันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งเกิดขึ้นได้ทั้งภายในโมเลกุล และเกิดขึ้นได้ระหว่างโมเลกุล (Bulaj, 2005) ดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 ปฏิกิริยาการเกิดพันธะไดซัลไฟด์

ที่มา: Bulaj, 2005

เจลที่เกิดจากโปรตีนนั้น ส่วนหนึ่งมาจากการเชื่อมกันระหว่างสายโปรตีนด้วยพันธะไดซัลไฟด์ เกิดเป็นโครงสร้างสามมิติขึ้นมา และมีผลโดยตรงต่อเนื้อสัมผัสของอาหารหลายชนิดที่มีโปรตีนซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสทีอีนในโครงสร้าง (Gerrard, 2002) โดย Benjakul, Thongkaew and Visessanguan (2005) อธิบายว่าในเนื้อปลาบดที่เก็บรักษาในสภาพแช่แข็งจะเกิดพันธะไดซัลไฟด์เพิ่มขึ้นในระหว่างการแช่แข็งโดยพันธะนี้จะไม่ถูกทำลายด้วยแรงในกระบวนการบดหรือสับ ซึ่งเมื่อนำไปทำผลิตภัณฑ์ซูริมิจะได้ลักษณะของเจลและเนื้อสัมผัสที่ไม่เป็นที่ต้องการ เนื่องจากความสามารถในการเกิดเจลของเนื้อปลาลดลง จากปัญหาที่เกิดขึ้นดังกล่าว Banjakul และ คณะ (2005) ได้ทดลองเติมสารรีดิวซิง 3 ชนิด ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก ซิสทีอีน และโซเดียม ไบซัลไฟด์ โดยใช้ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ร้อยละ 0.05, 0.1 และ 0.2 ผสมลงไปในช่วงขั้นตอนการทำซูริมิ จากปลาแช่แข็ง จากปลาทะเล 4 ชนิด croaker, lizardfish, threadfin bream และ bigeye snapper พบว่า การใช้สารรีดิวซิง ที่ระดับความเข้มข้นต่ำคือร้อยละ 0.05-0.1 มีผลต่อการปรับปรุงคุณลักษณะเจลของซูริมิหลังให้ความร้อนให้มีลักษณะเหมือนซูริมิที่ได้จากปลาเนื้อปลาสด โดยพวกเขาพบว่าซิสทีอีน ร้อยละ 0.05 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการปรับปรุงคุณภาพของเจลที่ได้จาก

เนื้อปลาแช่แข็ง ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณหมู่ซัลไฮดริลที่เพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่พันธะไดซัลไฟด์มีค่าลดลง และยังมีส่วนในการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (Transglutaminase) และ เอทีพีเอส (ATPase) ซึ่งแสดงถึงโมเลกุลของไมโอซินที่ถูกทำลายไปสามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้ พวกเขาได้ข้อสรุปว่า สารรีดิวซิงโดยเฉพาะซิสทีอีน มีผลต่อการคืนสภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อที่ถูกทำลายไประหว่างการเก็บและการแช่แข็งได้ และยังมีผลทำให้เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในเนื้อปลาทำงานได้ดี ปรับปรุงความสามารถในการเกิดเจลของซูริมิจากเนื้อปลาแช่แข็งให้มีคุณภาพดีขึ้นได้

2.7 สารรีดิวซิง (Reducing agent)

สารรีดิวซิง ในทางเคมี หมายถึง ธาตุหรือสารประกอบที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน (reduction-oxidation: redox) สารในกลุ่มนี้จะมีค่าอิเล็กโตรเนกาติวิตี (electronegativity) และค่าพลังงานไอออไนซ์ (ionization energies) ที่ต่ำ เกิดจากการที่ตัวมันเองจะมีแรงดึงดูดระหว่างนิวเคลียสกับอิเล็กตรอนรอบนอกน้อย จึงทำให้สูญเสียอิเล็กตรอนได้ง่าย สารในกลุ่มนี้จึงทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน และมีความสามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมกับธาตุตัวอื่น

สารรีดิวซิงแบ่งออกเป็นหลายกลุ่ม ยกตัวอย่างเช่น กลุ่มธาตุในหมู่โลหะ เช่น โพแทสเซียม แคลเซียม แบรเรียม โซเดียม แมกนีเซียม รวมถึง สารประกอบในกลุ่มที่มี H^- ไอออน และสารประกอบที่แสดงคุณสมบัติเป็นสารรีดิวซิง ยกตัวอย่างเช่น ลิเทียม, อะลูมิเนียม ไฮไดรด์ ($LiAlH_4$) โซเดียม โบโรไฮไดรด์ ($NaBH_4$) สารประกอบที่มีไอออนดีบุก (Sn^{2+}) กลุ่มของสารประกอบซัลไฟท์ กรดออกซาลิก (oxalic acid) กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) สารประกอบของ Fe^{2+} และ ไดไธโอไธรียทอล (dithiothreitol) เป็นต้น สารรีดิวซิงบางชนิด เช่น หมู่ไฮดรอล กรดแอสคอร์บิก และสารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอล ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ได้ด้วย (Wikimedia Foundation, www, 2011, 2012)

สารรีดิวซิงบางชนิดถูกนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งอาหาร (food additive) เพื่อถนอมรักษา ปรับปรุงคุณภาพอาหารให้ได้ลักษณะที่ต้องการของผู้บริโภค ยกตัวอย่างเช่น

โซเดียมอีริธโรเบต (sodium erythorbate) หรือ โซเดียมแอสคอร์เบต ในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์จำพวกแฮม กุนเชียง และไส้กรอกอิมัลชันชนิดไม่รมควัน โดยทำหน้าที่เร่งการเปลี่ยนไนเตรท และไนไตรท์ ไปเป็นไนตริกออกไซด์ และเกิดการจับตัวเมย์ดลี (myoglobin) ในเนื้อทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีสันทันรับประทาน (Ray, Online, 2012) กรดแอสคอร์บิก หรือวิตามินซี ใช้เป็นสาร

ป้องกันการเกิดสีน้ำตาลในผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ อนุพันธ์ของวิตามินซีใช้เป็นสารต้านออกซิเดชัน ในน้ำมัน น้ำมันดับปลา และรักษาสภาพสีของเนื้อสัตว์ (นิตยา รัตนานนท์, 2545)

โซเดียมซัลไฟฟที่อยู่ในกลุ่มของซัลไฟท์ ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ รา และแบคทีเรีย ในไวน์ หรือเบียร์ เป็นสารป้องกันการออกซิเดชัน ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลจากเอ็นไซม์ และไม่เกี่ยวข้องกับเอ็นไซม์ในผักผลไม้สด ผลไม้แห้ง หรือผลิตภัณฑ์ผลไม้ดอง ผลไม้แช่อิ่ม ผลไม้กวน แยม หรือแม้แต่ผลไม้สดชนิดต่าง ๆ รวมทั้ง ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากแป้ง เช่น วุ้นเส้น เส้นหมี่ และก๋วยเตี๋ยว อาหารแช่แข็ง หรืออาหารประเภท ถั่ว หน่อไม้ เห็ด กระเทียม หรือมันฝรั่งบรรจุกระป๋อง (Food network solution, www, 2010)

เป็นที่น่าสนใจว่าสารรีดิวซิงซิงค์นั้นมีความสำคัญ และถูกใช้อย่างมากในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ขนมอบ โดยใช้ในการปรับปรุงคุณสมบัติด้านการไหลของแป้งโด (Burrington, 2006) โดยเติมสารรีดิวซิงซิงค์ลงไปในช่วงขั้นตอนของการผสมแป้งขนมปัง ทำให้โปรตีนคลายตัว โดยทำลายโครงสร้างตาข่ายของโปรตีนที่เกิดจากการเชื่อมกันระหว่างหมู่ซัลไฮดริล ของกรดอะมิโนซิสทีอีน 2 โมเลกุลในโปรตีนกลูเตน ทั้งนี้พันธะไดซัลไฟด์ที่เกิดขึ้นในช่วงขั้นตอนการนวดแป้งให้เป็นโด เมื่อพันธะไดซัลไฟด์ถูกทำลายลงจะลดการจับตัวกันระหว่างโมเลกุลโปรตีน ทำให้ความเหนียวหนืดของแป้งโดลดลงขณะทำการนวดผสม เป็นการลดระยะเวลาและพลังงานที่ใช้ในขั้นตอนการนวดผสม โปรตีนสามารถจับกับน้ำได้มากขึ้น มีความอ่อนตัว ง่ายในการปั้นและขึ้นรูปผลิตภัณฑ์ (Tsen, 1969; Pecivova, Pavlinek and Hrabe, 2011; Haegens, 2012) ลดการพองตัวของก้อนขนมปัง ลดการหดตัวของแป้งโดที่ผ่านการแช่แข็ง (frozen bread dough) แก้ปัญหาการเยิ้มของผลิตภัณฑ์ขณะที่ฟอรั่มตัว (Burrington, 2006; Lallemand, www, 2012) โดยสารรีดิวซิงซิงค์ที่นิยมใช้ได้แก่

1. ซิสทีอีน คือ กรดอะมิโนที่มี หมู่ซัลไฮดริลอยู่ในโมเลกุล ซึ่งใช้มากในขนมปัง เนื่องจากทำปฏิกิริยากับโปรตีนได้รวดเร็ว ทำให้ลดเวลาในการนวดผสม (Burrington, 2006) เกิดปฏิกิริยาได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ (Pecivova et al, 2011) ในส่วนผสมแป้งขนมปัง และบีสกิต ใช้ได้ในอัตราส่วน 75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 300 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (Edwards, 2007)

2. กลูตาไรโอน คือ กลุ่มไตรเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนซิสทีอีน 2 โมเลกุลเป็นส่วนประกอบ ทำหน้าที่เหมือนกับซิสทีอีนแต่มีประสิทธิภาพสูงกว่า เกิดปฏิกิริยาได้มากกว่าแต่ใช้เวลานานกว่าซิสทีอีน ดังนั้นที่ระยะเวลาเท่ากัน กลูตาไรโอนจึงมีประสิทธิภาพดีกว่าซิสทีอีน แต่จะให้กลิ่นรสที่ติดกับผลิตภัณฑ์ (Tilley, Benjamin, Bagorogoza, Okot-Kotber, Prakash and Kwen, 2010) โดยแหล่งกลูตาไรโอนจากธรรมชาติที่มี คือ ยีส ในกลุ่ม non- leavening yeasts

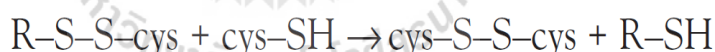
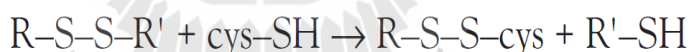
3. สารกลุ่มซัลไฟท์ เช่น โซเดียมซัลไฟฟที่ไอออน ซึ่งได้จากซัลเฟอร์ไดออกไซด์ หรือจากเกลือซัลไฟด์ เช่น โซเดียมไบซัลไฟด์ นิยมใช้เป็นส่วนผสมในแป้งที่ทำผลิตภัณฑ์คุกกี้ และแคร็กเกอร์

แต่เนื่องจากซัลไฟต์มีของเสีย คือ ทำลายไทอะมิน และทำให้เกิดอาการแพ้ในบางคน หากเหลือตกค้างในผลิตภัณฑ์เกินกว่า 10 ppm จะต้องระบุไว้ในฉลากหรือบรรจุภัณฑ์ด้วย

4. แอสคอร์บิกแอซิด หรือวิตามินซี ใช้มากในผลิตภัณฑ์ขนมปัง (Joye, Lagrain and Delcour, 2009) มีฤทธิ์สารรีดิวซ์ได้ในสภาวะที่ขาดออกซิเจน และเป็นสารออกซิไดซ์ซึ่งในสภาวะที่มีออกซิเจน วิตามินจะอยู่ในสารแอนติออกซิแดนต์ด้วย โดยถือเป็นสารเติมแต่งที่มีความปลอดภัยสูง

5. กรดบางชนิด ที่มีการนำมาใช้เป็นสารรีดิวซ์บ้าง เช่น กรดซอร์บิก (sorbic acid) และ กรดฟูมาริก (fumaric acid) โดยมีส่วนของพันธะคู่ที่มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ (activated double-bond compounds) ซึ่งกรดในกลุ่มนี้โดยส่วนใหญ่ใช้ถูกใช้เป็นสารถนอมอาหาร เนื่องจากคุณสมบัติความเป็นกรดสามารถยับยั้งการเจริญของยีสได้ แต่ยังมีราคาแพงกว่าสารรีดิวซ์สังเคราะห์ประเภทอื่น ๆ

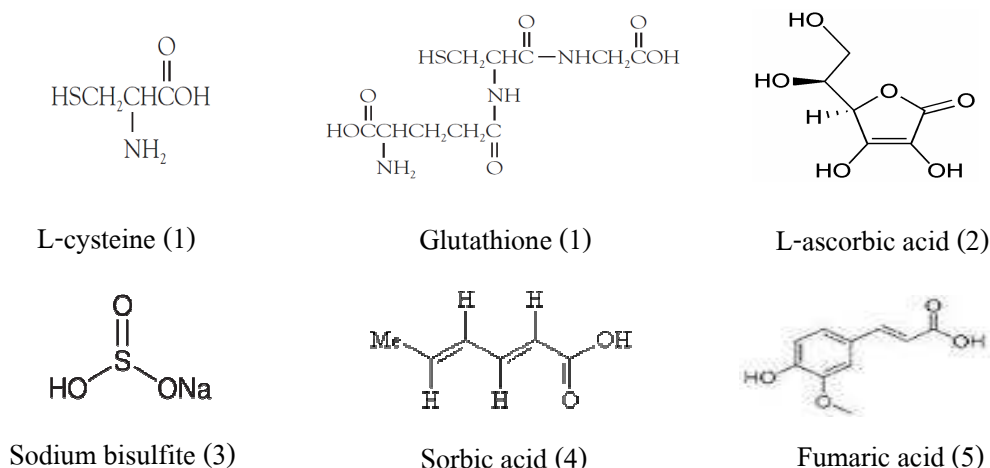
6. โปรติเอส (proteases) ไม่ใช่สารในกลุ่มรีดิวซ์ แต่มีคุณสมบัติในการเพิ่มความยืดหยุ่นและลดเวลาในการนวดผสมแป้งโด เช่นเดียวกับสารในกลุ่มรีดิวซ์ เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสสามารถย่อยทำลายโครงสร้างตาข่ายของโปรตีนกลูเตนได้อย่างถาวร โดยประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับปริมาณ เวลา และอุณหภูมิที่ใช้ ซึ่งต้องระวังในการใช้โดยเฉพาะการย่อยสลายโปรตีนที่มากเกินไป จะทำให้เกิดผลเสียกับผลิตภัณฑ์ได้ (overconversion) (Lallemand, www, 2012) การใช้รีดิวซ์ในกลุ่มอื่นจึงง่ายและเหมาะสมกว่า (Haegens, 2012)



ภาพที่ 2.4 ปฏิกริยารีดักชันของโปรตีนด้วยสารรีดิวซ์

ที่มา: Lallemand, www, 2012

จากผลของสารรีดิวซ์ที่เติมเข้าไป ทำให้ทราบว่าการเกิดขึ้นหรือการสลายของพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีน มีผลต่อคุณลักษณะของแป้งโดและคุณลักษณะตัวผลิตภัณฑ์ขนมอบที่ใช้แป้งสาลีเป็นส่วนประกอบหลักอย่างมาก ซึ่งการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน โดยตัดพันธะไดซัลไฟด์ส่งผลให้โปรตีนที่เคยเกาะกลุ่มกันขนาดใหญ่ และยากต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์นั้น แยกออกจากกันเป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กลง จนง่ายต่อการเข้าไปย่อยโครงสร้างของโปรตีน ทำให้ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้มีค่าเพิ่มขึ้น (Tsen, 1969) นอกจากผลที่เกิดขึ้นในแป้งสาลีแล้ว การใช้สารรีดิวซ์ในกลุ่มโซเดียมไบซัลไฟต์, ซีสทีอิน และไดไฮโอริทอล เพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์



ภาพที่ 2.5 สูตรโครงสร้างของสารรีดิวซ์

ที่มา: Lallemand, www, 2012 (1) ; www.ask.com, 2007 (2);

www.sigmaaldrich.com, 2012 (3); www.chm.bris.ac, 2012) (4) ;

www.selleckchem.com, 2012 (5)

ของโปรตีนที่อยู่ในแป้งข้าวฟ่าง (sorghum) ยังทำให้โปรตีนที่อยู่ในแป้งถูกย่อยสลายได้ง่ายขึ้นด้วย เอนไซม์เปปซิน เช่นเดียวกับ เบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล โปรตีนในแป้งจากธัญชาติหลายชนิด ได้แก่ ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ และข้าว สามารถย่อยสลายได้เพิ่มขึ้น ทั้งก่อนและหลังให้ความร้อน (Hamaker, Kirleis, Butler, Axtell and Mertz, 1986) โดย ไคโทโอริทอล และ เบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล เป็นกลุ่มของสารรีดิวซ์ที่มีความแรง กลุ่มที่ไม่สามารถใช้กับอาหารได้ แต่นำมาใช้ในการศึกษาขนาดโมเลกุล และหน่วยย่อยของโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE แทนโดยพบว่า ระดับความเข้มข้นของสารรีดิวซ์ที่ต่างกันมีผลต่อ การเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนที่ถูกย่อย ที่ต่างกันด้วย โดย El Tinay และ Arbab (1997). รายงานว่า การใช้แอสคอร์บิก และ โซเดียมไบซัลไฟด์ ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ มีผลทำให้ปริมาณโปรตีนที่ถูกย่อยในตัวอย่างข้าวฟ่างมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับที่ระดับต่ำกว่าคือ 0.05 หรือที่ระดับสูงกว่า คือ 0.25 และ 0.5 โมลาร์ โดยการเติมซีสทีน (60 ppm ต่อแป้ง 100 กรัม) ในส่วนผสมขนมปัง ทำให้ลดปริมาณการใช้แป้งสาลีได้ และใช้แป้งข้าวฟ่างทดแทนได้ถึงร้อยละ 30 โดยยังให้ลักษณะของขนมปังที่มีคุณภาพดีเช่นเดิม (El Tinay and Elkhailifa, 2002)

ในกรณีของแป้งข้าวนั่นก็ให้ผลเช่นเดียวกับแป้งสาลีและแป้งข้าวฟ่าง โดยพบว่าการใช้สารรีดิวซ์บางชนิด ได้แก่ ไคโทโอริทอล และเบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล เพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์ ที่มีในโปรตีนกลูทีลินซึ่งเป็นโปรตีนหลักที่พบในข้าว มีผลทำให้ค่าความหนืดของแป้งข้าวลดลง

และเนื้อสัมผัสของข้าวสุกนุ่มขึ้นได้ (Harmaker and Griffin, 1993; Teo et al, 2000; Xie, Chen, Duan, Zhu and Liao, 2008) จากคุณสมบัติดังกล่าวของสารรีดิวซิงซึ่งจึงได้นำมาใช้ศึกษาผลที่มีต่อคุณสมบัติของข้าว และแป้งข้าวภายหลังการเก็บ ซึ่งจะมีการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนด้วยพันธะไดซัลไฟด์เกิดขึ้นในตัวอย่าง โดย Ohno และ Ohisa (2005) รายงานผลการใช้สารละลายโซเดียมซัลไฟด์ที่ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ หุงเทนน้าปกติ ทำให้ข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Akitachomachi เก็บไว้ 2 เดือนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีอัตราส่วนระหว่างค่าการเกาะกันของเมล็ดข้าวสุกต่อความแข็งแรงเพิ่มขึ้นได้ โดยในปี 2007 Ohno, Tomatsu, Toeda และ Ohisa พบว่าเนื้อสัมผัสของข้าวพันธุ์ Akitakomachi เก็บไว้ 5 เดือนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นมีลดลงของค่าความแข็ง และการเพิ่มขึ้นของค่าการเกาะกันของเมล็ดข้าวสุก นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณของแข็งที่ละลายได้ด้วย ทั้งนี้สารรีดิวซิง แต่ละชนิดจะมีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงความหนืด และเนื้อสัมผัสของข้าวเก่าได้แตกต่างกัน ซึ่งการใช้โซเดียมซัลไฟด์ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จะให้ประสิทธิภาพสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารรีดิวซิงชนิดอื่น

2.8 รายการอ้างอิง

- ธีรยุทธ ตูจินดา, อภิชาติ วรรณวิจิตร และ สมวงศ์ ตระกูลรุ่ง. (2548). ความก้าวหน้าของการวิจัยข้าว ใน ยอดหยั เทพรานนท์ และ กัญญวิมว์ กิริติกร(บรรณาธิการ). ข้าว-มัน-กุ้ง ผลผลิตคู่ชีวิตคนไทย. ปทุมธานี: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- นิรนาม. (2553). **World rice trade** [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.thairiceexporters.com/>
- มรกต ดันดิเจริญ (2548). สถานภาพและศักยภาพของการผลิตข้าว มันสำปะหลัง และกุ้งของประเทศไทย. ใน ยอดหยั เทพรานนท์ และ กัญญวิมว์ กิริติกร(บรรณาธิการ). ข้าว-มัน-กุ้ง ผลผลิตคู่ชีวิตคนไทย. ปทุมธานี: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- ศรีศักร วัลลิโภดม (2548). ประวัติศาสตร์ข้าวในประเทศไทย ใน ยอดหยั เทพรานนท์ และกัญญวิมว์ กิริติกร(บรรณาธิการ). ข้าว-มัน-กุ้ง ผลผลิตคู่ชีวิตคนไทย. ปทุมธานี: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- อรอนงค์ วินัยกุล. (2550). ข้าว: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Agboola, S., Ng, D. and Mills, D. (2005). Characterisation and functional properties of Australian rice protein isolates. **Journal of Cereal Science** 41: 283-290.

- Ascorbic acid structure.(2007). File:Ascorbic acid structure.png. [On-line]. Available: http://www.ask.com/wiki/File:Ascorbic_acid_structure.png?qs=3044
- Baldwin, P.M. (2001). Starch Granule-Associated Proteins and Polypeptides: A Review. **Starch/Starke** 53: 475-503.
- Barber, S. (1972). Milled rice and changes during aging. In D.F. Houston (ed.) **Rice: Chemistry and Technology**. (pp. 215). American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN.
- Barber, S., Benedito de Barber, C. and Guardiola, J.L. (1968). Distribution of sugars in rice grains. **Revista de Agroquímica Y Tecnología de Alimentos** 8: 89.
- Barber, S., Benedito de Barber, C., Guardiola, J.L. and Alberola, J. (1967). Chemical composition of rice. IV. Distribution of sugars in grains. **Revista de Agroquímica Y Tecnología de Alimentos** 7: 346.
- Benjakul, S., Thongkaew, C. and Visessanguan, W. (2005). Effect of reducing agents on physicochemical properties and gel-forming ability of surimi produced from frozen fish. **European Food Research and Technology** 220: 316-321.
- Beveridge, T., Toma, S.J. and Nakai, S. (1974). Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent. **Journal of food science** 39: 49-51.
- Bhattacharya, K.R., Desikachar, H.S.R. and Subrahmanyam, V. (1964). Curing of freshly harvested rice by heat treatment. **Indian Journal of Technology**. 2: 387.
- Bkakeney, A.B. (1996). Rice, **Cereal Grain Quality**. Great Britain, The University press, Cambridge: Chapman & Hall: 55
- Bulaj, G. (2005). Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. **Biotechnology Advances** 23: 87-92.
- Burrington, K.J. (2006). **Adjusting dough rheology**. [On-line]. Available: <http://www.foodproductdesign.com/articles/2006/05/adjusting-dough-rheology.aspx>
- Cagampang, G.B. Perez, G.M. and Juliano, B.O. (1973). A gel consistency test for eating quality of rice. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 24: 1589-1594.
- Chrastil, J. (1990). Protein-starch interaction in rice grains. Influence of storage on oryzenin and Starch. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 38: 1804.
- Chrastil, J. (1990b). Protein-Starch Interactions in Rice Grains. Influence. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 38: 1804-1809.

- Chrastil, J. (1990c). Influence of Storage on Enzymes in Rice Grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 38: 1198-1202.
- Chrastil, J. (1990a). Chemical and Physicochemical Changes of Rice During Storage at Different Temperatures. **Journal of Cereal Science** 237: 71-85.
- Chrastil, J. (1992). Protein-Starch interaction in rice grains. Influence of storage on oryzenin and starch. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 38: 1804.
- Chrastil, J. and Zarins, Z.M. (1992). Influence of storage on peptide subunit composition of rice Oryzenin. **J. Agric. Food. Chem.** 40: 927-930
- Choudhury, H. and Juliano, B.O. (1980). Effect of amylose content on the lipids of mature rice grain. **Phytochemistry** 17: 1385-1389.
- Denyer, K., Hylton, C.M., Jenner, C.F. and Smith, A.M. (1995). Identification of multiple forms of soluble and granule-bound starch synthase in developing wheat endosperm. **Planta** 196: 256-265.
- Despande, S.S. and Bhattacharya, K.R. (1982). The texture of cooked rice. **Journal of Texture Studies** 13: 31.
- Dordrecht: Kluwer Academic quoted in Shewry, P.R. and Halford, N.G. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. **Journal of Experimental Botany** 53(370): 948.
- Dubreil, L., Compoin, J.-P. and Marion, D. (1997). Interaction of puroindolines with wheat flour polar lipids determines their foaming properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 45: 108-116
- Edwards, W.P.(2007). Reducing agents. Flour Treatments. Chapter3 Raw materials. **The Science of Bakery Products**. (pp. 78) [On-line]. The Royal Society of Chemistry: UK.
- Ellepola, S.W., Choi, S.M. and Ma, C.Y. (2005). Conformational study of globulin from rice (*Oryza sativa*) seed by Fourier-transform infrared spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules** 37: 12-20
- El Tinay, A.H. and Arbab, M.E. (1997). Effect of cooking and treatment with sodium bisulphate or ascorbic acid on the in vitro protein digestibility of two sorghum cultivars. **Food Chemistry** 59(3): 339-343.
- El Tinay, A.H. and Elkhaila, A.E.O. (2002). Effect of cysteine on bakery products from wheat sorghum blends, **Food chemistry** 77: 133-137.

- Evers, A.D., Blakeney, A.B. and O'Brien, L. (1999). Cereal structure and composition. **Australian Journal of Agricultural Research** 50: 629-650.
- Food network solution. (2010). **Cystiene** [On-line]. Available: <http://www.foodnetworksolution.com/vocab/wordcap/cystiene>
- Food network solution. (2010). **Sulfite** [On-line]. Available: <http://www.foodnetworksolution.com/vocab/wordcap/sulfite>
- Fujino, Y. (1989). Comprehensive review of glycolipids in nature. In **Reports of Japanese Conference on Biochemistry of Lipids** 31: 1-3.
- Fujino, Y., Kuwata, J., Mano, Y. And Ohnishi, M. (1996). Other grain components, R.J. Henry and P.S. Kettelwell (eds.). **Cereal grain quality** (pp. 289). Cambridge, Great Britain: Chapman & Hall, The University press
- Fumaric acid structure. (2012). [On-line]. Available: www.selleckchem.com/pic/digi/Fumalic%20acid.gif
- Dawson, E.H., Batcher, O.M. and Little, R.R. (1960). Cooking Quality of Rice. **Rice Journal** 63(5): 16-22.
- Gerrard, J. A. (2002). Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. **Trends in food science and technology** 13: 391-399.
- Haegens, N. (2012). Reducing agents. Bread and the technology of bread production. [On-line]. Available: <http://www.classoffoods.com/ukindex.html>
- Halick, J.V. and Kelly, V. J. (1959). Gelatinization and Pasting Characteristics of Rice Varieties as Related to Cooking Behaviour. **Cereal Chemistry** 36: 315-319.
- Hamaker, B.R., Griffin, V.K. and Molenhauer, K.A.K. (1990). Potential influence of a starch granule-associated protein on cooked rice stickiness. **Journal of Food Science** 56(5): 1327-1346.
- Hamaker, B.R. and Griffin, V.K. (1990). Changing the viscoelastic properties of cooked rice through protein disruption. **Cereal Chemistry** 67: 261.
- Hamaker, B.R., Griffin, V.K. and Moldenhauer, K.A.K. (1990). Potential influence of a starch granule-associated protein on cooked rice stickiness. **Journal of Food Science** 56: 1327.
- Hamaker, B.R. and Griffin, V.K. (1993). Effect of disulfide bond containing protein on rice starch gelatinization and pasting. **Cereal Chemistry** 70(4): 377-380.

- Hayakawa, T., Seo, S.W. and Igave, I. (1980). Electron microscopic observation of rice grain. I. Morphology of rice starch. **Journal of the Japanese Society of Starch Science** 27: 173-179.
- Hamaker, B.R., Kirleis, A.W., Butler, L.G., Axtell, J.D. and Mertz, E.T. (1986). Improving the in vitro protein digestibility of sorghum with reducing agents. **Proceedings of the Indian National Science Academy** 84: 626-628.
- Hamaker, B.R. and Griffin, V.K. (1993). Effect of Disulfide bond containing protein on rice starch gelatinization and pasting. **Cereal Chemistry** 70(4): 377-380.
- Han, X-Z. and Hamaker, B.R. (2002). Association of Starch Granule Proteins with starch ghosts and remnants revealed by confocal Laser Scanning Microscopy. **Cereal Chemistry** 79(6): 892-896.
- Henry, R.J. and Keltelwell, P.S. (1996). **Cereal Grain Quality**. London: Chapman & Hall,
- Choudhury, N.H. and Juliano, B.O. (1980). Lipids in developing and mature rice grain. **Phytochemistry**. 19: 1063-1069
- Hishikawa, K. (1968). Studies on the development of endosperm in rice. II Development of starch granules in endosperm tissue. **Nippon Sakumotou Gakkai Kiji** 37: 207-216.
- Hongsprabhas, P., Israkarn, K. and Rattanawattanaprakit, C. (2006). Architectural changes of heated mungbean, rice and cassava starch granules: Effects of hydrocolloids and protein containing envelope. **Carbohydrate Polymers** (doi: 10.1016/j.carbpol.2006.07.012).
- Hoseney, R.C. (1986). **Principles of cereal science and technology**. St. Paul, Minnesota: The American Association of Chemists
- Hoshikawa, K. (1968). Studies on the development of endosperm in rice. II. Development of starch granules in endosperm tissue. **Proceedings of the Crop Science Society of Japan** 37: 207-216.
- Ikehashi, H. and Khush, G.S. (1979). Methodology of assessing appearance of the rice grain, including chalkiness and whiteness, : In **Proceedings of the Workshop on Chemical Aspects of Rice Grain Quality, International Rice Research Institute**(pp. 223-229) Los Banos.
- IRRI. (1967). **The International Rice Research Institute Annual Report**. Cereal Chemistry Section, International Rice Research Institute, Los Bonas.
- Israkarn, K., Hongsprabhas, Pranithi., and Hongsprabhas, Parichat. (2006). Influences of granule-associated proteins on physicochemical properties of mung bean and cassava starches. **Carbohydrate Polymers** 68 : 314-322

- Ito, S., Sato, S. and Fujino, Y. (1979). Internal lipid in rice starch. **Starch/Stärke** 31: 217-221.
- Joye, I.J., Shang, J., Brijs, K. and Delcour, J.A. (2009). Use of chemical redox agents and exogenous enzymes to modify the protein network during breadmaking. **Journal of Cereal Science** 50: 11-21.
- Ju, Z.Y., Hettiarachchy, N.S. and Rath, N. (2001). Extraction, Denaturation and Hydrophobic properties of Rice Flour Proteins. **Journal of Food Science** 66: 229-232.
- Juliano, B.O., Bautista, G. Lugay, J.S. and Reyes, A.C. (1964). Rice Quality. Studies on the Physicochemical of Rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 12: 131-138.
- Juliano, B.O. (1979). The chemical basis of rice grain quality. **In Proc. Workshop on chemical Aspects of rice grain quality**.(pp. 69-90).Int. Rice Res. Inst, Los Bonos, Laguna, Philippines.
- Juliano, B.O., Bautista, G.M., Lugay, J.C. and Reyes, A.C. (1964). Studies on the physicochemical properties of rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 12: 131.
- Juliano, B.O., Onate, L. and Del Mondo, A (1965). The relation of Starch Composition, Protein Content and Gelatinization Temperature to Cooking and Eating Qualities of Rice. **Food Technology** 19: 116-121.
- Juliano, B.O. (1985). **Rice: Chemistry and Technology**. 2nd ed. St Paul, Minnesota: The American Association Cereal Chemists.
- Kestin, M., Moss, R., Clifton, P.M., and Nestel, P.J. (1990). Comparative effects of three cereal barns on plasma lipids, blood pressure, and glucose metabolism in mildly hypercholesterolemic men. **American Journal of Clinical Nutrition** 52: 661
- Lasztity, R. (1996). Rice protein. **The Chemistry of Cereal Proteins** (2nd ed). Florida :CRC Press, Inc.
- Little, R.R. and Dawson, E.H. (1960). Histology and histochemistry of raw and cooked rice kernels. **Food Research and Development**. 25: 611.
- Lowry, G.D.A., Sargeant, J.G. and Schofield, J.D. (1981). Wheat starch granule protein: The isolation and characterization of a salt-extractable protein from starch granules. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 32: 371-377.
- Luh, B.S., Barber, S. Barber, C. B. D. (1991). Rice Barn: Chemistry and Technology, **Rice Utilization vol.2**. New York: Chapman and Hall: 312

- Luthe, D.S. (1983). Storage protein accumulation in developing rice (*Oryza sativa*, L) seeds. **Plant Science Letters** 32: 147-158.
- Luthe, D.S. and Wen, T.N. (1985). Biochemical Characterization of rice glutelin. **Journal of Plant Physiology** 78: 172-177.
- Luthe, D.S. (1992). **Analysis of storage of proteins in rice seeds**. In H.-F. Linskens and J.F. Jackson. (eds.). **Seed Analysis** (pp 162-163). Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlage.
- MacDonald, F.D. and Preiss, J. (1985). Partial purification and characterization of granule-bound starch synthases from normal and waxy maize. **Plant physiology** 78: 849-852.
- Marshall, E.W. and Wadsworth, J.I. (1994). Introduction, **Rice Science and Technology**. Medison Avenue, New York: Marcel Dekker.
- Mawal, Y.R., Mawal, M.R., Sainani, M.N., Ranjekar, P.K. (1990). Rice seed storage protein: A structural insight. **Plant Science** 70: 73-80.
- Moore R., Clark, D. and Vodopich, D. (1998). **Botany Visual Resource Library**, The McGraw-Hill. [On-line]. Available: <http://www.mhhe.com/biosci/pae/botany/uno01pob/vrl/images/0026.gif>
- Morris, C.F., Greenblatt, G.A., Bettge, A.D. and Malkawi, H.I. (1994). Isolation and characterization of multiple forms of friabilin. **Journal of Cereal Science** 21: 167-174.
- Normand, F.L., Hogan, J.T. and Deobald, H.J. (1964). Improvement of culinary quality of freshly harvested rice by heat treatment. **Rice Journal** 67: 7.
- Noosuk, P., Hill, S.E., Pradipasena, P. and Mitchell, J.R. (2003). Structure-viscosity relationships for Thai Rice Starches. **Starch/Starke** 55: 337-344.
- Oates, C.G. (1990). Evidence of protein crosslinking in mung-bean starch. In G.O. Philips, D.J. Wedlock and P.A. Williams (eds.). **Gums and stabilizers for the food industry** (pp. 203-206). Oxford. IRL Press.
- Obata, Y., and Tanaka, H. (1965). Studies on the photolysis of L-cystiene and L-cystine. Formation of the flavor of cooked rice from L-cysteine and L-cystine. **Agricultural & Biological Chemistry** 29: 191.

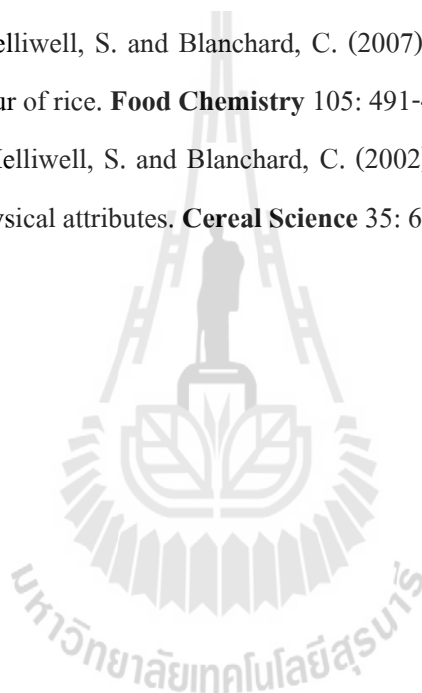
- Oda, S. and Schofield, J.D. (1997). Characterisation of friabilin polypeptides. **Journal of Cereal Science** 26: 29-36.
- Ohno, T and Ohisa, N. (2005). Studies on textural and chemical changes in aged rice grains. **Food Science and Technology Research** 11(4): 385-389.
- Ohno, T, Tomatsu, M, Toeda, K. And Ohisa, N. (2007). Texture of cooked rice prepared from aged rice and its improvement by reducing agents **Bioscience Biotechnology & Biochemistry** 71(12): 2912-2920.
- Okabe, M. (1979). Texture measurement of cooked rice and its relationship to the eating quality. **Journal of Texture Studies** 10: 131.
- Onate, L.U., del Mundo, A.M. and Juliano, B.O. (1964). Relationship between protein content and eating quality of milled rice. **Philippine Agricultural Scientist** 47: 441.
- Osborne, T.B. (1924). **The Vegetable Proteins**. London, Green: Longmans.
- Paraman, I., Hettiarachchy, N.S., Schaefer, C. and Beck, M.I. (2006). Physicochemical properties of rice endosperm proteins extracted by chemical and enzymatic methods. **Cereal Chemistry** 83(6): 663-667.
- Paraman, I, Hettiarachchy, N.S., Schaefer, C. and Beck, M.I. (2007). Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of enzyme-modified rice endosperm protein. **Cereal Chemistry** 84(4): 343-349.
- Paraman, I., Hettiarachchy, N.S. and Schaefer, C. (2008). Preparation of rice endosperm protein isolate by alkali extraction. **Cereal Chemistry** 85(1): 76-81.
- Pecivova, P., Pavlinek, V. and Hrabe, J. (2011). Changes of properties of wheat flour dough by combination L-ascorbic acid with reducing or oxidizing agents. **Acta Chemica Scandinavica Serise A-Physical and Inorganic Chemistry** 4(2): 108-117.
- Pomeranz, Y. and Ory, R.L. (1982). Rice processing and utilization. I.A. Wolff (ed), **CRC Handbook of processing and utilization in agriculture(2)** West Palm Beach, Florida. 2CRC press.
- Primo, E., Casas, A. Barber, S. And Barber, C.B. (1962). Factores decalidas del arroz. VI Influencia de las proteinas sobre la calidas de coccion Preteinas en la capa externa. **Rev. Agroquim. Tecnol. Alimentos** 2: 135.

- Pushpamma, E.C., Barber, S. and Benedito de Barber, C. (1979). Physicochemical change in rice and jowar stored in different agro-climatic regions of Andhra Pradesh. **Bull. Grain Technology** 7: 97.
- Rahman, S. Kosar-Hashemi, B., Sameul, M.S., Hill, A., Abbott, D.C., Skerritt, J.H., Preiss, J., Apples, R. and Morrell, M.K. (1995). The major proteins of wheat endosperm starch granules. **Plant physiology** 22: 793-803.
- Ramarathnam, N. and Kulkarni, P.R. (1984). Changes during storage of rice. **Z. Ernahrungswis.** 23: 143.
- Rallemand. (2012). Breaking update, Reducing agents. [On-line]. Available: www.lallemand.com/BakerYeastNA/.../1_7REDUC.PDF
- Ray, F.K. (2012). Meat curing. Oklahoma Cooperative Extension Fact Sheets. [On-line]. Available: <http://osufacts.okstate.edu>
- Rayas-Duarte, P. Robinson, S.F. and Freeman, T.P. (1995). In situ location of starch granule protein in Durum wheat endosperm by immunocytochemistry. **Cereal Chemistry** 72(3):269-274.
- Rice Quality Workshop, (2003). **Rice Storage** [on-line]. Available: http://www.plantsciences.ucdavis.edu/uccerice/rice_quality/pdf/C-1QualityConcepts2003.pdf
- Salaiman, B.D. and Morrison, W.R. (1990). Proteins associated with the surface of wheat starch granules purified by centrifuging through caesium chloride. **Journal of Cereal Science** 12: 53-61.
- Saito, Y., Shigemitsu, T., Tanaka, K., Morita, S., Satoh, S. and Masumura, T. (2010). Ultrastructure of mature protein body in the starchy endosperm of dry cereal grain. **Bioscience Biotechnology & Biochemistry** 74(7): 1485-1487.
- Seguychi, M. and Yamada, Y. (1989). Study of proteins extracted from the surface of wheat starch granules with sodium dodecyl sulfate. **Cereal Chemistry** 66: 193-196
- Schofield, J.D. and Greenwell, P. (1987). Wheat starch granule protein and their technological significance. In I.D. Morton (ed) **Cereal in a European Context**. (pp. 407-420). Ellis Horwood. Chichester.
- Shewry, P.R., Napier, J.A. and Tatham, A.S. (1995). Seed Storage Proteins: Structure and Biosynthesis. **The Plant Cell** 7: 945-956.

- Shibuya, N. Iwasaki, T., Yanase, H., and Chikubo, S. (1974). Studies on deterioration of rice during storage. I. Changes of brown rice and milled rice during storage. **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology** 21: 59.
- Shoji, I. and Kurasawa, H. (1981). On viscosity characteristics of rice and rice starch against Brabender amylography. II. Effects of protein and fat on viscosity of glutenous and non-glutenous rice starches. **Kaseigaku Zasshi** 32: 167.
- Shotwell, M.A. (1999). Oat globulins, In P.R Shewry, and R, Casey (eds.) **Seed proteins** (389-400).
- Shure, M., Wessler, S. and Fedoroff, N. (1983). Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. **Cell** 35: 225-233
- Skerritt, J.H., Frend, A.J., Robson and Greenwell, P. (1990). Immunological homologies between wheat gluten and starch granule proteins. **Journal of Cereal Science** 12: 123-126.
- Sodium bisulfite sturcure. (2012). [On-line]. Available: www.sigmaaldrich.com
- Sowbhagya, C.M. and Bhattacharyat, K.R. (2001). Changes in pasting behaviour of rice during **Ageing. Cereal Science** 34: 115-124.
- Structure of sorbic acid. (2012). [On-line]. Available: www.chm.bris.ac.uk/.../ghumra/sturcure.htm
- Swamy, I.Y.M., Sowbhagya, C.M. and Bhattacharya, K.R. (1987). Changes in the physicochemical properties of rice during storage. **Starch/ Starke**. 29: 627.
- Takaiwa, F., Ogawa, M. and Okita, T.W. (1999). Rich glutelins In P.R Shewry, and R, Casey (eds.) **Seed proteins** (401-425). Dordrecht: Kluwer Academic quoted in Shewry, P.R. and Halford, N.G. (2002). **Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization**. *Journal of Experimental Botany*, 53(370): 948.
- Takaiwa, F. (1998). Structure and expression of rice seed storage genes. K, Shimamoto (ed.), **Molecular Biology of rice** (pp 179-199). Springer-Verlag, Tokyo, Japan.
- Tamaki, M., Ebata, M., Tashiro, T. And Ishikawa, M. (1989). Physicochemical studies on quality formation of rice kernel. I. Effects of nitrogen top dressed at full heading time and air temperature during ripening period on quality of rice kernel. **Japanese Journal of Crop Science** 58: 653.

- Tani, C.Y., Ohta, T. and Kato, H. (1983). Cooking flavor and texture of rice stored under different conditions. **Agric. Biol. Chem.** 47: 543.
- Tanaka, K., Sugimoto, T., Ogawa, M and Kasai, Z. (1980). Isolation and characterization of two type of protein bodies in rice endosperm. **Agricultural & Biological Chemistry** 57: 343.
- Teo, C.H., Karim, A.A., Cheah, P.B., Norziah, M.H. and Seow, C.C. (2000). On the roles of protein and starch in the aging of non-waxy rice flour. **Food Chemistry** 69: 229-236.
- Tester, R.F. and Morrison, W.R. (1990). Swelling and gelatinization of cereal starches. II. Waxy rice starches. **Cereal Chemistry** 67: 558.
- Tilley, K.A., Benjamin, R.E., Bagorogoza, K.E., Okot-Kotber, B.M., Prakash, O. and Kwen, H. (2001). Tyrosine cross-links: Molecular basis of gluten structure and function. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 49: 2627-2632.
- Tran, T.U., Suzuki, K., Okadome, H., Ikezaki, H., Homma, S and Ohtsubo, K. (2005). Detection of changes in taste of japonica and indica brown and milled rice (*Oryza sativa* L.) during storage using physicochemical analyses and taste sensing system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53: 1108-1118.
- Tsen, C.C. (1969). **Effect of oxidizing and reducing agents on changes of flour proteins during dough mixing.** (pp. 435-442) American Institute of baking: Chicago, Illinois.
- Visser, H. and Koning, M.M.G. (1992). Protein Interactions, An overview. In H. Visser (ed). **Protein Interactions** (pp. 2-22). Germany: VHC, Weinheim.
- Webb, B.D. (1991). Rice Quality and Grades. In B.S. Luh (ed.). **Rice Utilization vol. 2** (pp 89-90). New York: Chapman and Hall.
- Wikipedia. (2011). Reducing agent [On-line]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Reducing_agent
- Wikipedia. (2011). Reducing agent [On-line]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Antioxidant>
- Wikipedia. (2012). Flour treatment agent [On-line]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Flour_treatment_agent
- Wright, D.J. and Boulter, D. (1974). Purification and subunit structure of legumin of *Vicia faba* L.(broad bean). **Biochemistry** 141: 413-418.
- Xie, L., Chen, N., Duan, B., Zhu, Z., and Liao., X. (2008). Impact of proteins on pasting and cooking properties of waxy and non-waxy rice. **Journal of Cereal Science** 47: 372-379.

- Yanase, H., Ohtsubo, K., Hashimoto, K., Sato, H., and Teranishi, T. (1984). Correlation between protein contents of brown rice and textural parameters of cooked rice and cooking quality of rice. **Rep. Natl. Food Res. Inst.** 45: 118.
- Yongsawatdigul, J. and Park, J.W. (2003). Thermal denaturation and aggregation of treadfin bream actomyosin. **Food Chemistry** 83: 409-416.
- Yoshida, S. (1981). Fundamentals of Rice Crop Science. Los Banos, Philippines: IRRI.
- Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S. and Blanchard, C. (2003). Effect of rice storage on pasting properties of rice flour. **Food Research International** 36: 625-334.
- Zhou, Z., Robard, K., Helliwell, S. and Blanchard, C. (2007). Effect of storage temperature on cooking behaviour of rice. **Food Chemistry** 105: 491-497.
- Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S. and Blanchard, C. (2002). Aging of stored rice: Change in chemical and physical attributes. **Cereal Science** 35: 65-78.



บทที่ 3

การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของข้าวภายหลังการเก็บรักษา

3.1 บทคัดย่อ

การศึกษาข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ใน 4 สภาวะทดลอง คือ ข้าวใหม่ ข้าวเก่า 1 ปี เก็บที่อุณหภูมิห้อง ข้าวเก็บแช่แข็งอายุ 1 ปี และข้าวเร่งเก่าที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง พบว่าตัวอย่างทั้ง 3 มีความชื้นต่ำกว่าข้าวใหม่ ขณะที่ปริมาณโปรตีนและอะไมโลสไม่ต่างกัน ไขมันที่สกัดได้จากข้าวเร่งมีค่าน้อย เนื้อสัมผัสของข้าวสุกวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส พบว่า ข้าวใหม่มีเนื้อสัมผัสนุ่ม เม็ดข้าวเกาะตัวกันมาก ต่างจากที่วัดได้จาก ตัวอย่างอื่น ๆ ซึ่งมีความแข็ง และมีการเกาะตัวกันของเม็ดข้าวน้อยกว่าเกือบทุกตัวอย่าง การตรวจสอบลักษณะด้านการพองตัวของฟลาร์ว์ พบว่า ข้าวแช่แข็ง และข้าวเร่งมีกำลังการพองตัวต่ำ กว่าข้าวเก่าและข้าวใหม่ ตรงข้ามกับส่วนของแข็งที่ละลายได้ที่มีมากกว่าทั้ง 2 ตัวอย่าง ภายหลังจากกำจัดโปรตีน พบว่าข้าวทั้ง 4 มีกำลังการพองตัวที่สูงขึ้น จากคุณสมบัติการเกิดเพสท์ที่ตรวจสอบด้วยเครื่องวัดความหนืดแบบรวดเร็ว (Rapid Visco Analyzer) พบว่าข้าวใหม่มีความหนืดสูงสุด (peak viscosity, PV) และ เบรคดาวน์ (breakdown, BD) สูง แต่อุณหภูมิการเกิดเพสท์ (pasting temperature, PT) และ ค่าเซทแบค (setback, SB) ต่ำ ต่างจากตัวอย่างทั้ง 3 ที่มีค่า PV และ BD ต่ำ แต่มีค่า PT และ SB ที่สูงเกือบทั้งหมด และมีการพองตัว และแตกตัวน้อยในตัวอย่างทั้ง 3 ภายหลังจากกำจัดโปรตีนพบว่าค่า PT และ ค่า SB ของตัวอย่างทั้ง 4 มีค่าต่ำลง ขณะที่ ค่า final viscosity (FV) และ BD เพิ่มขึ้นเกือบทุกตัวอย่าง อุณหภูมิในการเจลาติไนซ์ (gelatinization temperature) ของ ตัวอย่างทั้ง 4 ที่ตรวจด้วยเครื่องดิฟเฟอเรนเชียล แสแกนนิ่ง แคลอริมิเตอร์มีค่าใกล้เคียงกัน จากผลดังกล่าวมานี้แสดงว่า โปรตีนมีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของข้าวภายหลังการเก็บ

3.2 บทนำ

การผลิตข้าวในประเทศไทยในปัจจุบัน มีวัตถุประสงค์หลักเป็นไปเพื่อใช้บริโภค เองภายในประเทศ และส่วนหนึ่งก็จะถูกส่งออก หรือจำหน่ายไปยังต่างประเทศ ซึ่งประเทศนำเข้าหรือผู้บริโภคข้าวส่วนใหญ่นั้นก็เน้นไปในส่วนของการบริโภคในรูปข้าวเต็มเมล็ดมากกว่าการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ (Kohlwey, Kendall and Mohindra, 1995) โดยข้าวเปลือก และข้าวสารที่ผลิตได้ทั้งในที่อยู่ในยุ้งฉางของชาวนา หรือในโรงสีขนาดใหญ่ นี้จะต้องผ่านขั้นตอนของการเก็บรักษาไว้

ก่อนเพื่อรอการบริโภคและการจัดจำหน่ายต่อไป ในระหว่างการเก็บรักษานั้น เมล็ดข้าวจะเข้าสู่กระบวนการเปลี่ยนแปลง ที่เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติที่ เรียกว่า กระบวนการแก่ของข้าว (aging process) โดยภายในเมล็ดข้าวมี สตาร์ช ไกมัน รวมถึงโปรตีนเป็นส่วนประกอบที่อยู่ภายในล้วนมีบทบาทสำคัญต่อคุณสมบัติในการหุงต้มและการบริโภค (cooking and eating quality) ของข้าว

Aging process เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนที่ซึ่งมีทั้งการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ (physicochemical properties) และคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical properties) (Tran, Suzuki, Okadome, Ikezaki, Homma and Ohtsubo, 2005) โดยเฉพาะกลิ่นและเนื้อสัมผัสของข้าว (Perdon, Marks, Siebenmorgen and Reid, 1997) ซึ่งจะปรากฏได้ทั้งในข้าวกล้อง ข้าวสาร รวมถึงข้าวที่หุงสุก (Zhou, Robards, Helliwell and Blanchard, 2002; Zhou et al, 2003) ข้าวเก่าที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน ๆ จะให้ลักษณะเนื้อสัมผัสของข้าวที่มีความแข็งเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ลักษณะการเกาะติดกันของเมล็ดข้าวเก่าจะมีค่าลดลง ทำให้การยอมรับทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคมีค่าลดลงไปด้วย (Meullenet, Gross, Mark and Daniels, 1998)

ข้าวเก่าที่เกิดจากการเก็บในสภาวะปกติที่มีการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะต่าง ๆ ไปตามระยะการเก็บนี้ ถือเป็นข้าวเก่าตามธรรมชาติ (naturally aged rice) ส่วนข้าวเก่าอีกประเภทหนึ่งจะใช้อุณหภูมิสูงในการเร่งให้เกิดกระบวนการแก่ของข้าวขึ้นภายในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า กระบวนการเร่งด้วยความร้อน (accelerated heat treatment) และเรียกข้าวที่ผ่านกระบวนการนี้ว่า ข้าวเร่ง (accelerated rice) (Desikachar and Subrahmanyam, 1957) แสดงว่านอกจากระยะเวลาในการเก็บรักษาแล้ว อุณหภูมิระหว่างการเก็บรักษามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของข้าวด้วย โดยการเก็บตัวอย่างข้าวที่อุณหภูมิสูงจะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงค่าความหนืดเกิดขึ้น ภายในสามเดือนแรกของการเก็บ (Juliano, 1985) โดยในปี 1976 Villareal, Resurreccion, Suzuki และ Juliano อธิบายว่าข้าวที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างกัน 2 อุณหภูมิ คือ 29 และ 2 องศาเซลเซียส ที่เวลา 6 เดือน จะให้ลักษณะของการเกิดเพสท์ที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างข้าวใหม่ โดยที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส จะแสดง peak viscosity สูงกว่าข้าวใหม่ และให้เจลแข็งที่แข็งแกร่งกว่าตัวอย่างข้าวที่เก็บไว้ที่ 2 องศาเซลเซียส คุณสมบัติในการเจลาติไนเซชันของข้าวที่เปลี่ยนแปลงไปนี้ เกี่ยวข้องกับลักษณะเนื้อสัมผัสของข้าวสุกที่มีความแข็งเพิ่มขึ้น (Juliano, 1985) และเมื่อใช้อุณหภูมิการเก็บที่สูงกว่าอุณหภูมิปกติ ที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเท่ากัน ก็มีผลต่อการเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำที่ดูดซึมในตัวอย่าง (water uptake) การลดลงของปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (solid content) การลดลงของการปลดปล่อยอะไมโลสอิสระ (amylose leaching) (Zhou et al, 2007) รวมถึงการจัดเรียงตัวใหม่ของสายพอลิเมอร์ในโครงสร้างของสตาร์ชเอง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางความร้อน (Chung, Lee and Lim, 2002) ซึ่งล้วนแสดงให้เห็นได้ในข้าวเก่า

ข้าวหอมมะลิ คือ ข้าวไทยที่ได้รับความนิยมในการบริโภคทั้งในและต่างประเทศ เนื่องจากมีลักษณะเฉพาะตัวคือ กลิ่นหอม และเนื้อสัมผัสข้าวสุกที่นุ่มและเหนียว เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค การเปลี่ยนแปลงทั้งทางกายภาพและเคมี อันเป็นผลมาจากสภาวะการเก็บรักษาที่แตกต่างกันของข้าวหอมมะลิ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงด้านกายภาพและเคมีของข้าวอันเป็นผลมาจากกระบวนการเร่งความแก่ของข้าว จึงเป็นสิ่งที่ควรศึกษาและทำความเข้าใจ และเพื่อหาแนวทางที่เหมาะสมในการป้องกันหรือชะลอความแก่ของข้าวอันเป็นผลมาจากการเก็บรักษาได้

3.3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1. วัสดุทดลอง

ข้าวเปลือกพันธุ์ข้าวดอกมะลิ105 ซึ่งจากศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ตั้งอยู่ที่ บ้านหนองขอน ต.เขื่องใน อ.เมือง จ.อุบลราชธานี โดยเป็นตัวอย่างข้าวใหม่ที่เก็บเกี่ยวใหม่ปี 2551 ตัวอย่างข้าวเปลือกเก่าปี 2550 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ปี ตัวอย่างข้าวเปลือกปี 2550 ที่ผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ปี และข้าวใหม่ปี 2551 ที่นำมาผ่านกระบวนการเร่งความแก่ด้วยอุณหภูมิสูง

3.3.2. การเตรียมตัวอย่างข้าวสาร

นำข้าวเปลือกพันธุ์ข้าวดอกมะลิ105 ทั้ง 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ข้าวที่เก็บเกี่ยวใหม่ (fresh rice) ข้าวเก่าเก็บ 1 ปีที่อุณหภูมิห้อง (aged rice) และ ข้าวแช่แข็ง 1 ปี เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 1 ปี (frozen rice) มากระเทาะเปลือก และขัดสีให้อยู่ในรูปข้าวสาร ที่โรงสีขนาดเล็กแห่งหนึ่งที่ บ้านสะพานหิน ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา ส่วนตัวอย่างข้าวเก่าเร่งด้วยอุณหภูมิสูง (aged-accelerated rice) เตรียมได้โดยนำข้าวใหม่ที่ขัดสีเป็นข้าวสารมาบรรจุใส่โหลแก้วที่มีฝาปิดมิดชิด โดยใส่ตัวอย่างข้าวสารไปประมาณครึ่งหนึ่งของความสูงของขวดโหล ใส่ขวดโหลในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปล่อยให้ตัวอย่างเย็นจะได้ตัวอย่างข้าวเก่า สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป นำตัวอย่างข้าวสารทั้งหมดมาบรรจุใส่ถุงเย็น (PE ขนาด 12 x 24 นิ้ว) ปิดปากถุงให้สนิทด้วยเครื่องปิดผนึกด้วยลวดความร้อน เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

3.3.3. การเตรียมตัวอย่างแป้งข้าว

นำตัวอย่างข้าวขาวดอกมะลิที่ขัดสีแล้วมาบดให้ด้วย เครื่องบดตัวอย่าง (M20 Universal mill, IKA, Germany) ควบคุมอุณหภูมิของตัวอย่างขณะบด โดยติดตั้งสายยางเชื่อมต่อระหว่าง

เครื่องบดกับอ่างน้ำเย็นอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ใส่ตัวอย่างข้าวสาร ให้ได้ปริมาณหนึ่งในสามของโถบดตัวอย่าง บดตัวอย่างครั้งละไม่เกิน 60 วินาที เป็นเวลา 8 นาที จากนั้นนำตัวอย่างแป้งข้าวที่บดได้มาทำการแยกด้วยเครื่องแยกขนาดอนุภาค (Vibratory Sieve Shaker Analysette 3, Fritsch, Germany) โดยเลือกเฉพาะตัวอย่างที่ตกอยู่ระหว่างตะแกรงร่อนขนาด 120 ถึง 150 เมช (125-106 ไมโครเมตร) เก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกแบบซิปล็อค เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รอการวิเคราะห์ต่อไป

3.3.4. การเตรียมสตาร์ชข้าว

ดัดแปลงจากวิธีการของ Ju et al. (2001) โดยนำตัวอย่างแป้งข้าวที่เครื่องแยกอนุภาคแล้วจากข้อ 3 (หัวข้อ 3.3) มากำจัดไขมันออก (defatted) ก่อนโดยใช้วิธี socklet extraction ด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ เป็นตัวสกัด ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ดูดควันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สกัดตัวอย่างแป้งด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ตามลำดับขั้นตอนดังนี้ ซึ่งตัวอย่างแป้ง 50 กรัมใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปิดปากบีกเกอร์ด้วยแผ่นฟิล์มพลาสติกใส กวนสารละลายตลอดเวลาเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ถ่ายน้ำแป้งใส่ขวดปั่นเหวี่ยงขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 3,000xg เวลา 30 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนแป้งมาผสมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น 5 ร้อยละ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร กวนสารละลายแป้งตลอดเวลาจนครบ 4 ชั่วโมง ถ่ายสารละลายขวดปั่นเหวี่ยงขนาด 500 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 3,000xg เวลา 30 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนแป้งมาผสมสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 0.02 โมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชของสารละลายแป้งให้ได้เท่ากับ 11.0 กวนสารละลายตลอดเวลาเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 3,000xg เวลา 30 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนแป้งมาผสมกับ เอทานอล เข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร กวนสารละลายตลอดเวลาจนครบ 4 ชั่วโมง ถ่ายสารละลายแป้งขวดปั่นเหวี่ยงขนาด 500 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 3,000xg เวลา 30 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง นำตะกอนน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของสารละลายน้ำแป้งด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) เข้มข้น 1 นอร์มอล ให้ได้ค่าพีเอชเท่ากับ 7 กำจัดเกลือที่เกิดขึ้นออกโดยล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) แล้ว ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000xg เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างแป้งจนกว่าจะไม่พบตะกอนขาวขุ่นในน้ำล้างที่หยดด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต (AgNO_3) นำตัวอย่างตะกอนแป้งที่กำจัดเกลือแล้วล้างด้วย เอทานอล เข้มข้น ร้อยละ 70 ทำการกรองตะกอนผ่านเครื่องกรองสุญญากาศ ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เทอะซิโตน (acetone) ใส่ในตัวอย่างเพื่อกำจัดน้ำที่ยังติดค้างอยู่ในตัวอย่างออกไป และกรองด้วยเครื่องกรอง

สูญญากาศ นำตะกอนแป้งที่กำจัดโปรตีนออกแล้ว หรือที่เรียกว่าสตาร์ช มาผึ่งในตู้ดูดควันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บดตัวอย่างและร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 120 เมช (125 ไมโครเมตร) แล้วนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติต่าง ๆ ต่อไป

3.3.5. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

3.3.5.1 การวัดความชื้น

หาความชื้นของตัวอย่างแป้งตามวิธีการของ AOAC 1995 โดยอบกระป๋องอะลูมิเนียม ที่ 105 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำไปเก็บในตู้ดูดความชื้น เมื่ออุณหภูมิกระป๋องลดลงถึงอุณหภูมิห้อง ทำการชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของกระป๋อง จากนั้นชั่งตัวอย่างแป้งประมาณ 1 กรัม ใส่ในกระป๋องที่ทราบน้ำหนักหลังอบแล้ว พร้อมบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน ปล่อยให้ความชื้นด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง หรือ จนกว่าน้ำหนักตัวอย่างคงที่ ไม่เปลี่ยนแปลง แล้วนำเอาตัวอย่างออกใส่ในตู้ดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ คำนวณหาความชื้นของตัวอย่างจากสูตรดังต่อไปนี้

$$\text{ความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนเข้าอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบเสร็จ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนเข้าอบ}} \times 100$$

3.3.5.2 การวิเคราะห์ไขมัน

ชั่งตัวอย่างแป้งให้ได้น้ำหนักแห้งประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในกระดาดกรอง Watchman เบอร์ 1 ที่ทราบน้ำหนักแล้ว ใส่ตัวอย่างแป้งที่ห่อด้วยกระดาดกรอง จากนั้นใส่ตัวอย่างที่ห่อแล้วในทริมเบิล (thimble) ปิดทับด้วยสำลีอีกครั้ง แล้วต่อเข้ากับอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ไขมันแบบรวดเร็ว (Auto extraction Unit, 2050 Soxtec, Foss, Sweden) เทปิโตรเลียมอีเธอร์ (petroleum ether) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ใส่ในกระบอกอะลูมิเนียมทรงสูง (aluminum cup) ซึ่งใช้กับชุดอุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน ที่ทำการอบไล่ความชื้น และชั่งน้ำหนักแล้ว สกัดตัวอย่างโดยตั้งโปรแกรมการสกัดตามวิธีของเครื่องที่ระบุไว้ เมื่อครบเวลานำกระป๋องอะลูมิเนียมออกมาอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักกระป๋องหลังอบเพื่อคำนวณหาปริมาณน้ำมันที่สกัดได้ในตัวอย่าง

3.3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

โดยใช้วิธี Kjeldhal Nitrogen Method (AOAC Official Method 973.48, 2000) โดยชั่งตัวอย่างแป้ง 1 กรัม น้ำหนักแห้ง ใส่กระดาดกรอง ห่อให้มีฉนวนหุ้มโปรตีน จากนั้นเติมสารผสมระหว่างแคลเซียมซัลเฟต (CaSO_4) และ โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) ในอัตราส่วน 1:10 ปริมาณ 5 กรัม เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เติมกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ย่อย

ตัวอย่างบนเตา อุนหภูมิ 350 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีดำเป็นสีเขียวใส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ดูดควัน กลั่นแยกในโตรเจนด้วยเครื่องกลั่นไอน้ำ (Vapodest30, Gerhardt, Germany) ตัดตั้งหลอดตัวอย่างที่ย่อยแล้วที่เครื่องกลั่น โดยจุ่มปลายสายยางที่ต่อจากอุปกรณ์ควบแน่นของเครื่องกลั่นเข้ากับขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุสารละลายกรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติมอินดิเคเตอร์ที่ผสมระหว่างเมทิลเรด (methyl red) เมทิลีนบลู (methylene blue) และโบรโมครีซอลกรีน (bromocresol green) ลงไป 5-7 หยด ทำการต่อสายอุปกรณ์เครื่องกลั่นไอน้ำสำหรับดูดน้ำกลั่นและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้นร้อยละ 32 กลั่นตัวอย่างตามโปรแกรมที่ตั้งไว้โดยเวลากลั่นอยู่ประมาณ 13 นาที ต่อหนึ่งหลอด จากนั้นได้เตรทสารละลายที่กลั่นได้กับ ไฮโดรคลอริก (hydrochloric) เข้มข้น 0.1 นอร์มอล โดยสังเกตสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงอ่อน ทำการวิเคราะห์ blank โดยทำตามทุกขั้นตอนเหมือนการวิเคราะห์ตัวอย่างแต่ไม่มีตัวอย่างในหลอดย่อย คำนวณปริมาณโปรตีนจากสูตรนี้

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(A-B) \times 1.4 \times N \times F}{W}$$

กำหนดให้

A คือ ปริมาตรของกรดที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือ ปริมาตรกรดที่ใช้ในการไตเตรท blank (มิลลิลิตร)

N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก

F คือ แฟกเตอร์ (ตัวอย่างข้าวใช้ค่า 5.95)

W คือ น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

3.3.5.4. การวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลส

ตามวิธีการของ Juliano (1971) ซึ่งสร้างกราฟมาตรฐานอะไมโลส โดยใช้ pure amylose potato (type II, Cast No. 9005-82-7, Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, America) เป็นสารมาตรฐาน ซึ่ง standard amylose 0.04 กรัมใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน เติมเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วตามโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2 โมลาร์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส พร้อมกับกวนสารละลายตลอดเวลาเป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างออกปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ตั้งขวดใส่ตัวอย่างสารละลายมาตรฐานทิ้งไว้เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นเปิดสารละลายมาตรฐานอะไมโลสปริมาตร 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 70 มิลลิลิตร และเติมกรดอะซิติก (acetic acid) 1.0 โมลาร์

ปริมาตร 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นจึงทำการเติมสารละลายไอโอดีน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในขวดใส่สารละลายมาตรฐานทั้งหมด ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายอะไมโลสที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 8, 16, 24, 32 และ 40 ร้อยละตามลำดับ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณอะไมโลส(ร้อยละ) กับค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน หาปริมาณอะไมโลสในตัวอย่าง โดยชั่งตัวอย่างแห้งให้ได้น้ำหนักแน่นอน เท่ากับ 0.1 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมเอทานอล เข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วตามโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2 โมลาร์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส และเขย่า เป็นระยะ ๆ นำขวดสารละลายตัวอย่างมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำ กลั่น ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นเติมน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตรใบใหม่ เติม กรดอะซิติก (acetic acid) 1.0 โมลาร์ 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ เติมสารละลายไอโอดีน 2 มิลลิลิตร ปิด สารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที วัดค่า การดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร คำนวณปริมาณ อะไมโลสโดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสง ของตัวอย่างที่วัดได้ กับกราฟมาตรฐานอะไมโลส เตรียมสารละลาย blank โดยเติมสารละลาย ไอโอดีน 2 มิลลิลิตร และ กรดอะซิติก (acetic acid) 1.0 โมลาร์ 2 มิลลิลิตร ของ แล้วปรับปริมาตร สารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

3.3.6 การปลดปล่อยอะไมโลสอิสระ (amylose leaching) ตามวิธีการของ Juliano (1971)

ชั่งน้ำหนักแป้ง 0.5 กรัม ใส่หลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 50 มิลลิลิตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 18 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking water bath) โดยตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เขย่าตัวอย่างเบา ๆ ตลอดเวลา เพื่อให้ แป้งผสมกับน้ำเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างเพื่อแยกตะกอนแป้งจาก สารละลายด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบเท่า 2,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูด สารละลายส่วนใสปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรปรับปริมาตรให้ครบ ด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน เติมน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตรใบใหม่ จากนั้นเติม ของ กรดอะซิติก (acetic acid) 1.0 โมลาร์ 2 มิลลิลิตร ตามลำดับเติมสารละลายไอโอดีน 2 มิลลิลิตร ปิดสารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรคำนวณหาการปลดปล่อยอะไมโลสอิสระได้โดยการ เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานอะไมโลส

3.3.7 การวิเคราะห์กำลังการพองตัว (swelling power) และปริมาณของแข็งที่ละลายได้

(soluble solid)

ตามวิธีการของ กล้าณรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ (2546) ซึ่งดัดแปลงจาก Schoch (1946) โดยชั่งตัวอย่างแป้ง 0.5 กรัมใส่หลอดปั่นเหวี่ยง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 15 มิลลิลิตรลงในหลอด จากนั้นแช่หลอดตัวอย่างลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking water bath) 85 องศาเซลเซียส พร้อม ๆ กับการเขย่าตัวอย่างตลอดเวลาด้วยความเร็วรอบต่ำ เพื่อป้องกันไม่ให้เม็ดแป้งแตกจากการเขย่าที่รุนแรงเกินไป โดยใช้เวลา 30 นาที นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสออก ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 2,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสใส่กระป๋องอะลูมิเนียมที่อบไล่ความชื้นและทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว และนำไปอบในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้น นำตัวอย่างที่ผ่านการอบมาชั่งน้ำหนัก เพื่อคำนวณค่าร้อยละการละลาย และนำแป้งส่วนที่เหลือในหลอดมาชั่งน้ำหนัก เพื่อคำนวณเป็นร้อยละกำลังการพองตัว จากสูตรข้างล่างนี้

$$\text{ร้อยละการละลาย} = \frac{\text{น้ำหนักแป้งส่วนที่ละลายน้ำ} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง}}$$

$$\text{กำลังการพองตัว} = \frac{\text{น้ำหนักแป้งที่พองตัวแล้ว} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง} \times (100 - \text{ร้อยละการละลาย})}$$

3.3.8 คุณสมบัติการเกิดเพสท์ (pasting properties)

ใช้เครื่องวิเคราะห์ความหนืดแบบรวดเร็ว (RVA model 4, New port scientific, Australia) เมื่อทราบความชื้นของตัวอย่างแล้ว ทำการชั่งแป้ง และนำไปใส่ในกระบอกใส่ตัวอย่าง (RVA canister) ใช้ใบพาย (paddle) กวนจนแป้งและน้ำผสมเข้ากันดี นำไปวัดความหนืด โดยปริมาณน้ำและแป้งที่ใช้ในการวิเคราะห์คำนวณเทียบกับสูตรคำนวณมาตรฐาน คือ แป้ง 3 กรัม ต่อน้ำ 25 กรัม ที่ความชื้นของแป้งเท่ากับ 14 ร้อยละ โดยคำนวณได้จากสูตรข้างล่างนี้

$$W = (25 + A - S)$$

$$S = \frac{(86 \times A)}{(25 + A - M)}$$

- เมื่อ S คือ น้ำหนักที่ปรับแล้ว (กรัม)
 A คือ น้ำหนักแบ่งที่ความชื้นร้อยละ 14 ในที่นี้คือ 3 กรัม
 M คือ ความชื้นของแป้งที่จะวัด (ร้อยละ)
 W คือ น้ำหนักของน้ำที่ปรับแล้ว (กรัม)

ใช้โปรแกรมการวัดแบบ standard1 คือ สารละลายแป้งจะถูกกวนผสมอย่างรวดเร็วที่ 10 วินาทีแรก ด้วยความเร็ว 960 รอบต่อนาที จากนั้นลดความเร็วมาที่ 160 รอบต่อนาทีจนกระทั่งตลอดการวัด โดย สารละลายจะถูกให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มระดับ อุณหภูมิ จาก 50 เป็น 95 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 12.2 องศาเซลเซียสต่อนาที ในเวลา 3 นาที 42 วินาที (นาทีที่ 4.42) คงอุณหภูมิไว้ที่ระดับ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที 30 วินาที (นาทีที่ 7.12) ก่อนที่จะลดอุณหภูมิลงไปที่ 50 องศาเซลเซียสซึ่งใช้เวลา 3 นาที 48 วินาที (นาทีที่ 11) คงอุณหภูมิ ไว้ที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที ใช้เวลาในการวัดตัวอย่างเท่ากับ 13 นาที ผลความหนืด แสดงในหน่วย อาร์วียู (RVU) รายงานเป็นค่า peak viscosity, final viscosity และ pasting temperature ค่า setback และ breakdown คำนวณโดย setback = peak viscosity – final viscosity และ breakdown = peak viscosity – though

3.3.9 การศึกษาสถานะการเตรียมตัวอย่างข้าวสุก

3.3.9.1 เวลาในการหุงข้าว (minimum cooking time)

ดัดแปลงจากวิธีการของ Singh, Raina, Bawa and Dharmesh (2005) ซึ่งตัวอย่าง ข้าวสาร 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร จับเวลา 10 นาที นำตัวอย่างไปตั้งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่มีฝาปิด ตั้งอุณหภูมิที่ 99 ± 1 องศาเซลเซียส โดยน้ำ ในอ่างควบคุมอุณหภูมิจะต้องมีอย่างน้อยครึ่งหนึ่งของความสูงของอ่างเมื่อวัดจากก้นอ่าง ใส่ ตัวอย่างพร้อมกับเริ่มจับเวลา และทุก ๆ 1 นาที ทำการชักตัวอย่างเมล็ดข้าวออกมาทดสอบความสุก โดยวางตัวอย่างเมล็ดข้าวลงบนแผ่นกระจกแล้วกดเมล็ดข้าวให้แบนด้วยแผ่นกระจกอีกแผ่น เมื่อ สังเกตไม่พบลักษณะใดสีขาว ที่ภายในถึงกลางเมล็ดข้าวแสดงว่าข้าวสุกโดยสมบูรณ์แล้ว เวลา ณ ตำแหน่งนี้จึงเป็นเวลาที่ใช้สำหรับหุงข้าว อย่างไรก็ตามวิธีการนี้เป็นการทดลองหาค่าเวลาเบื้องต้น ก่อน เพื่อให้ทราบค่าเวลาประมาณ ในการหุงเพื่อนำไปสู่การหาปริมาณน้ำที่เหมาะสมที่ใช้ในการ หุงต่อไป

3.3.9.2 การหาปริมาณน้ำที่ใช้ในการหุงข้าว (water uptake ratio)

ดัดแปลงจากวิธีการของ singh et al. (2005) ซึ่งตัวอย่างข้าวสารน้ำหนัก 5 กรัม ใส่ลงใน

กระป๋องอะลูมิเนียมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 6 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งในอ่างน้ำเดือด 100 ± 1 องศาเซลเซียส (ใช้เวลาตาม minimum cooking time) เมื่อครบเวลานำตัวอย่างออก แยกภาชนะตัวอย่างในอ่างน้ำเย็นเพื่อลดอุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิของตัวอย่างลดลงจนถึงอุณหภูมิห้อง เทน้ำที่ส่วนที่ไม่ได้ถูกตัวอย่างดูดซับออกไป น้ำส่วนเกินที่บริเวณผิวข้าวสุกจะซับด้วยกระดาษทิชชูในลักษณะประกบคู่บนล่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีน้ำส่วนเกินเกาะที่เมล็ดข้าวแล้ว ชั่งน้ำหนักตัวอย่างหลังหุงสุก ค่า water uptake ratio คำนวณได้จากน้ำหนักตัวอย่างหลังหุงสุกลบน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น หาคด้วยน้ำหนักก่อนหุงก็จะได้อัตราส่วนของปริมาณน้ำที่ใช้ในการหุงข้าวต่อน้ำหนักข้าว 1 กรัม ซึ่งเป็นค่าการประมาณเบื้องต้นเท่านั้น ดังนั้นก่อนการหุงข้าวเพื่อวัดเนื้อสัมผัสจริงนั้นจะต้องหุงในภาชนะอะลูมิเนียมทรงกระบอกที่เตรียมสำหรับวัดตัวอย่าง ซึ่งจะมีการทดลองปรับค่าเวลาและปริมาณน้ำอีกเล็กน้อยเพื่อให้ได้ที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างทดลองทั้งหมด โดยได้ตัวอย่างข้าวที่สุกพอดี ไม่แฉะที่ก้นกระป๋องหรือแข็งเกินไป

3.3.9.3 การหุงข้าว

หุงข้าวในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบมีฝาปิด โดยเติมน้ำให้ได้ระดับอย่างน้อยครึ่งหนึ่งของความสูงอ่าง ตั้งอุณหภูมิที่ 100 ± 1 องศาเซลเซียส จากนั้นชั่งน้ำหนักกระป๋องอะลูมิเนียมพร้อมฝาปิดและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอนไว้ ชั่งตัวอย่างข้าวสารประมาณ 20 กรัม น้ำหนักแห้งใส่ในกระป๋องอะลูมิเนียมที่เตรียมไว้ บันทึกน้ำหนักตัวอย่างที่แน่นอน จากนั้นเติมน้ำปริมาณที่เหมาะสมตามผลที่ได้จากตารางที่ 3.1 ลงในกระป๋องอะลูมิเนียมที่ใส่ตัวอย่างข้าวและน้ำไว้ แล้วเขย่ากระป๋องเล็กน้อยเพื่อให้ผิวหน้าของตัวอย่างข้าวเรียบเสมอกัน วางแผ่นพลาสติกคลุมใส่ที่ตัดเตรียมให้ขนาดพอดีกับขอบผนังด้านในของกระป๋องปิดทับด้านบนตัวอย่าง ปิดฝากระป๋องให้สนิท โดยใช้เทปกาวปิดทับรอยต่อระหว่างฝากับตัวกระป๋องให้สนิท เพื่อป้องกันน้ำระเหยเข้าออกจากภาชนะขณะให้ความร้อนตัวอย่าง โดยหลังจากเติมน้ำให้ทำการจับเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำกระป๋องอะลูมิเนียมที่ใส่ตัวอย่างและปิดสนิทแล้วตั้งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่เตรียมไว้ ใช้เวลาเท่ากับเวลาในการหุง (ตารางที่ 3.1) เมื่อครบเวลานำตัวอย่างข้าวออกจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ทำการพลิกให้ก้นกระป๋องกลับมาอยู่ด้านบนเพื่อเป็นการกระจายความชื้นของตัวอย่างให้สม่ำเสมอ ไม่ให้เกิดการสะสมความชื้นและข้าวแฉะที่ก้นกระป๋อง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปให้ความร้อนซ้ำในอ่างน้ำเดือดอีกครั้ง เป็นเวลา 7 นาที เนื่องจากการหุงข้าวที่เพื่อวัดเนื้อสัมผัสมีการใส่ตัวอย่างเปียกจำนวนมาก ปริมาณความร้อนที่ตัวอย่างได้รับจะมีค่าน้อยกว่าในขั้นตอนการหาเวลาในการหุงข้าวที่หาได้ในตอนแรกจึงต้องเพิ่มเวลาในการให้ความร้อนเพื่อให้ตัวอย่างสุกพอดี และเมื่อครบเวลา นำตัวอย่างข้าวออกจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ พลิกให้ก้นกระป๋องกลับมาอยู่ด้านบนอีกครั้งแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่เย็นแล้ว

เพื่อตรวจสอบการระเหยของน้ำออกจากภาชนะ โดยกำหนดให้ปริมาณน้ำในตัวอย่างระเหยออกไปไม่เกินร้อยละ 5

ตารางที่ 3.1 ปริมาณตัวอย่าง น้ำ และเวลาที่ใช้ในการหุงข้าว

Treatment sample	Sample weight (g)	Water (ml)	Soaking time (min)	Cooking time (min)
Fresh	20	30	10	21
Aged	20	36	10	22
Frozen	20	30	10	21
Aged-accelerated	20	30	10	20

3.3.9.4 การอัดตัวอย่าง

อัดตัวอย่างข้าวในกระป๋องด้วยแรงคงที่ขนาด 500 กรัม ให้ได้ระยะความสูงของทุก ๆ ตัวอย่าง เท่ากับระดับความสูงของข้าวใหม่ที่หุงสุกแล้ว โดยทำการวัดระยะความสูงจากด้านบนกระป๋องขึ้นสู่ด้านบนกระป๋องมีค่าประมาณ 2 เซนติเมตร เมื่ออัดตัวอย่างเสร็จทุกครั้ง ทำการชั่งน้ำหนักตัวอย่างอีกครั้งซึ่งต้องมีค่าใกล้เคียงน้ำหนักเดิมหลังหุงสุกเพื่อให้แน่ใจว่าน้ำจากตัวอย่างระเหยออกจากในปริมาณน้อย

3.3.10 การวัดเนื้อสัมผัสข้าวสุก

วัดเนื้อสัมผัสด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture analyzer, TA-XTplus, Stable Micro Systems Ltd., UK) ที่มี load cell เท่ากับ 50 กิโลกรัม เริ่มจากนำตัวอย่างข้าวสุกที่เตรียมได้ตามวิธีการในข้อ 10 มาวัดเนื้อสัมผัสแบบคอมเพรสชัน (compression) โดยใช้หัววัดทรงกระบอก (cylinder probe) ขนาด 35 มิลลิเมตร ตั้งระดับความสูงเริ่มต้นของหัววัดกับฐาน เท่ากับ 50 มิลลิเมตร และตั้งค่า pretest speed และ posttest speed เท่ากับ 1 มิลลิเมตร / วินาที กำหนดระยะที่หัววัดกดลงไปที่ผิวตัวอย่างที่ระดับความลึก 1.2 เซนติเมตร ค่าที่วัดได้จะอยู่ในรูปของค่าแรง (force) ที่เกิดขึ้นระหว่างหัววัดกับตัวอย่างในหน่วย กรัม และรายงานผลเป็นค่าความแข็ง (hardness) และความเหนียวติดกันของเม็ดข้าวสุก (stickiness)

3.3.11 การตรวจสอบคุณสมบัติทางความร้อนของตัวอย่างแป้งและสตาร์ชข้าว

ตรวจสอบคุณสมบัติทางความร้อนได้ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter DSC1

(DSC1, Mettler Toledo, thermal Switzerland) ที่ใช้ระบบอินดิเคเตอร์ตรวจสอบความถูกต้องของอุณหภูมิด้วย อินเดียม (indium) ชั่งตัวอย่างประมาณ 7 มิลลิกรัม ลงใน stainless steel DSC pan ที่มีปริมาตร ความจุ 60 ไมโครลิตร เติมน้ำดีไอออไนซ์ (deionized) 28 มิลลิกรัม คิดเป็นอัตราส่วน แบ่งต่อน้ำเท่ากับ 1 : 3 โดยบันทึกน้ำหนักแบ่ง และน้ำหนัก aluminum pan หลังปิดผนึกแล้ว ตັงบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน ใช้ aluminum pan เปล่าเป็นตัวอย่างอ้างอิง เริ่มให้ความร้อนจาก 25 ไปถึง 200 องศาเซลเซียส เพิ่มขึ้นที่อัตราเร็ว 10 องศาเซลเซียสต่อนาที โดยใช้ระบบ Intracooler (Intracooler 1P, Perkin Elmer, Connecticut, USA) เส้นกราฟการเปลี่ยนแปลงทางความร้อน จะถูกคำนวณและแสดงเป็นค่าอุณหภูมิเริ่มต้นของการเปลี่ยนเฟส T_o (onset temperature peak) อุณหภูมิสูงสุดของการเปลี่ยนเฟส T_p (peak of gelatinization temperature) และอุณหภูมิสุดท้ายของการเปลี่ยนเฟส T_c (conclusion temperature) และค่าพลังงานของการเปลี่ยนเฟส ΔH (melting transition enthalpy) คำนวณได้จากพื้นที่ใต้กราฟ

3.3.12 การวัดสีของตัวอย่าง

วัดสีของเมล็ดข้าว ฟลาร์ว และสตาร์ช ด้วยเครื่องวัดสี (Chromameter) (CR-300 Meter, Minolta Co, Ltd. Japan) โดยวัดในระบบ $L^*a^*b^*$ โดย calibrate เครื่องด้วยแผ่นกระเบื้องมาตรฐานสีขาว ซึ่งมีค่ามาตรฐาน คือ $Y = 93.50$, $x = 0.3114$ และ $y = 0.3190$

3.3.13 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design: CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วยการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ (Analysis of Variance: ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 14.0

3.4 ผลการทดลองและวิจารณ์

3.4.1 องค์ประกอบทางเคมีของข้าวสาร

องค์ประกอบทางเคมีของข้าวหอมมะลิ 105 จาก 4 กลุ่มตัวอย่างทดลอง ได้แก่ ข้าวที่เก็บเกี่ยวใหม่ (fresh rice) ข้าวเก่าเก็บ 1 ปีที่อุณหภูมิห้อง (aged rice) และ ข้าวแช่แข็ง 1 ปี เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (frozen rice) และข้าวเก่าเร่งด้วยอุณหภูมิสูง (accelerated rice) แสดงในตารางที่ 3.2 ความชื้นของตัวอย่างอยู่ในช่วง ร้อยละ 5.41 ถึง 10.67 ปริมาณไขมันอยู่ในช่วง ร้อยละ 0.12 ถึง 0.4 ปริมาณโปรตีนในช่วง ร้อยละ 7.31 ถึง 7.94 และปริมาณอะไมโลส ร้อยละ 18.88 ถึง 21.14 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างข้าวสารพันธุ์ข้าวดอกมะลิ105 ในสภาวะการทดลองที่ต่างกัน

Treatment samples	Chemical composition (%)			
	Moisture	fat	protein	amylose
Fresh	10.67±0.12d	0.40±0.028a	7.94±0.15	18.88±0.10
Aged	9.44±0.43c	0.40±0.038a	7.68±0.04	19.84±0.23
Frozen	6.84±0.01b	0.44±0.070a	7.94±0.44	18.14±0.92
Aged-accelerated	5.41±0.08a	0.12±0.024b	7.31±0.24	21.14±2.13

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณความชื้น และไขมันภายใน 4 กลุ่มตัวอย่างทดลอง พบว่าในตัวอย่างข้าวใหม่มีความชื้นสูงสุด ($p < 0.05$) รองลงมาคือ ข้าวแช่แข็ง ข้าวเก่า 1 ปี และข้าวเร่งตามลำดับ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Sea-Eaw, Chompreeda, Suwonsichon, Prinyawiwatkul and Haruthaithanasan, (2007) ที่พบการลดลงของความชื้นในตัวอย่างแป้งข้าวหอมมะลิหลังจากเก็บรักษาในถุงพลาสติกเป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยการลดลงของความชื้นในตัวอย่างเกิดจากการระเหยของน้ำอิสระที่มีในเมล็ด ออกสู่บรรยากาศภายนอกที่มีความชื้นน้อยกว่า หรือระเหยออกไปสู่อากาศเหนือภาชนะบรรจุที่มีความดันไอลดกว่าตัวอย่าง โดยเฉพาะพื้นที่บริเวณผิวเมล็ด (outer surface area) เพื่อทำให้เกิดสมดุลของความชื้นระหว่างตัวอย่างกับสภาวะแวดล้อม นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ข้าวพันธุ์ Basmati-370 และ Sharbati ที่เก็บไว้เป็นเวลาหนึ่งและสองปีนั้น ไม่มีความแตกต่างของปริมาณความชื้นในตัวอย่าง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากน้ำอิสระส่วนบริเวณผิวหน้าของเมล็ดระเหยออกไปเกือบหมดแล้วในระหว่าง 1 ปีของการเก็บ ส่งผลให้ในปีที่สองจึงไม่มีการสูญเสียความชื้นไป เพราะหลงเหลือน้ำที่ระเหยได้ในปริมาณน้อย (Sodhi, Singh, Arora and Singh, 2003)

ส่วนความชื้นของตัวอย่างข้าวเร่ง ที่มีปริมาณต่ำสุดเมื่อเทียบตัวอย่างทดลองทั้ง 3 นั้น อาจเป็นผลของการให้ความร้อนกับเมล็ดข้าว ที่อุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งความร้อนที่ระดับนี้ เป็นความร้อนในการเปลี่ยนสถานะของน้ำ ดังนั้นน้ำอิสระที่อยู่บริเวณผิวหน้าของเมล็ดจึงเปลี่ยนแปลงสถานะเป็นก๊าซ และระเหยออกไปได้ในปริมาณมาก ในเวลาอันรวดเร็ว

ขณะที่ปริมาณความชื้นในตัวอย่างข้าวแช่แข็ง (อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ปี) ที่มีย่าน้อยนั้น อาจเป็นผลของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากสภาวะการเก็บรักษา ซึ่งการเก็บตัวอย่างหรือผลิตภัณฑ์อาหารที่อุณหภูมิและความชื้นต่ำ คือ -22 องศาเซลเซียส และ ความชื้นสัมพัทธ์ต่ำกว่าร้อยละ 95 ให้ความชื้นที่บริเวณผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ระเหยออกไปได้ (มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, ออนไลน์).

2554) นอกจากนี้ยังอาจมีการสูญเสียความชื้นจากการระเหยของน้ำ อันเป็นผลจากการเปลี่ยนสถานะของน้ำที่มีอยู่ภายในเมล็ดจากของแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสกลับเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง ทำให้น้ำอิสระบางส่วนระเหยไประหว่างรอให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิห้อง และรวมถึงการระเหยของน้ำบางส่วนที่ผิวของเมล็ดจากความร้อนที่เกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการขัดสี และบดตัวอย่าง ซึ่งจะเกิดได้ในทุกตัวอย่าง รวมทั้งตัวอย่างข้าวแช่แข็งด้วยเช่นกัน

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไขมันที่สกัดได้จากทั้ง 4 กลุ่มตัวอย่างทดลองนั้นพบว่า ปริมาณไขมันที่สกัดได้จากตัวอย่างข้าวเก่า และข้าวแช่แข็งไม่แตกต่างจากข้าวใหม่ ขณะที่เมื่อนำข้าวผ่านการเร่งเป็นผลให้ปริมาณไขมันที่สกัดมาได้มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างข้าวใหม่ ($p < 0.05$) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างขององค์ประกอบที่อยู่ภายในเมล็ดข้าว โดยในส่วนของกรดไขมันสามารถเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับสายอะไมโลสที่บริเวณผิวของเม็ดสตาร์ช (amylose-lipid complex) ซึ่งยากต่อการสกัด (Zhou et al, 2003, Zhou, Robards, Helliwell and Blanchard, 2007) เมื่อปริมาณไขมันอิสระในตัวอย่างน้อยลง จึงส่งผลให้ปริมาณไขมันที่สกัดได้จากตัวอย่างข้าวเร่งมีค่าลดลงตามไปด้วย ทั้งนี้ Zhou และคณะ (2003) ได้ให้เหตุผลว่า การใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นตัวสกัดนั้นจะสามารถสกัดได้เฉพาะไขมันอิสระ (free lipid) ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 3.0-4.5 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 0.3-0.45 ของตัวอย่างฟลาร์วเท่านั้น แต่หากใช้แอลกอฮอล์เป็นตัวสกัดจะทำให้สามารถสกัดไขมันติดแน่น (bound lipids) ออกมาด้วยจึงทำให้ปริมาณไขมันที่สกัดได้ในตัวอย่างจะไม่เปลี่ยนแปลงหลังการเก็บ ($p > 0.05$) ดังนั้นจากผลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าการเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิต่ำ ไม่สามารถรักษาระดับความชื้นของตัวอย่างให้คงที่เหมือนก่อนการเก็บรักษาได้ ทั้งนี้การใช้อุณหภูมิสูงเร่งความเก่าของข้าวนั้นยังมีผลต่อการลดลงของความชื้น และปริมาณกรดไขมันอิสระที่สกัดได้ในตัวอย่างด้วย

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณอะไมโลสและโปรตีนระหว่างตัวอย่างทดลองทั้ง 4 พบว่าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับข้าวพันธุ์ Koshihikari, Kyeema และ Doongara ที่เก็บในอุณหภูมิ 4 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 เดือน (Zhou et al, 2007) และข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่เก็บไว้เป็นเวลา 7 เดือน ที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณอะไมโลส (จิรศักดิ์, เพลงพิน และ ทรงศิลป์, 2547)

3.4.2 ลักษณะทางเคมีกายภาพของฟลาร์ว และสตาร์ชข้าวที่สภาวะการทดลองต่างกัน

จากตารางที่ 3.3 จะเห็นได้ว่า ฟลาร์วที่เตรียมจากตัวอย่างข้าวใหม่ ข้าวเก่า และข้าวแช่แข็งมีการพองตัวของตัวอย่างไม่ต่างกัน ($p > 0.05$) การพองตัวของสตาร์ช (swelling power) นั้นแสดงถึงความสามารถของสตาร์ชในการดูดซับน้ำขณะให้ความร้อนที่อุณหภูมิ และเวลาใดหนึ่ง ๆ (Singh, Kaur, Sandhu, Kaur and Nishianri, 2006) ซึ่งอัตราการดูดซับน้ำของเม็ดสตาร์ชข้าวเก่าช้ากว่าข้าว

ใหม่ (Hogan, 1963) ดังนั้นที่เวลาเดียวกันเมล็ดstarข้าวเก่ายังดูดน้ำไม่เต็มที่ จึงทำให้ค่าการพองตัวของแป้งข้าวมีค่าใกล้เคียงกับข้าวใหม่ได้ ซึ่งการที่จะให้การพองตัวเกิดขึ้นได้สมบูรณ์จึงอาจจะต้องใช้เวลานานกว่านี้สำหรับตัวอย่างข้าวเก่าจะทำให้เห็นความแตกต่างได้ชัดเจนขึ้น ซึ่งหากพิจารณาค่ากำลังการพองตัวของตัวอย่างข้าวเก่า และข้าวแช่แข็งเปรียบเทียบกับข้าวใหม่ พบว่ามีแนวโน้มลดลง แต่ไม่มีผลแตกต่างสถิติ ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากการเก็บรักษาตัวอย่างในรูปข้าวเปลือก จึงทำให้ลดการเปลี่ยนแปลงที่จะเกิดขึ้นกับเมล็ดข้าวได้ จนทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจน ทั้งนี้ Sirisoontaralak และ Noomhorm (2007) ได้อธิบายไว้ว่าการที่พฤติกรรมการพองตัวและการดูดซึมน้ำของstarข้าวของแต่ละสายพันธุ์ในระหว่างการเก็บรักษานั้นแตกต่างกัน โดยในกลุ่มอะไมโลสสูงจะมีการพองตัวที่ดี และดูดน้ำได้สูงภายหลังการเก็บรักษา แต่ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองเป็นข้าวในกลุ่มอะไมโลสปานกลาง การเปลี่ยนแปลงการพองตัวของเมล็ดอาจเกิดขึ้นไม่ชัดเจนเท่ากับข้าวในกลุ่มอะไมโลสสูง นอกจากนี้ยังพบว่าฟลาร์วจากตัวอย่างข้าวแรง มีการพองตัวที่ระดับต่ำสุด เป็นผลของ

ตารางที่ 3.3 คุณลักษณะเคมีกายภาพของฟลาร์วและstarข้าวจาก 4 กลุ่มตัวอย่างทดลอง

Physico-chemical properties	Fresh	Aged	Frozen	Aged-accelerated
Swelling power (%)				
Flour	10.54±0.19B,a	10.28±0.17B,a	10.31±0.17B,a	9.76±0.08A,a
Starch	12.60±0.15BC,b	12.05±0.24AB,b	11.39±0.48A,b	13.17±0.50C,b
Soluble solid(%)				
Flour	6.04±0.24A,b	6.79±0.36B,b	8.38±0.03C,b	10.11±0.10D,b
Starch	5.16±0.30B,a	5.78±0.19C,a	4.85±0.25B,a	3.63±0.32A,a
Amylose leaching(%)				
Flour	4.71±0.53a	4.66±0.17a	4.63±0.59b	5.07±0.28b
Starch	7.92±0.13C,b	6.70±0.47B,b	2.08±0.33A,a	2.59±0.20A,a

ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันตามแนวนอน และอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การใช้ความร้อนเร่งให้ข้าวเก่า ทำให้มีรอยแยกที่ผิวเมล็ดเกิดขึ้นตรงจุดที่แข็งแรงน้อยที่สุด คือบริเวณรอยต่อระหว่างผนังเซลล์ที่ห่อหุ้มกลุ่มเมล็ดstarไว้ ซึ่งกลุ่มของstarข้าวในเมล็ดข้าวนั้นถูกยึด

เหนียวกันไว้ด้วยโปรตีน (the protein matrix) จึงเกิดปฏิสัมพันธ์ขึ้นระหว่างสตาร์ชกับสตาร์ช และ สตาร์ชกับโปรตีน ทำให้เม็ดสตาร์ชเกาะกันเป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่ (McDonucgh, Floyd, Waniska and Rooney, 2004) ทำให้เมล็ดข้าวมีลักษณะแน่นและแข็ง (Gujral และ Kumar, 2003; McDonucgh, Floyd, Waniska and Rooney, 2004) โดยผลที่เกิดขึ้นเป็นลักษณะเดียวกับปรากฏการณ์การเกิด case hardening ในอาหาร จากผลของความร้อนที่ใช้ทำให้อัตราการดูดน้ำของตัวอย่างข้าวเร่งมีค่าน้อย ส่งผลให้กำลังการพองตัวมีค่าต่ำกว่าด้วยเมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่น ๆ

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกำลังการพองตัวของฟลาร์ว์กับสตาร์ชจากตัวอย่างทดลองเดียวกัน พบว่าค่ากำลังการพองตัวที่วิเคราะห์ได้ในฟลาร์ว์ทั้ง 4 มีค่าต่ำกว่าสตาร์ชที่มาจากกลุ่มทดลองเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่าไขมันและโปรตีนที่มีเริ่มต้นในข้าวนั้นมีผลต่อการพองตัวของเม็ดสตาร์ช โดยการขัดขวางการดูดซับน้ำและการพองตัวของเม็ดสตาร์ช และส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากขั้นตอนการเตรียมสตาร์ชเอง ซึ่งตัวอย่างจะถูกแช่ในสารละลายต่าง ๆ เป็นเวลานานจึงอาจมีผลทำให้โครงสร้างของเม็ดสตาร์ชยืดหยุ่นและพองตัวได้ดีขึ้น เนื่องจากการเตรียมสตาร์ชจะมีการกำจัดโปรตีนออกไป โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งมีคุณสมบัติในการเพิ่มการพองตัว และการละลายของเม็ดสตาร์ช โดยการพองตัวจะเพิ่มขึ้นเมื่อค่าพีเอชของสารละลายต่างเพิ่มขึ้น (Olayinka, Adebawale and Oul-Owolabi, 2008) ขณะที่ค่าการพองตัวของสตาร์ชที่เตรียมจากตัวอย่างทั้ง 4 มีความแตกต่างกัน ($p < 0.05$) แสดงว่าระยะเวลาการเก็บรักษาที่นาน อุณหภูมิการเก็บรักษาที่ต่ำ รวมไปถึงความร้อนที่ใช้ในการเร่งความเก่าของข้าวนั้นล้วนมีผล ทำให้โครงสร้างของเม็ดสตาร์ชเปลี่ยนแปลงไปได้ ส่งผลต่อการพองตัวของเม็ดสตาร์ชทั้งหมดต่างกัน ($p < 0.05$)

โดยสตาร์ชจากตัวอย่างข้าวใหม่มีค่าการพองตัวไม่แตกต่างจากข้าวเก่า ($p < 0.05$) แต่สูงกว่าสตาร์ชจากข้าวแช่แข็ง แสดงว่าการเก็บรักษาในสถานะแช่แข็งอาจทำให้เม็ดสตาร์ชแข็งแรงขึ้น ส่งผลให้มีการพองตัวได้น้อยกว่าสตาร์ชจากข้าวใหม่ ทั้งนี้พบว่าหลังจากกำจัดโปรตีนแล้วพบว่าสตาร์ชจากข้าวเร่งมีค่ากำลังการพองตัวสูงสุด นอกจากจะเป็นผลจากการแช่ตัวอย่างในสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้สกัดสตาร์ช มีส่วนทำให้เม็ดสตาร์ชยืดหยุ่นและพองตัวได้ดีขึ้นเหมือนตัวอย่างสตาร์ชทั้ง 3 แล้ว รอยแยกบริเวณรอยต่อของผนังเซลล์หุ้มกลุ่มเม็ดสตาร์ช ที่เกิดขึ้นจากการให้ความร้อนเร่งข้าวเก่า นั้น ทั้งนี้การกำจัดโปรตีนออกไปทำให้ปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างสตาร์ชและโปรตีนระหว่างกระบวนการเร่งถูกทำลายลง จึงมีผลทำให้น้ำและความร้อนผ่านไปหุ้มสตาร์ชได้ดี ทำให้อัตราการพองตัวมีค่าสูงกว่าตัวอย่างทดลองอื่น ๆ ได้

ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ของฟลาร์ว์มีค่าสูงกว่าสตาร์ช ($p \leq 0.05$) ในทั้ง 4 กลุ่มตัวอย่าง (ตารางที่ 3.3) อาจเนื่องมาจากในขั้นตอนการเตรียมสตาร์ช มีการใช้สารละลายต่าง เพื่อกำจัดโปรตีนออกจากตัวอย่าง โปรตีนที่ขัดขวางการดูดน้ำ และพองตัวของสตาร์ชจะละลายออกมา

สารละลายค้างยังละลายบางส่วนของสายอะไมโลส หรืออะไมโลเพคตินที่มีขนาดเล็กที่บริเวณผิวหน้าของเม็ดสตาร์ชให้หลุดออกมา และถูกกำจัดออกพร้อมโปรตีน จึงทำให้ปริมาณของแข็งที่ละลายออกมาจากตัวอย่างสตาร์ชมีค่าน้อยลงเมื่อเทียบกับฟลาร์ว หากพิจารณาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสตาร์ชจากทั้ง 4 กลุ่มตัวอย่าง พบว่าสตาร์ชข้าวเร่งมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้น้อยกว่าสตาร์ชจากกลุ่มตัวอย่างอื่นๆ (ตรงข้ามกับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในฟลาร์วข้าวเร่งซึ่งมีค่ามากที่สุดเมื่อเทียบกับอีก 3 กลุ่มตัวอย่างทดลอง) ซึ่งอาจเกิดจากลักษณะของตัวอย่างเองที่เร่งให้เก่าด้วยความร้อน จนผิวหน้าของเมล็ดข้าวแตกร้าว (Gujral และ Kumar, 2003) และเกิดการเจลาติไนซ์ของสตาร์ชได้บางส่วน ทำให้อะไมโลส และอะไมโลเพคตินสามารถละลายออกมาพร้อมกับโปรตีนในขั้นตอนการสกัดสตาร์ชได้มากกว่าตัวอย่างอื่นๆ จึงคงเหลือเฉพาะส่วนของสตาร์ชที่แข็งแรงแรงและพองตัวได้ยาก

เมื่อพิจารณาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในส่วนของฟลาร์วพบว่า ฟลาร์วข้าวใหม่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้น้อยฟลาร์วข้าวเก่า อาจเนื่องโปรตีนที่อยู่ในข้าวใหม่ซึ่งช่วยยึดเกาะกลุ่มเม็ดสตาร์ชไว้ด้วยกันนั้นมีความแข็งแรงน้อยเมื่อเทียบกับโปรตีนในข้าวเก่าอายุ 1 ปี ทำให้เม็ดสตาร์ชในข้าวใหม่เจลาติไนซ์ได้ง่ายและรวดเร็วเมื่อได้รับความร้อน (85 องศาเซลเซียส) เกิดเจลาเฉพาะกลุ่มของเม็ดสตาร์ชที่อยู่ผิวนอกห่อหุ้มกลุ่มเม็ดสตาร์ชที่อยู่ด้านในเอาไว้ ทำให้ความร้อนและน้ำซึมผ่านชั้นเจลาชั้นนอกเข้าไปได้ยาก ส่งผลให้ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้จากฟลาร์วข้าวใหม่มีค่าต่ำกว่าฟลาร์วข้าวเก่า

ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในฟลาร์วข้าวเร่งมีค่าสูงสุด ($p < 0.05$) ตรงกันข้ามกับค่ากำลังการพองตัวที่มีค่าต่ำ เนื่องจากข้าวเร่งมีรอยแยกระหว่างกลุ่มเม็ดสตาร์ช โอกาสที่ความร้อนและน้ำจะแพร่เข้าสู่โครงสร้างภายในเม็ดสตาร์ชจึงเป็นไปได้ง่าย ทำให้ส่วนของสตาร์ชหลุดออกมาตามรอยแตกได้มากกว่าฟลาร์วอื่นๆ

เมื่อศึกษาถึงการปลดปล่อยอะไมโลสอิสระในตัวอย่างฟลาร์ว พบว่าตัวอย่างฟลาร์วทั้ง 4 มีการปลดปล่อยอะไมโลสอิสระในปริมาณไม่แตกต่างกัน ($p < 0.05$) หลังกำจัดโปรตีนออกไปแล้ว พบว่าปริมาณอะไมโลสถูกปลดปล่อยออกจากสตาร์ชข้าวใหม่และข้าวเก่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับฟลาร์ว เป็นผลจากส่วนโปรตีนที่ขัดขวางการดูดน้ำของสตาร์ชถูกกำจัดออกไป ทำสตาร์ชพองตัวได้ง่ายขึ้นส่วนของอะไมโลสจึงหลุดออกมาได้มากขึ้น ขณะที่ตัวอย่างสตาร์ชจากข้าวแช่แข็ง และข้าวเร่งมีการปลดปล่อยอะไมโลสอิสระน้อยลง เกิดจากอะไมโลสบางส่วนหลุดออกมาจากรอยแยกซึ่งเกิดจากการให้ความร้อนในข้าวเร่งเก่า โดยละลายออกมาในน้ำและถูกกำจัดออกไปพร้อมกับโปรตีน ทำให้เหลือส่วนของอะไมโลสที่จะหลุดออกมาจากโครงสร้างได้น้อยลง

จากค่าการพองตัวของแป้ง ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ และการปลดปล่อยอะไมโลส

อิสระที่ต่างกันของตัวอย่างก่อนและหลังกำจัดโปรตีน แสดงว่าโปรตีนเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสตาร์ช โดยเมื่อนำมาพิจารณาพร้อมกับปริมาณโปรตีน และอะไมโลสที่ไม่แตกต่างกันทั้ง 4 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.2) ภายหลังการเก็บ บ่งชี้ว่าการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพของข้าวภายหลังการเก็บรักษาน่าจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางเคมี เช่น พันธะหรือปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนกับโปรตีน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปิดตัว หรือการเกาะกลุ่มกันของโมเลกุลโปรตีนที่อยู่บริเวณใกล้เคียงกับสตาร์ชเพิ่มขึ้น ทำให้ขัดขวางการแทรกผ่านของน้ำและความร้อน เข้าสู่เมล็ดสตาร์ช

สี (color) คือ คุณลักษณะหนึ่งของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์อาหารที่มีความสำคัญอย่างมาก เพราะมีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภคโดยตรงผ่านประสาทสัมผัสทางตา หรือการมองเห็น โดยสีของวัตถุดิบ หรือผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างไปจากเดิม อาจบ่งชี้ถึงคุณภาพที่เปลี่ยนแปลง หรือเสื่อมเสียได้

ตารางที่ 3.4 ค่าสีของเมล็ด ฟลาร์ว์ และสตาร์ชจาก 4 กลุ่มตัวอย่างทดลอง

Colour		Treatment samples			
		Fresh	Aged	Frozen	Aged-accelerated
L*	Grains	69±1.14A,a	69±2.25A,a	69±2.62A,a	74±2.36B
	Flour	74±0.17A,b	74±0.5A,b	75±0.57B,b	75±0.40B
	Starch	76±0.54C,c	76±0.23BC,b	75±0.29B,b	74±0.46A
a*	Grains	-4.04±0.07A,a	-4.76±0.12B,c	-4.52±0.24B,b	-4.77±0.21B,c
	Flour	-3.72±0.27b	-4.05±0.06a	-3.78±0.07a	-3.65±0.33a
	Starch	-4.77±0.17b	-4.58±0.03b	-4.28±0.06b	-4.26±1.45b
b*	Grain	11.98±0.16AB,c	14.14±0.61C,c	11.77±0.55A,b	12.95±0.61B,c
	Flour	4.51±0.07C,b	5.27±0.14D,b	3.67±0.04B,a	3.35±0.04A,a
	Starch	3.21±0.06A,a	3.30±0.07A,a	3.57±0.11B,a	4.15±0.07C,b

ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันตามแนวนอน และตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากเหตุผลที่กล่าวมานี้ แสดงว่าสีเมล็ดข้าวจึงเป็นสิ่งที่ต้องให้ความสนใจ (Unnevehr, Duff, and Juliano, 1992; Juliano 1998; Siebenmorgan, 1998) ดังนั้นสีของข้าวสาร ฟลาร์ว์ และสตาร์ชข้าวที่เปลี่ยนแปลงไป บ่งชี้ถึงคุณภาพของข้าวที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจเป็นผลจาก

การเปลี่ยนแปลงทางเคมีขององค์ประกอบหลัก เช่น สตาร์ช โปรตีน ไขมัน ได้ จากตารางที่ 3.3 พบว่า เมล็ดข้าวผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสมีสีขาวครีม ใกล้เคียงกับสีที่วัดได้จาก เมล็ดข้าวใหม่โดยพิจารณาจากค่า L^* (lightness) ที่อยู่ในระดับสูง และ b^* (yellowness) อยู่ในระดับต่ำ แสดงว่าการเก็บรักษาข้าวที่อุณหภูมิต่ำสามารถรักษาคุณภาพด้านสีของตัวอย่างข้าวได้ ซึ่งต่างกับสีของตัวอย่างเมล็ดข้าวเก่าอายุการเก็บ 1 ปีที่อุณหภูมิห้องจะมีสีขาวเหลือง โดยพิจารณาจากค่า b^* ที่สูงกว่าตัวอย่างเมล็ดข้าวใหม่ ซึ่งสอดคล้องการรายงานของ Sirisontaralak and Noomhorm (2006) ที่พบว่าข้าวขาวดอกมะลิ 105 อายุ 1 ปี และข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ผ่านการอบรังสีแกมมา (ที่ 0.1-1 กิโลเกรย์) อายุ 1 ปี จะเกิดสีเหลืองที่เมล็ดเพิ่มขึ้น

ลักษณะสีเหลืองที่เกิดขึ้นในข้าวเก่าที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องนี้เกิดจากปฏิกิริยาสีน้ำตาล (Maillard reaction) ระหว่างหมู่คาร์บอนิลจากน้ำตาลรีดิวซิงซ์ กับหมู่เอมีนของกรดอะมิโน โปรตีน โดยปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีของปริมาณคาร์บอนิล และเอมีนในปริมาณมาก โดยสีเหลืองจากปฏิกิริยาสีน้ำตาลดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้ในข้าวที่อยู่ระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (Chrastil, 1990) ทั้งนี้การเก็บข้าวไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส จะทำให้เกิดการออกซิเดชันของไขมันในเมล็ดข้าวทำให้ปริมาณกรดไขมันอิสระ ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ รวมทั้งหมู่คาร์บอนิล (โพลฟานาล, อะซิเตดีไฮด์, เฮกซานาล, เพนทานาล และ 2-บิวทานอน) มีปริมาณเพิ่มขึ้นซึ่งสารในกลุ่มนี้จะให้ลักษณะของกลิ่นเหม็นหืน (stale flavor) ในข้าวหลังหุงสุก (Juliano, 1985) และสารประกอบคาร์บอนิลที่เกิดขึ้นยังมีส่วนทำให้เกิดสีที่ผิดปกติของข้าวได้ด้วย โดยสารประกอบคาร์บอนิล และไฮโดรเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะถูกใช้เป็นส่วนตั้งต้นการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลเหมือนกับหมู่คาร์บอนิลที่มีในน้ำตาลรีดิวซิงซ์ สอดคล้องกับการอธิบายของ นิธิยา (2545) ที่ว่าสารประกอบคาร์บอนิลที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิด จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนเกิดเป็นสารสีน้ำตาลได้ การออกซิเดชันของกรดไขมัน (lipid oxidation) จึงถือว่ามีผลกระทบต่อคุณภาพของข้าว (Kim and Cho, 1993) ทั้งด้านกลิ่นที่เหม็นหืนและสีน้ำตาลที่เกิดขึ้น

ค่า L^* ในตัวอย่างเมล็ดข้าวเร่งที่มีค่าสูง ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับเมล็ดข้าวจากตัวอย่างอื่น อาจเกิดจากการเจลาติไนซ์ของเม็ดสตาร์ชบางส่วนที่บริเวณผิวหน้าของเมล็ดข้าว เนื่องจากการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงเพื่อเร่งให้ข้าวเก่า ทำให้พันธะไฮโดรเจนที่ยึดระหว่างสายพอลิเมอร์ของสตาร์ชถูกทำลายลง เป็นผลให้สายอะไมโลสและอะไมโลเพกตินสายยาวเคลื่อนที่ได้อิสระเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิต่ำลงจึงเคลื่อนที่มาชิดกันและจัดเรียงตัวกันใหม่ (reassociate) ทำให้แสงทะลุผ่านเมล็ดข้าวได้น้อยลง ส่งผลต่อค่า L^* ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวใหม่

เมื่อพิจารณาค่า L^* และ b^* ที่วัดได้จากฟลาว์ และสตาร์ช 3 กลุ่ม ได้แก่ ข้าวเก่า ข้าวใหม่ และข้าวเร่ง มีค่า L^* สูง และ b^* ที่ต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้จากตัวอย่างเมล็ดข้าว

แสดงว่าฟลาร์ว และสตาร์ชข้าวทั้ง 3 กลุ่มมีสีข้าวกว่าตัวอย่างทดลองที่เป็นเมล็ดข้าว ซึ่งเป็นผลจากการบดตัวอย่างให้เป็นแป้งที่มีขนาดอนุภาคเล็ก และละเอียดทำให้แสงกระจายในตัวอย่างได้ดีกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าช่วงของความแตกต่างของค่าสีเหลือง (b^*) ในฟลาร์วทั้ง 4 แคลงกว่าวัดได้ในตัวอย่างเมล็ดเมล็ดข้าว การแยกความแตกต่างด้วยสีเหลืองในตัวอย่างที่บดแล้วไม่ชัดเจนเท่ากับในเมล็ด โดยค่า b^* ที่วัดได้ในฟลาร์วมีค่าน้อยกว่าที่วัดได้ในเมล็ดข้าว ($p < 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากการวัดสีของเมล็ดข้าวจะวัดที่ตำแหน่งผิวของเมล็ดโดยตรง ซึ่งเป็นบริเวณที่มีส่วนของโปรตีน และไขมันหนาแน่นมากกว่าบริเวณอื่น จึงมีสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลได้มาก จึงวัดค่าสีเหลืองได้มาก และเมื่อบดเป็นแป้งแล้วในกรณีของฟลาร์วทำให้ส่วนที่เป็นสีเหลืองบริเวณผิวหน้าเมล็ดข้าวผสมกับส่วนที่เป็นแป้งสีขาวสีเหลืองจึงมีค่าลดลง

โปรตีนในเมล็ดข้าวมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าสีของตัวอย่างข้าวใหม่และข้าวเก่าอย่างชัดเจนพิจารณาจาก ค่า L^* เพิ่มขึ้น และ b^* ลดลง โดยสตาร์ชมีสีขาวขึ้นและมีสีเหลืองลดลงหลังจากกำจัดโปรตีน ขณะที่ตัวอย่างฟลาร์วและสตาร์ชแช่แข็งไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่า L^* และ b^* แสดงว่าการเก็บรักษาข้าวที่อุณหภูมิต่ำสามารถชะลอการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลในข้าวได้ และจากผลที่เกิดขึ้นสรุปได้ว่า การวัดค่าสีมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้แยกความแตกต่างของฟลาร์ว และเมล็ดข้าวระหว่าง 2 กลุ่มตัวอย่างทดลองคือ ข้าวใหม่และข้าวเก่า 1 ปีเก็บที่อุณหภูมิห้องได้ เนื่องจากค่าสีที่วัดได้ในตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยใช้ค่า b^* เป็นค่าหลักที่ใช้พิจารณาความแตกต่าง

3.4.3 คุณสมบัติการเกิดเพสท์ (pasting properties)

จากการศึกษาคุณสมบัติในการเกิดเพสท์ของฟลาร์ว ฟลาร์วที่กำจัดไขมันออกแล้ว และสตาร์ชจากตัวอย่างทดลองทั้ง 4 ด้วยเครื่องวัดความหนืดแบบรวดเร็ว ฟลาร์วที่เตรียมจากข้าวแสดงคุณสมบัติการเกิดเจลละติไนซ์ที่แตกต่างกัน ($p < 0.05$) ทั้ง 4 กลุ่มตัวอย่างทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.5 และ ภาพที่ 3.1 โดยเมล็ดสตาร์ชจากฟลาร์ข้าวใหม่จะมีการพองตัวที่สูงและการแตกสลายของเมล็ดสตาร์ชสูง เมื่อเปรียบเทียบกับฟลาร์วจากตัวอย่างอื่น ๆ โดยพิจารณาจากค่าความหนืดสูงสุด (peak viscosity, PV) และ เบรคดาวน์ (breakdown, BD) ที่สูงสุด ขณะที่ค่าความหนืดสุดท้าย (final viscosity, FV) มีค่าต่ำ ดังเส้นพิคความหนืดที่แสดงใน ภาพที่ 3.1 นอกจากนี้ยังพบว่าการกลับริวมตัวกันใหม่ของสายอะไมโลสกับองค์ประกอบอื่น ๆ เกิดเป็นเจลที่ค่อนข้างอ่อนนุ่ม โดยพิจารณาจากค่าเซตแบค (setback, SB) และ FV ที่ค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าค่าอุณหภูมิในการเกิดเพสท์ (pasting temperature, PT) ฟลาร์วข้าวใหม่มีค่าต่ำสุด แตกต่างจากข้าวเก่าที่มีค่า PV และ BD ที่ต่ำ ซึ่งบ่งชี้ว่าเมล็ดสตาร์ชมีการพองตัว และแตกตัวในระดับที่ต่ำ สอดคล้องกับเส้นกราฟความหนืดในช่วงนี้ที่มีค่าต่ำกว่าฟลาร์วข้าวใหม่ ขณะที่ค่า SB และ FV ของฟลาร์วข้าวเก่า

มีค่าสูงสุด แสดงถึงการกลับมารวมตัวกันใหม่ของสายอะไมโลสและองค์ประกอบเกิดเป็นเจลที่มีความแข็งแรงมากกว่าเจลที่ได้จากข้าวใหม่ โดย Sowbhagya และ Bhattacharya (2001) กล่าวว่า ค่า PV และ BD ที่ต่ำในข้าวเก่าเกิดจากการจัดเรียงโครงสร้างใหม่ขององค์ประกอบภายในเมล็ดข้าว มีผลทำให้เกิดการต้านทานการพองตัวและการแตกสลายของเม็ดสตาร์ช โดยได้ทดลองเก็บรักษาข้าวเปลือกทั้งหมด 15 สายพันธุ์ คือ กลุ่มที่มีปริมาณอะไมโลสต่ำและอะไมโลสปานกลาง นำมาเก็บรักษา 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ปี พบการเปลี่ยนแปลงลักษณะของการเกิดเพสท์ของตัวอย่างตลอดเวลาการเก็บ โดยการเปลี่ยนแปลงความหนืดจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้นของระยะการเก็บรักษา และจะเปลี่ยนแปลงเริ่มช้าลงเมื่ออายุการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น และจากผลการติดตามเป็นระยะเวลา 4 ปี ก็ยังพบการเปลี่ยนแปลงความหนืดของข้าวเกิดขึ้นตลอดเวลา จึงคาดว่า การเปลี่ยนแปลงนี้ยังดำเนินต่อไป ซึ่งการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการเกิดเพสท์ของข้าวภายหลังการเก็บ สามารถพิจารณาได้จากการลดลงของค่า BD (Sowbhagya and Bhattacharya, 2001; Zhou et al, 2003) และ เพิ่มขึ้นของค่า SB (Shin, Min, and Kim, 1991; Sowbhagya and Bhattacharya, 2006) ในฟลาร์วีข้าว

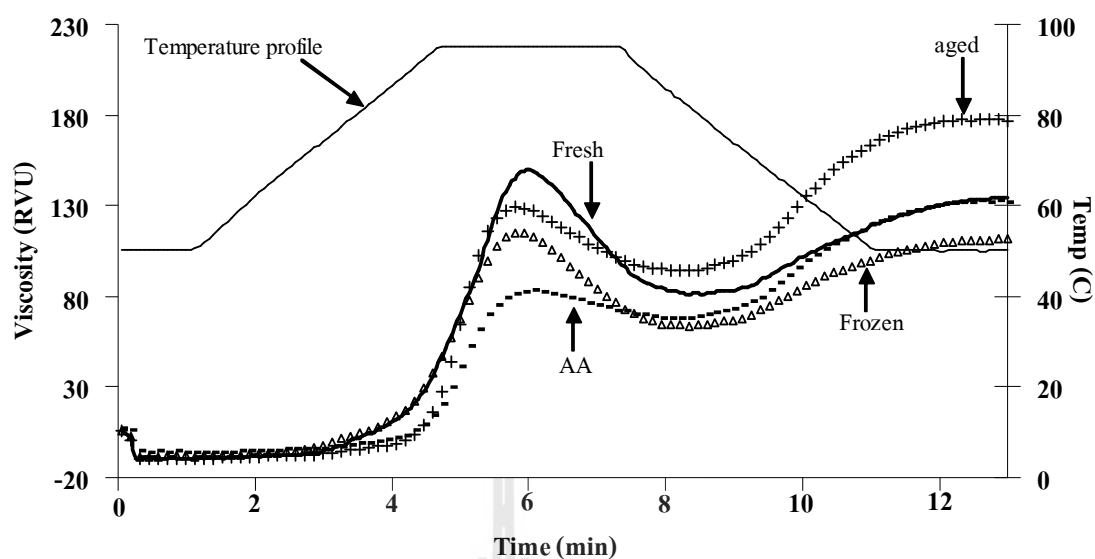
สำหรับตัวอย่างฟลาร์วีที่เตรียมจากข้าวแช่แข็ง 1 ปีที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มีลักษณะการเกิดเพสท์แตกต่างจากฟลาร์วีข้าวใหม่ จึงชี้ให้เห็นว่าการเก็บรักษาข้าวที่อุณหภูมิต่ำไม่สามารถคงลักษณะของเจลไว้เหมือนก่อนเก็บรักษาได้ โดยเม็ดสตาร์ชพองตัวได้ดีเพียงช่วงแรกเหมือนของข้าวใหม่ (ภาพที่ 3.1) แต่มีค่า PV ที่ต่ำกว่าของฟลาร์วีข้าวใหม่และข้าวเก่า ($p < 0.05$) ส่วนค่า BD ที่แสดงถึงความทนทานต่อการแตกสลายของเม็ดสตาร์ชของฟลาร์วีจากข้าวแช่แข็งมีค่าต่ำกว่าข้าวใหม่ แต่สูงกว่าข้าวเก่า นอกจากนี้พบว่าฟลาร์วีจากตัวอย่างข้าวแช่แข็งจะเกิดเจลที่อุณหภูมิสูงกว่าฟลาร์วีจากข้าวใหม่ด้วยดังแสดงจากค่า PT ที่สูงกว่า ลักษณะเส้นกราฟความหนืดของฟลาร์วีจากตัวอย่างแช่แข็งนั้นคล้ายคลึงกับเส้นกราฟที่ได้จากฟลาร์วีข้าวใหม่ เพียงแต่กราฟเส้นกราฟความหนืดในช่วงให้ความร้อนจะอยู่ระดับต่ำกว่าอันเป็นผลจากการพองและการแตกตัวของเม็ดสตาร์ชที่ต่ำกว่า

การใช้อุณหภูมิสูงในการเร่งความเก่าของข้าว มีผลอย่างมากต่อคุณสมบัติการเกิดเพสท์และลักษณะของเจล โดยฟลาร์วีที่เตรียมได้จากข้าวเร่งนั้น มีการพองตัวของเม็ดสตาร์ช อยู่ในระดับต่ำสุด และมีการแตกสลายของเม็ดสตาร์ชน้อย (ตารางที่ 3.5) เมื่อเปรียบเทียบกับฟลาร์วีจากตัวอย่างอื่น โดยลักษณะเส้นกราฟความหนืดมีการเพิ่มขึ้นของความหนืดเริ่มต้นใกล้เคียงกับฟลาร์วีข้าวเก่า แต่ช้ากว่าฟลาร์วีข้าวใหม่และข้าวแช่แข็งและมีพีคอยู่ในระดับต่ำ (ภาพที่ 3.1) สอดคล้องกับคำอธิบายของ Zhou และ คณะ (2003) ที่ว่าการใช้อุณหภูมิสูงในขณะที่เก็บรักษาข้าวเป็นเวลานาน เม็ดสตาร์ชจะดูดซับน้ำได้น้อย และยังยากต่อการถูกทำลายด้วยกระบวนการให้ความร้อน (hydrothermal disruption)

ตารางที่ 3.5 คุณสมบัติการเกิดเพสท์ของตัวอย่างฟลาร์ว์ ฟลาร์ว์ที่สกัดไขมันออก และสตาร์ซ์ จากข้าวที่สภาวะการทดลองต่างกัน

Treatment samples		Pasting Temp (°C)	Peak (RVU)	Breakdown (RVU)	Final viscosity (RVU)	Setback (RVU)
Fresh	Flour	75.63A,n	148.39D,n	69.42D	133.28B,n	54.31B,n
	Defatted flour	76.37a,n	158.31d,o	68.58d	132.89c,n	43.17a,m
	Starch	72.9N,m	144.19O,m	71.36O	106.19M,m	33.36M,m
Aged	Flour	89.4C,n	126.08C	31.67C,m	176.56C,o	82.14D,o
	Defatted flour	88.88c,n	125.53c	31.86b,m	166.22d,n	72.56c,n
	Starch	71.32M,m	132.25N	54.5N,n	116.52N,m	40.78N,m
Frozen	Flour	84.23 B, n	115.42B,n	48.03B,o	115.89A,n	48.5A,n
	Defatted flour	85.6b,n	113.78b,n	52.58c,n	105.44a,m	44.25a,m
	Starch	72.68MN,m	101.94M,m	35.5M,m	113MN,n	46.56O,n
Aged- accelerated	Flour	89.93C,n	82.78A,n	15.69A,m	131.81B,n	64.72C,o
	Defatted flour	89.93c,n	78.19a,m	18.83a,m	117.64b,m	58.28b,n
	Starch	74.53O,m	127.86N,o	51.11N,n	111.75MN,m	35M,m

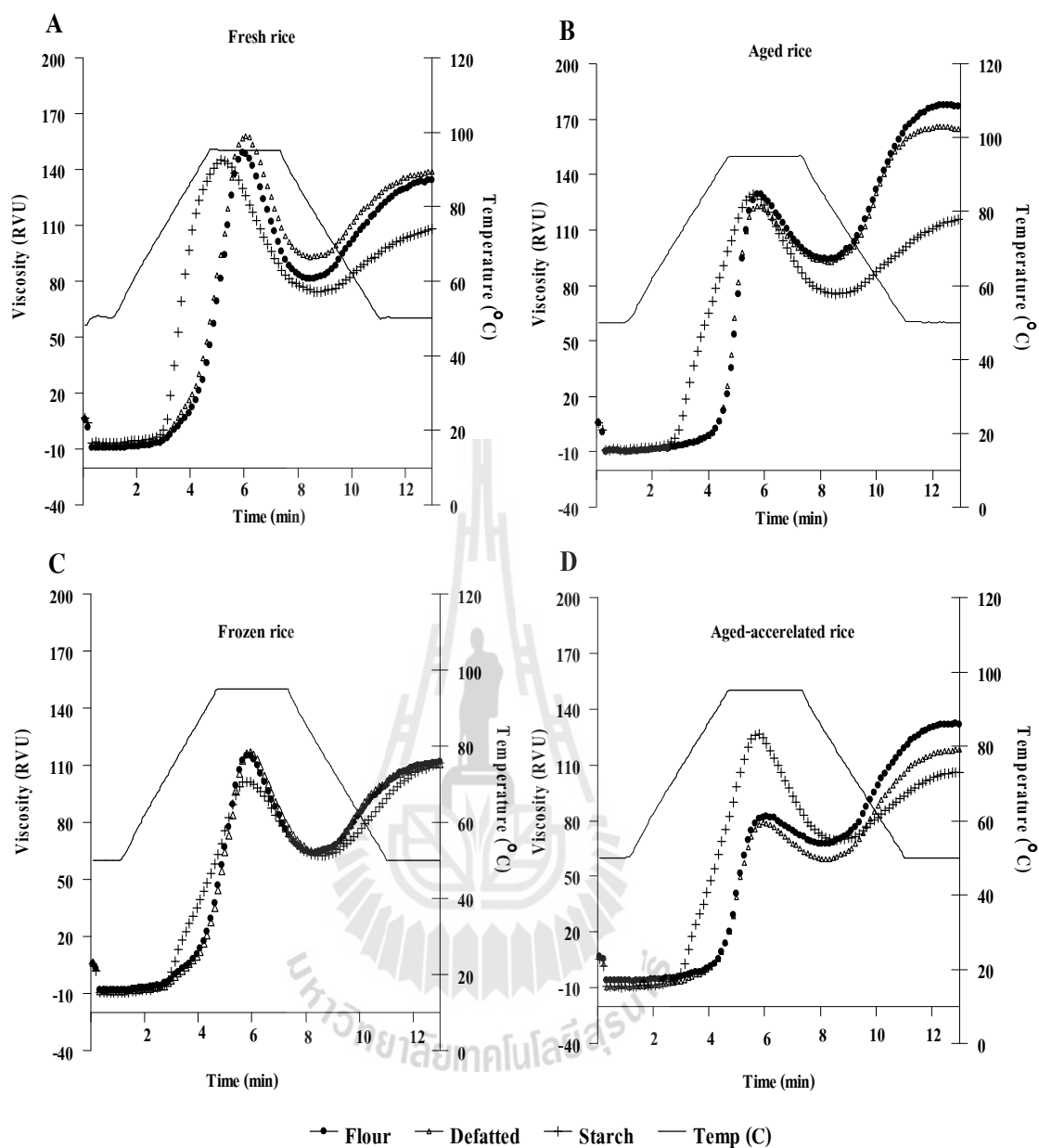
ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่และตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) A-D ใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของ ฟลาร์ว์ a-d ใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของฟลาร์ว์ที่กำจัดไขมัน M-P ใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของสตาร์ซ์ m-p ใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของ ฟลาร์ว์ ฟลาร์ว์ที่กำจัดไขมันแล้ว และสตาร์ซ์



ภาพที่ 3.1 เส้นกราฟความหนืดของตัวอย่างฟลาร์วข้าวที่สภาวะการเก็บต่าง ๆ

ขณะที่ค่า FV และ SB ของฟลาร์วข้าวเร่งมีค่า ต่ำกว่าฟลาร์วข้าวเก่า แสดงถึงลักษณะเจลที่อ่อนนุ่มกว่าภายหลังเจลาติไนซ์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีส่วนอะไมโลสที่หลุดออกมาเพียงเล็กน้อย ประกอบกับเม็ดสตาร์ชที่พองตัวได้น้อย เมื่ออะไมโลส ซึ่งกลับมาจัดเรียงตัวกันใหม่จะถูกขัดขวางจากกลุ่มเม็ดสตาร์ชที่พองตัวได้น้อยอยู่ภายในสารละลายแป้งหลังให้ความร้อน

การเปรียบเทียบคุณสมบัติการเกิดเพสท์ของตัวอย่างก่อน และหลังกำจัดไขมันดังในตารางที่ 3.5 พบว่าไขมันมีผลต่อคุณสมบัติการเกิดเพสท์ของตัวอย่าง โดยหลังจากสกัดไขมันอิสระออกไปจากฟลาร์วแล้ว พบว่าค่า SB ของตัวอย่างที่กำจัดไขมันออกไปนี้จะมีค่าต่ำกว่า ฟลาร์ว 4 ตัวอย่าง และค่า FV มีค่าลดลงในตัวอย่างฟลาร์วข้าวเก่า ข้าวแช่แข็ง และข้าวเร่งที่กำจัดไขมันออกไป ลักษณะเส้นกราฟของฟลาร์วทั้ง 3 ได้แก่ ข้าวใหม่ ข้าวเก่า และข้าวเร่งเก่า(ภาพที่ 3.2 A, B และ D) ในขั้นตอนสุดท้ายที่มีการปรับลดอุณหภูมิของฟลาร์วที่ผ่านเจลาติไนซ์ จะสังเกตเห็นว่าเส้นกราฟความหนืดของฟลาร์วทั้ง 3 ก่อนกำจัดไขมันจะอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าฟลาร์ว แสดงว่าไขมันมีส่วนในการเพิ่มค่า FV ของฟลาร์ว สอดคล้องกับผลการทดลองของ Zhang และ Hamaker (2003) ที่พบว่าตัวอย่างสตาร์ชข้าวฟางจะมีพีคความหนืดช่วงสุดท้ายต่ำกว่าตัวอย่างสตาร์ช ที่มีการเติมกรดไขมันอิสระ 3 ชนิด กรดปาล์มติก กรดโอเลอิก และกรดลิโนเลอิก ลงไป อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาค่า PT ของทั้ง 4 กลุ่มทดลองเปรียบเทียบก่อน และหลังกำจัดไขมันในตารางที่ 3.4 พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ทั้งนี้จะพบว่าอิทธิพลของไขมันในเมล็ดข้าวที่มีการเกิดเพสท์ของตัวอย่างนั้น ยังมีน้อยกว่าอิทธิพลของโปรตีน เนื่องจากคุณสมบัติการเกิดเพสท์ของตัวอย่างทั้ง 4 ที่เปลี่ยนแปลง



ภาพที่ 3.2 ความหนืดของตัวอย่างฟลาวร์และฟลาวร์ที่กำจัดไขมัน และสตาร์ชข้าวที่สภาวะการเก็บต่าง ๆ กัน A; ข้าวใหม่ B; ข้าวเก่า C; ข้าวแช่แข็ง และ D; ข้าวเร่ง

ไปอย่างมาก ภายหลังการโปรตีนกำจัดโดยพิจารณาผลจากตารางที่ 3.5 และภาพที่ 3.2 A-D โดยจากตารางที่ 3.3 พบว่าอุณหภูมิในการเกิดเพสท์สตาร์ชจาก 4 กลุ่มตัวอย่างมีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับที่มีโปรตีน อธิบายได้ว่าโปรตีนในข้าวมีส่วนขัดขวางการเจลาติไนซ์ของสตาร์ช เนื่องจากโปรตีนสามารถจับกับน้ำได้ดีกว่าสตาร์ช จึงมีโมเลกุลของน้ำที่สามารถจับกับสตาร์ชได้น้อยลง ทำให้การพองตัวรวมทั้งการปลดปล่อยอะไมโลสออกจากโครงสร้างสตาร์ชทำได้น้อยกว่า เมื่อเทียบกับสตาร์ช

(Martin and Fitzgerald, 2002) โดยในปี 2000 Teo, Karim, Cheah, Norziah และ Seow รายงานว่าการเติมโปรตีนลงในสตาร์ชมีผลต่อเพิ่มค่า PV และ BD ในสตาร์ชข้าวพันธุ์ Makmur77 ดังนั้นการที่โปรตีนถูกกำจัดออกไป จึงส่งผลให้เม็ดสตาร์ชสามารถพองตัวและเจลาติไนซ์ง่ายที่อุณหภูมิค่าลงประมาณ 71-74 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 3.5) โดยโปรตีนสามารถขัดขวางการเจลาติไนซ์ของสตาร์ชได้ โดยทำให้สตาร์ชพองตัวได้ช้าลง ซึ่งจะสังเกตจากเส้นกราฟของสตาร์ชทั้ง 4 แสดงการเพิ่มขึ้นของความหนืดเร็วกว่าฟลาร์วทั้งก่อนและหลังกำจัดไขมัน ดังแสดงในภาพที่ 3.2A-D ลักษณะเส้นกราฟของสตาร์ชจะแยกออกจากฟลาร์วอย่างชัดเจน โดยเมื่อพิจารณาเส้นกราฟสตาร์ชทั้ง 4 เปรียบเทียบกับฟลาร์วก่อนและหลังกำจัดไขมันในช่วงการลดอุณหภูมิพบว่าเส้นกราฟของสตาร์ชอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าฟลาร์วทั้ง 2 แสดงถึงลักษณะของเจลที่อ่อนนุ่มกว่าฟลาร์ว

แสดงว่าโปรตีนในข้าวน่าจะเกิดปฏิกิริยสัมพันธ์กับสายอะไมโลสที่หลุดออกจากเม็ดสตาร์ชหลังเจลาติไนซ์ เกิดเป็นโครงสร้างสามมิติของเจลที่แข็งแรงมากกว่า เจลที่เกิดขึ้นจากการรวมตัวเฉพาะอะไมโลสเพียงอย่างเดียว

3.4.4 คุณสมบัติทางความร้อน (Thermal properties)

การเกิดเจลาติไนเซชันของสตาร์ชนั้น เป็นกระบวนการที่สตาร์ชจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นลักษณะเจลข้นหนืด ในสภาวะที่เม็ดแป้งหรือสตาร์ชห่อตัวด้วยน้ำตั้งแต่ร้อยละ 70 ขึ้นไป โดยอาศัยความร้อนที่ทำให้แกระบบ ทำให้พันธะเคมี เช่น ไฮโดรเจนถูกทำลาย เม็ดแป้งจึงเกิดการดูดน้ำและพองตัว เป็นผลให้ความหนืดเพิ่มสูงขึ้น และเมื่อเม็ดแป้งแตกลง สายอะไมโลส และอะไมโลเพกติน จะเกิดการจับเรียงตัวกันเกิดเป็นโครงสร้างสามมิติที่กักเก็บน้ำภายในเกิดเป็นลักษณะเจล ซึ่งช่วงอุณหภูมิ และพลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลาติไนเซชันวัดได้ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) โดยมีการแสดงอุณหภูมิของเจลาติไนเซชันของตัวอย่างได้ 3 ช่วง คือ ช่วงอุณหภูมิเริ่มการเปลี่ยนแปลง (onset temperature; T_o) อุณหภูมิสูงสุดในการเกิดเจลาติไนเซชัน (peak temperature; T_p) และ อุณหภูมิสุดท้ายของการเกิดเจลาติไนเซชัน (conclusion temperature; T_c) รวมถึงค่าพลังงานที่เปลี่ยนแปลงไประหว่างเกิดเจลาติไนเซชัน (enthalpy; ΔH (J/g)) จากผลการศึกษาค่าคุณสมบัติเชิงความร้อนของฟลาร์วทั้ง 4 กลุ่มทดลองแสดงดังตารางที่ 3.6

เมื่อพิจารณาค่าคุณสมบัติทางความร้อนของตัวอย่างฟลาร์วจากตารางที่ 3.6 พบว่าสภาวะในการเก็บรักษามีผลทำให้คุณสมบัติทางความร้อนของตัวอย่างฟลาร์วข้าวเก่า ข้าวแช่แข็ง และข้าวเร่งแตกต่างจากฟลาร์วข้าวใหม่ โดยช่วงอุณหภูมิในการเจลาติไนซ์ และ ค่าพลังงานในการเกิดเจลาติไนเซชัน ของฟลาร์วข้าวเก่า และข้าวเร่งสูงมีค่าสูงกว่าฟลาร์วข้าวใหม่ การเปลี่ยนแปลงนี้ยังเกิดขึ้นในฟลาร์วจากข้าวพันธุ์ Makmur 77 ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 35 และ 45 องศาเซลเซียส 14 สัปดาห์ (Teo, Karim, Cheah, Norziah and Seow, 2000)

ตารางที่ 3.6 คุณสมบัติทางความร้อนของฟลาร์วและสตาร์ชจากทั้ง 4 กลุ่มตัวอย่างทดลอง

Treatment samples	Transition temperature (°C)			ΔH
	T ₀	T _p	T _c	(J/g dry sample)
Flour				
Fresh	65.21±0.02B,b	71.28±0.22B,b	77.63±0.23B,b	5.96±0.12AB,a
Aged	66.51±0.11D,b	73.48±0.30D,b	79.39±0.38C	7.02±0.03C,a
Frozen	63.88±0.02A,b	69.86±0.11A,b	74.35±2.07A	4.88±0.12A,a
Aged-accelerated	66.03±0.33C,b	72.51±0.41C,b	80.22±0.23D,b	7.94±0.98C,b
Starch				
Fresh	61.71±0.09N,a	68.48±0.08M,a	76.40±0.33N,a	8.87±0.30O,b
Aged	62.39±0.16O,a	70.48±0.01O,a	78.15±0.02O	8.01±0.27N,b
Frozen	61.32±0.33N,a	68.60±0.13M,a	74.84±0.08M	6.64±0.21M,b
Aged-accelerated	58.52±0.16M,a	69.85±0.02N,a	76.51±0.14N,a	6.38±0.24M a

ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่และพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันตามแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) A-D ใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของฟลาร์ว, M-O ใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของสตาร์ช, a-b ใช้เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างฟลาร์วกับสตาร์ช

ทำให้โครงสร้างของสตาร์ชมีความแข็งแรงขึ้น ทั้งนี้ค่าช่วงอุณหภูมิเริ่มการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับค่าการพองตัวของเม็ดสตาร์ชที่ลดลง (ตารางที่ 3.3) แสดงถึงสตาร์ชพองตัวได้ยากขึ้นเมื่อเทียบกับตัวอย่างฟลาร์วข้าวใหม่ (Jaisut, Prachayawarakorn, Varanyanon, Tungtrakul and Soponronnarit, 2008) ซึ่งในส่วนของข้าวเก่าจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่เกาะตัวกันมากขึ้นภายหลังการเก็บ ส่วนที่อยู่ใกล้กับผิวเม็ดสตาร์ชจะขัดขวางการดูดซับน้ำของอะไมโลสและผ่านของความร้อนสู่ชั้นโครงสร้างผลึกในเม็ดสตาร์ช ขณะที่ข้าวเร่งอาจเป็นผลจากการสูญเสียความชื้นในเมล็ดจากการระเหยน้ำด้วยความร้อน ทำให้เม็ดสตาร์ชแข็งแรงขึ้น และสารประกอบเชิงซ้อนของอะไมโลสกับไขมัน (amylose-lipid complex) ที่อาจเกิดขึ้นได้ในกระบวนการเร่งความเก่าของข้าว ซึ่งในระหว่างการให้ความร้อนทำให้อะไมโลสที่พบในธัญพืชมีโอกาสรวมตัวกับกรด-ไขมันอิสระได้ (Lim, Chang and Chung, 2001) ช่วงอุณหภูมิในการเจลาติไนซ์ และ ค่าพลังงานในการเกิดเจลาติไนเซชันของฟลาร์ว จากข้าวแช่แข็งกับมีค่าต่ำกว่าฟลาร์วข้าวใหม่ แสดงให้เห็นว่าเก็บรักษาตัวอย่างข้าวที่อุณหภูมิต่ำก็ยังสามารถเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นได้ และต้องมีความเกี่ยวข้องกับสตาร์ชและโปรตีน โดยใน

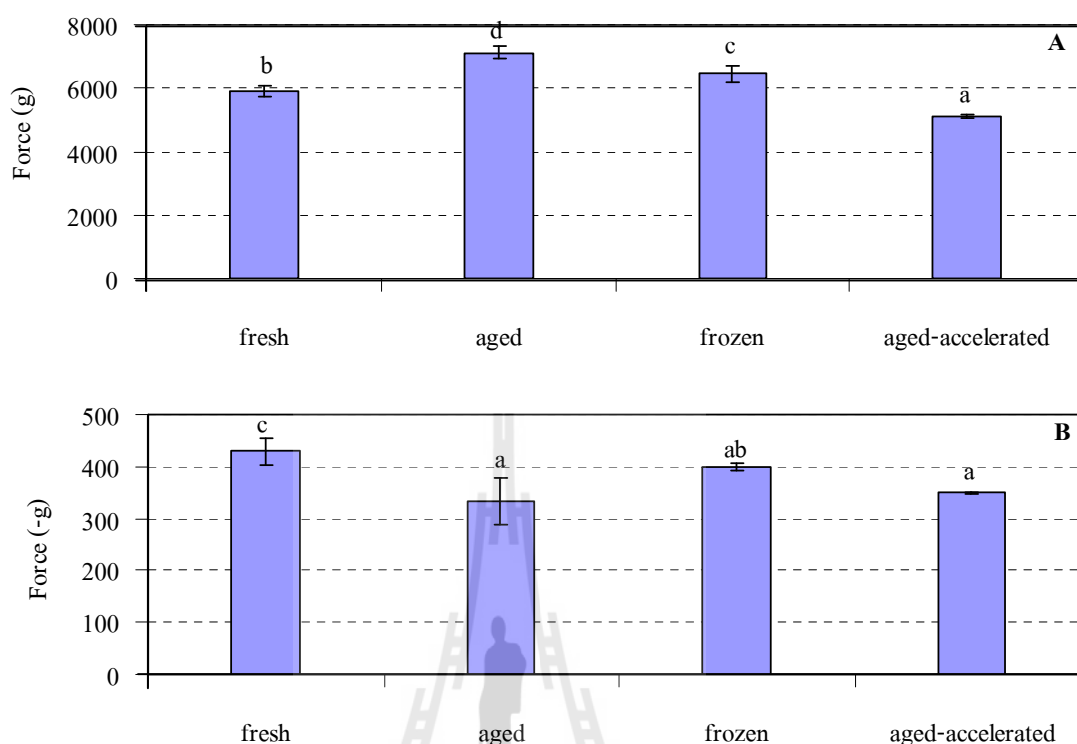
ส่วนของโปรตีนอาจมีการเปิดตัวเพิ่มมากขึ้น หรือผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นเนื่องจากน้ำอิสระในเมล็ดอาจทำลายโครงสร้างสตาร์ชหรือโปรตีนในช่วงระหว่างแช่แข็ง และการละลายของน้ำแข็งเมื่อนำตัวอย่างออกมาจะฉ่ำเพื่อทำการวิเคราะห์ ทำให้ใช้พลังงานต่ำลงในการทำลายโครงสร้างของผลึก

ขณะที่ช่วงอุณหภูมิเริ่มการเปลี่ยนแปลง และอุณหภูมิสูงสุดในการเกิดเจลลิตีเซชันของฟลาร์วสูงกว่าสตาร์ชในทุกตัวอย่าง ($p < 0.05$) โดยเกิดจากในฟลาร์วมีองค์ประกอบอื่น ๆ เช่น น้ำตาล รวมทั้งโปรตีน ซึ่งมีคุณสมบัติในการดูดซับโมเลกุลของน้ำได้ดีกว่าสตาร์ช จึงมีผลชะลอการเกิดเจลลิตีเซชันของเมล็ดสตาร์ชได้ (Chungcharoen and Lund, 1987; Eliason, 1992) แสดงให้เห็นชัดเจนว่าองค์ประกอบอื่นๆ ในฟลาร์ว โดยเฉพาะโปรตีนมีผลอย่างมากต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมทางความหนืด (rheological properties) ของข้าว (Teo et al, 2000) โดยผลที่เกิดขึ้นในตัวอย่างนี้ยังพบได้ในกลุ่มของฟลาร์ว และสตาร์ชที่เตรียมได้จากข้าวพันธุ์ Makmur 77 (Teo et al, 2000) และพันธุ์อาร์เจนตินา ได้แก่ El Paso 144, San Miguel, H-144-7, Palmar, Rico, W4109 และ W4111 (Iturriaga, Lopez and Añon, 2004)

เมื่อพิจารณาค่าพลังงานในการเกิดเจลลิตีในเซชัน ซึ่งแสดงถึงค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมละลายของสายเกลียวคู่ (double helix) ของสตาร์ชขณะเกิดการเกิดเจลลิตีในเซชัน จากตารางที่ 3.6 พบว่าค่าพลังงานในการเกิดเจลลิตีในเซชันฟลาร์วต่ำกว่าสตาร์ช อาจเนื่องมาจากในฟลาร์วมีส่วนของสตาร์ชน้อยกว่าเพราะมีสารประกอบอย่างอื่นรวมอยู่ด้วย เมื่อเทียบสัดส่วนต่อน้ำหนักตัวอย่างในฟลาร์ว จะมีส่วนของสตาร์ชน้อยกว่า ($p < 0.05$) ขณะที่สตาร์ชจะกำจัดสารประกอบอื่น ๆ ออกไปแล้วจึงมีเฉพาะสตาร์ชเท่านั้น ดังนั้นสัดส่วนของค่าพลังงานในการเกิดเจลลิตีในเซชันที่ต้องใช้ในการสตาร์ชจึงมีค่าสูงกว่าในฟลาร์ว

3.4.5 เนื้อสัมผัสข้าวสุก

เนื้อสัมผัสของข้าวเปลี่ยนแปลงภายหลังการเก็บรักษา ($p < 0.05$) จากภาพที่ 3.3A และ B แสดงลักษณะเนื้อสัมผัสของตัวอย่างข้าวสุกในด้านความแข็ง และการเกาะติดกันของเมล็ดข้าวสุกจากทั้ง 4 กลุ่มตัวอย่าง โดยข้าวสุกใหม่จะมีเนื้อสัมผัสที่นุ่มเหนียวเมล็ดข้าวเกาะติดกันดี โดยพิจารณาจากค่าความแข็งที่ต่ำ และค่าความเหนียวเกาะติดกันของเมล็ดข้าวสุกที่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอื่น ($p < 0.05$) ขณะที่ข้าวสุกเก่าจะมีเนื้อสัมผัสที่แข็ง และร่วนเมล็ดข้าวสุกเกาะติดกันไม่ได้ไม่ดี จากค่าความแข็งของเมล็ดข้าวสุกที่สูง และผลค่าการเกาะติดกันของเมล็ดข้าวสุกที่ต่ำ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวใหม่ ลักษณะเนื้อสัมผัสที่แตกต่างกันของข้าวเช่นนี้ เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของสตาร์ช และองค์ประกอบอื่น เช่น ไขมัน โปรตีน นอกจากนี้ยังพบว่าการเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิต่ำเป็นระยะเวลานาน ไม่สามารถรักษาลักษณะเนื้อสัมผัสของข้าวสุกที่เตรียมจากข้าวแช่แข็งให้เหมือนกับข้าวใหม่ได้โดยมีค่าความแข็งที่สูงกว่า และค่าความเหนียวเกาะติดกันของเมล็ดข้าวสุกมีค่าต่ำกว่าข้าวสุกใหม่ โดยข้าวสุกที่เตรียมจากข้าวแช่แข็งจะมีค่าความนุ่ม



ภาพที่ 3.3 คุณลักษณะเนื้อสัมผัสด้านความแข็ง (A) และความเหนียวติดของเมล็ดข้าวสุก (B) ของข้าวสุกจาก 4 กลุ่มตัวอย่างทดลอง

และความเหนียวเกาะกันของเมล็ดข้าวลดลง สอดคล้องกับผลการทดลองของ Chan-Eun, Yun-Sook, Kee-Jai และ Kim Bum-Keun (2012) ที่พบว่าข้าวญี่ปุ่นที่เก็บอุณหภูมิต่ำ คือ 4 และ 20 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูง คือ 30 และ 40 เป็นเวลา 6 เดือน จะมีเนื้อสัมผัสที่แข็งขึ้นในทุกตัวอย่าง อย่างไรก็ตามการเก็บข้าวที่อุณหภูมิต่ำจะมีการเปลี่ยนแปลงของค่าความแข็ง ในอัตราที่ต่ำกว่าการเก็บข้าวที่อุณหภูมิสูง โดยข้าวสุกจะมีความแข็งเพิ่มขึ้นเมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 3 เดือน ในกรณีของข้าวเร่งเก่า มีค่าการเกาะติดกันของเมล็ดข้าวสุกที่ต่ำเหมือนข้าวเก่า และมีค่าความแข็งต่ำ ($p < 0.05$) เป็นลักษณะเนื้อสัมผัสข้าวสุกที่นุ่มแต่ไม่เหนียว เกิดจากการที่ผิวหน้าของเมล็ดข้าวแตกหักจากผลของความร้อนสูงที่ใช้ในการเร่งความเก่าของข้าว แสดงว่าการให้ความร้อนสูงแก่ตัวอย่างข้าวใหม่เพื่อเร่งความเก่าในการทดลองนี้ ไม่สามารถทำให้ข้าวมีลักษณะเนื้อสัมผัสเหมือนกับข้าวเก่าได้ทั้งหมด โดยการลดลงของความแข็งที่เกิดขึ้นในข้าวเร่งนี้อาจเป็นผลจากความร้อนที่ให้กับตัวอย่างทำให้ผิวเมล็ดข้าวเกิดรอยร้าวได้เป็นช่องทางให้ความร้อนและน้ำแพร่ผ่านเข้าไปในโครงสร้างของเมล็ดข้าวได้มาก ทำให้เกิดลักษณะของเจลที่อ่อนนุ่ม

3.5 สรุปผลการทดลอง

ปริมาณความชื้นของข้าวเก่า ข้าวแช่แข็ง และข้าวเร่งเก่า มีค่าน้อยลง เนื่องจากการระเหยออกของน้ำในระหว่างการเก็บที่นานหรือเป็นผลจากการให้ความร้อนในข้าวเร่งเก่า ปริมาณไขมันที่สกัดได้จากข้าวเร่งมีน้อยเมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่น ขณะที่ปริมาณโปรตีนและอะไมโลสไม่เปลี่ยนแปลงทั้ง 4 ตัวอย่าง นอกจากนี้ลักษณะเนื้อสัมผัส คุณสมบัติการเกิดเพสท์ รวมทั้งคุณสมบัติทางความร้อน ของตัวอย่างข้าวทั้ง 3 กลุ่มแตกต่างกันจากข้าวใหม่อย่างชัดเจน ข้าวสุกเก่าจะมีเนื้อสัมผัสที่แข็งและร่วนมากกว่าตัวอย่างอื่น เม็ดสตาร์ชพองและแตกตัวน้อย ต้องใช้อุณหภูมิที่สูงในการเกิดเจลลิตในเซชัน ค่าเนื้อสัมผัสในข้าวที่เก็บแช่แข็ง 1 ปี มีการเปลี่ยนแปลง คือมีความนุ่มและการเกาะติดกันของเม็ดข้าวมีค่าต่ำ การพองตัวของสตาร์ชลดลง ขณะที่อุณหภูมิในการเกิด เจลลิตในเซชันลดลง การใช้อุณหภูมิสูงเร่งความเก่าของข้าวทำให้การเกาะติดกันของเม็ดข้าวสุกมีค่าลดลงได้ แต่ความแข็งไม่เพิ่มขึ้น เม็ดสตาร์ชพองและแตกตัวได้น้อยมาก อุณหภูมิในการเกิดเจลลิตในเซชันจึงสูงเช่นเดียวกับที่พบในข้าวเก่า ผลการตรวจสอบการเกิดเพสท์ของตัวอย่างหลังกำจัดโปรตีนพบว่าข้าวเก่า ข้าวแช่แข็ง และข้าวเร่ง มีค่า PT ที่สูงขึ้น ขณะที่ค่า PV และ BD ต่ำลง โดยภายหลังจากโปรตีนที่ขัดขวางการพองตัวและเจลลิตในเซชันของสตาร์ชถูกกำจัดออกไป ทำให้ค่า PV และ BD เพิ่มขึ้น แต่ค่า SB ลดต่ำลงในบางตัวอย่าง ค่ากำลังการพองตัวของตัวอย่างทั้ง 4 เพิ่มขึ้น ขณะที่ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสตาร์ชทั้ง 4 มีค่าลดลง เช่นเดียวกับอุณหภูมิในการเกิดเจลลิตในเซชันที่วัดด้วยเครื่อง DSC ของสตาร์ชทั้ง 4 ที่มีค่าลดลงเช่นกัน จากผลดังกล่าวมาแล้วนี้แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลง ทางเคมีกายภาพ การเกิดเพสท์ และคุณสมบัติทางความร้อน รวมทั้งเนื้อสัมผัสนี้เป็นผลสะท้อนมาจากโปรตีนที่มีในตัวอย่าง

3.6 รายการอ้างอิง

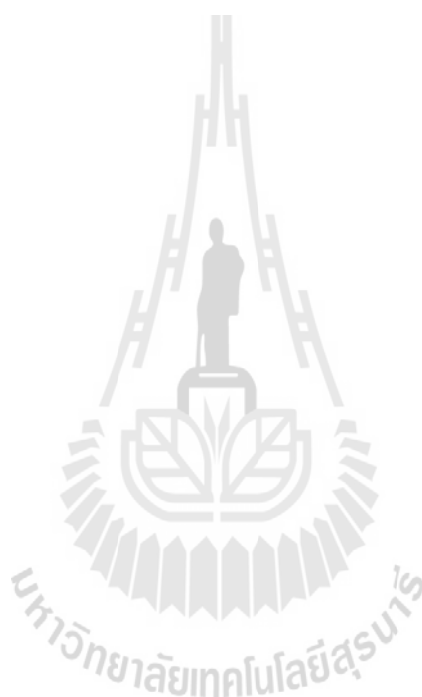
- จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร, เพลงพิน ศิวพรรักษ์ และ ทรงศิลป์ พจน์ชนะชัย. (2547). การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีและเคมีกายภาพของข้าวขาวดอกมะลิสายพันธุ์ 105 ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างกัน. การสารวิจัยและพัฒนา มจร. 27 (กรกฎาคม-กันยายน): 285-297.
- นิตติยา รัตนานนท์, (2545). ปฏิบัติการเกิดสีน้ำตาล ใน **เคมีอาหาร**. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ
- มหาวิทยาลัยมหาสารคาม (2554). การแช่เยือกแข็งอาหาร[ออนไลน์]. ได้จาก: http://cyberclass.msu.ac.th/cyberclass-uploads/libs/document/chapter%208_fcfa.ppt
- Chrstil, J. (1990). Influence of storage on enzymes in rice grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 38: 1198-1202.

- Charstil, J. (1994). Effect of storage on the physicochemical properties and quality factors of rice. In, W.E. Marshall J.I. Wadsworth (eds.). **Rice science and technology** (pp. 49-81). New York: Marcel-Dekker.
- Chung, H.J., Lee, E.J. and Lim, S.T. (2002). **Carbohydrate Polymers** 48: 287-298.
- Chungcharoen, A. and Lund, D.B. (1987). Influence of solutes and water on rice starch gelatinization. **Cereal Chemistry**. 64 (4) : 240.
- Debet, M.R. and Gidley, M.J. (2006). Three classes of starch granule swelling: Influence of surface proteins and lipids. **Carbohydrate Polymers** 64: 452-465.
- Desikachar, H.S.R. and Subrahmanyam, V. (1959). Expansion of new and old rice during cooking. **Cereal Chemistry** 36: 385-391.
- Furukawa, S., Mizuma, T., Kiyokawa, Y., Masumara, T., Tanaka, K. and Wakai, Y. (2001). Distribution of storage proteins in low-glutelin rice seed determined using a fluorescent antibody, **Bioscience and Bioengineering** 96(5) : 476-473.
- Gujar, H.G. and Kumar, V. (2003). Effect of accelerated aging on the physicochemical and textural properties of brown and milled rice. **Food Engineering**. 59: 117-121.
- Hogan, J.T. (1963). Rice research at southern laboratory. **Rice Journal** 66: 38-41.
- Iturriaga, L., Lopez, B. and Añon, M. (2004). Thermal and physicochemical characterization of seven argentine rice flour and starches. **Food Research International** 37: 439-447.
- Jaisut, D., Prachayawarakorn, S., Varayanond, W., Tungtrakul, P. and Soponronnarit. (2008). Effects of drying temperature and tempering time on starch digestibility of brown fragrant rice. **Journal of Food Engineering** 86: 251-258.
- Juliano, B.O. (1985). Criteria and tests for rice grain qualities. **Rice Chemistry and Technology**, American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN, U.S.A.: 443-524.
- Juliano, B.O. (1985). Polysaccharides, proteins, and lipid of rice. **Rice Chemistry and technology**, St. Paul, MN: American Association of cereal Chemists: 59-174.
- Juliano, B.O. (1985). Criteria and tests for rice grain qualities. In B.O. Juliano, (ed.). **Rice Chemistry and Technology** (pp 492-497). St Paul, MN, USA: American Association of Cereal Chemists.
- Juliano, B.O. (1998). Varietal impact on rice quality. **Cereal Food World**. 43:207-222.
- Kim, S.K. and Cho, E.J. (1993). Effects of storage temperature on the physicochemical properties

- of rice milled rice. **Korean Agricultural Chemical Society** 36: 146-153.
- Kohlwey, J.H., Kendall, J.H. and Mohindra, R.B. (1995). Using the physical properties of rice as a guide to formulation. **Cereal Foods World** 40 (10) : 728-732.
- Lim, S.T., Chang, E.H. and Chung, H.J. (2001). Thermal transition characteristics of heat moisture treated corn and potato starches. **Carbohydrate Polymers** 46: 107-115.
- Martin, M., Fitzgerald, M.A. (2002). Proteins in rice grain influence cooking properties. **Cereal Science** 36: 285-294.
- Meullenet, J.F.C., Gross, J., Marks, B.P. and Daniels, M. (1998). Sensory descriptive texture analyses of cooked rice and its correlation to instrumental parameters using an extrusion cell. **Cereal chemistry** 75: 714-720.
- McDonough, C.M., Floyd, C.D., Waniska, R.D. and Rooney, L.W. (2004). Effect of accelerated aging on maize, sorghum and sorghum meal. **Cereal Science** 39: 351-361.
- Olayinka, O. O., Adebawale, K. O. and Olu-Owolabi, B. I. (2008). Effect of heat-moisture treatment on physicochemical properties of white sorghum starch. **Food Hydrocolloids** 22: 225-230.
- Park, C.E, Kim, Y.S., Park, K.J. and Kim, B.K. (2012). Changes in physicochemical characteristics of rice during storage at different temperatures. **Stored Products Research** 48: 25-29.
- Perdon, A.A., Marks, B.P., Siebenmorgen, T.J. and Reid, N.B. (1997). Effects of rough rice storage conditions on the amylograph and cooking properties of medium-grain rice cv. Bengal. **Cereal Chemistry** 74: 864-867.
- Perdon, A.A., Siebenmorgen, T.J., Buescher, R.W. and Gbur, E.E. (1999). Starch retrogradation and texture of cooked milled rice during storage. **Journal of Food Science**. 64: 828-832.
- Sander, J.P.M. (1996). Starch manufacturing in the world. **Advance Post Academic Course on Tapioca Starch Technology**, AIT Center, Bangkok, Thailand, 22-26 January and 19-23 February.
- Sea-Eaw, A., Chompreeda, P., Suwonsichon, T., Prinyawiwatkul, W. and Haruthaithanasan, V. (2007). Effect of storage time of jasmine rice on flour physicochemical properties and consumer acceptance of jasmine rice cakes. **Proceeding of the 9 th Agro-Industrial Conference Food Innovation Asia 2007**. 14-15 June 2007. Bitech Bangkok Thailand

- Shin, M.G., Min, B.K., Kim, D.C. (1991). Changes in quality characteristics of brown rice during storage. **Journal of the Korean Society of Food and Nutrition** 20: 276-280.
- Siebenmorgen, T.J. (1998). Influence of postharvest processing on rice quality. **Cereal Food World**. 43:200-202.
- Singh, N., Kaur, L., Sandhu, K.S., Kaur, J. and Nishinari, K. (2006). Relationships between physicochemical, morphological, thermal, rheological properties of rice starches. **Food Hydrocolloids** 20: 532-542.
- Sirisoontaralak, P. and Noomhorm, A. (2006). Change in physicochemical and sensory-properties of irradiated rice during storage. **Journal of Stored Products Research** 43: 282-289.
- Sirisoontaralak, P. and Noomhorm, A. (2007). Changes in physicochemical and sensory-properties of irradiated rice during storage. **Journal of Stored Products Research** 43: 282-289.
- Sowbhagya, C.M., and Bhattacharya, K.R., (2001). Changes in pasting behavior of rice during ageing. **Cereal Science** 34: 115-124.
- Teo, C.H., Karim, A.A., Cheah, P.B., Norziah, M.H. and Seow, C.C. (2000). On the roles of protein and starch in the aging of non-waxy rice flour. **Food Chemistry** 69: 229-236.
- Tran, T.U., Suzuki, K., Okadome, H., Ikezake, H., Homma, S. and Ohtsubo, K. (2005). Detection of changes in taste of *japonica* and *indica* Storage using physicochemical analyses and a taste sensing system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53: 1108-1118.
- Unnevehr, L.J., Duff, B. and Juliano, B.O. (1992). **Consumer demand for rice grain quality**. International rice research institute, Manila, The Philippines, and International Development Research Center, Ottawa, Canada.
- Villareal, R.M., Resurreccion, A.P., Suzuki, L.B. and Juliano, B.O. (1976). Changes in physicochemical properties of rice during storage. **Starch/Starke** 28: 88-94.
- Wongpornchai, S., Dumri, K., Jongkaewwattana, S. and Siri, B. (2004). Effect of drying methods and storage time on the aroma and milling quality of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Khao Dawk Mali105. **Food Chemistry** 87: 407-414.
- Zhang, G. and Hamaker, B.R. (2003). A three component interaction among starch, protein and free fatty acids revealed by pasting profiles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51: 2797-2800.

- Zhou, Robards, Helliwell and Blanchard (2002). Aging of stored rice: changes in chemical and physical attributes, **Journal of cereal science** 35: 65-78.
- Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S. and Blanchard, C. (2003). Effect of rice storage on pasting properties of rice flour. **Food Research International** 36: 625-634.
- Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S. and Blanchard, C. (2007). Effect of storage temperature on cooking behaviour of rice. **Food Chemistry** 105: 491-497.



บทที่ 4

คุณสมบัติทางเคมีของโปรตีนในข้าวภายหลังการเก็บรักษา

4.1 บทคัดย่อ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีของโปรตีนจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ปี เปรียบเทียบกับข้าวใหม่ พบว่าข้าวเก่ามีปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์น้อย แต่จะเพิ่มขึ้นทั้ง 2 ตัวอย่างเมื่อใช้โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ที่ร้อยละ 1 และ 5 ร่วมกับด่าง โดยความเข้มข้นของสารละลายด่างที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนอยู่ที่ 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับ SDS ร้อยละ 1 จากผลการวิเคราะห์ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) พบว่าแถบโปรตีนขนาดใหญ่ (HWM1 และ HWM2) และโปรกลูทีลินของข้าวเก่าเข้มข้นกว่า และของแถบโปรตีนแอลฟา และเบต้า-กลูทีลินจางกว่าในตัวอย่างข้าวใหม่ เมื่อศึกษาในสภาวะที่มีเบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล (BME) พบว่ารูปแบบและความเข้มของแถบโปรตีนไม่แตกต่างกัน แต่ข้าวเก่ามีค่าปริมาณพื้นที่ผิวไฮโดรโฟบิก และปริมาณหมู่ไดซัลไฟด์ที่มากกว่า ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้มีค่าลดลงในข้าวทั้ง 2 ตัวอย่างภายหลังการให้ความร้อน และการละลายได้ของโปรตีนจากข้าวเก่าสุกมีค่าที่น้อยกว่าข้าวใหม่สุก การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ SDS ร้อยละ 1 เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับสกัดโปรตีนข้าวสุก และเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวสารค่าปริมาณพื้นที่ผิวไฮโดรโฟบิกของข้าวสุกมีค่าสูงกว่า แสดงถึงการเปิดตัวของโปรตีนเพิ่มขึ้นหลังให้ความร้อน ผล SDS-PAGE ของโปรตีนข้าวสุกสกัดด้วยด่าง แสดงรูปแบบแถบโปรตีนต่างจากก่อนให้ความร้อน โดยพบโปรตีนใหม่ขนาด 41 กิโลดาลตัน และโปรตีนข้าวสุกที่สกัดด้วยด่างเดิม SDS ก็พบแถบโปรกลูทีลินที่เข้มข้นกว่าแถบอื่น และเมื่อศึกษาโปรตีนข้าวสุกในสภาวะที่มี BME แสดงให้เห็นว่า โปรกลูทีลินดังกล่าวเกิดจากหน่วยย่อยของแอลฟา และเบต้ากลูทีลิน ที่เชื่อมด้วยพันธะไดซัลไฟด์ สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณหมู่ไดซัลไฟด์ในโปรตีนข้าวสุก

4.2 บทนำ

โปรตีนที่มีอยู่ในธัญพืช ถือเป็นองค์ประกอบที่มีความสำคัญเพราะเป็นแหล่งสารอาหารที่มีคุณภาพสูงสำหรับมนุษย์ และสัตว์กินพืช ดังนั้นทั้งชนิด การกระจายตัว คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน ลักษณะทางกายภาพ ลักษณะโครงสร้างของโปรตีนในเมล็ดธัญพืช จึงเป็นสิ่งที่ควรศึกษาให้เกิด

ความเข้าใจ เนื่องจากโปรตีนเหล่านี้มีผลต่อคุณสมบัติของเมล็ด รวมถึงคุณภาพสุดท้ายของผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากเมล็ดธัญพืชด้วย โปรตีนในเมล็ดธัญพืชแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ storage proteins, structural and metabolic proteins และ protection proteins ปกติแล้วปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในเมล็ดธัญพืชนั้นมีค่าเท่ากับร้อยละ 10-15 ต่อน้ำหนักแห้ง โดยในกลุ่มของ storage protein ถือเป็นโปรตีนหลักเนื่องจากพบในปริมาณมาก และยังมีผลต่อคุณสมบัติสุดท้ายของเมล็ดธัญพืชเมื่อนำมาใช้ประโยชน์ด้วย (Shewry and Halford, 2002a)

โปรตีนข้าว (rice proteins) จัดอยู่ในกลุ่มโปรตีนที่มีคุณภาพสูงเมื่อเปรียบเทียบกับธัญพืชอื่น ๆ เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี ด้วยเหตุผลนี้ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากข้าว หรือมีส่วนผสมของข้าวจึงได้รับความนิยมเป็นอย่างมากเพราะให้ประโยชน์แก่ร่างกายผู้บริโภค (health benefits) เนื่องจากอุดมไปด้วยสารอาหาร (nutritional) และกรดอะมิโนไลซีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีจำกัด (limiting amino acid) ที่มีมากถึง 3.8 กรัมต่อ 16 กรัมในโตรเจน ซึ่งมากกว่าธัญพืชชนิดอื่น ๆ (Juliano, 1985) และยังไม่มีสารที่ทำให้เกิดการแพ้ (hypoallergenic) กับมนุษย์เหมือนกับโปรตีนที่ได้จากกลุ่มเมล็ดถั่ว (Eggum, Cabrera, and Juliano, 1992; Ficochi, Travaini, D'Auria, Banderali, Bernardo and Riva, 2003) โปรตีนในข้าวส่วนใหญ่จะกระจายตัวอยู่ในส่วนของเอ็นโดสเปิร์ม (endosperm) (Agboola, Ng and Milled, 2005; Ju, Hettiarachchy and Rath, 2001; Teo, Karim, Cheah, Norziah and Seow, 2000) โปรตีนในข้าวมีประมาณร้อยละ 7.3 แม้จะมีปริมาณน้อยแต่เป็นโปรตีนส่วนที่ใช้ประโยชน์ได้ (net protein utilization) มากถึงร้อยละ 73.8 มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนในธัญพืชชนิดอื่นๆ (โปรตีนส่วนที่ใช้ประโยชน์ได้ (net protein utilization) มีค่าร้อยละ 10.6 ในข้าวสาลี ร้อยละ 9.8 ในข้าวโพด ร้อยละ 11.0 ในข้าวบาร์เลย์ และ ร้อยละ 11.5 ในข้าวฟ่าง) (Bean and Nishita, 1985) ในปี 1924 Osborne ได้แบ่งชนิดของโปรตีนในเมล็ดพืชรวมถึงข้าว ออกเป็น 4 ชนิด ตามความสามารถในการสกัดและคุณสมบัติการละลาย คือ 1. โปรตีนที่ละลายในน้ำ (อัลบูมิน; albumin) 2. โปรตีนที่ละลายในสารละลายเกลือเจือจาง (โกลบูลิน; globulin) 3. โปรตีนที่ละลายในสารละลายผสมระหว่างน้ำกับแอลกอฮอล์ (โพรลามิน; prolamin) และ 4. โปรตีนที่ละลายในกรดหรือด่างอ่อน (กลูทีลิน; glutelin) ในเมล็ดธัญพืชส่วนใหญ่จะมีโพรลามินเป็น storage protein ซึ่งแตกต่างจากเมล็ดข้าวที่มี กลูทีลินเป็น storage protein (Shewry and Halford, 2002b) โดยมีอยู่ประมาณร้อยละ 80 ของโปรตีนทั้งหมดในเมล็ด (Tecson, Esmama, Lontok and Juliano, 1971; Padhye and Salunkhe, 1979) โดยมีอัลบูมินที่ร้อยละ 1-5 โกลบูลินที่ร้อยละ 4-15 และโพรลามินที่ร้อยละ 2-8 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมดในเมล็ดข้าว (Cagampang, Cruz, Espiritu, Santiago and Juliano, 1966; Houston, Iwasaki, Mohammad and Chen, 1968) กลูทีลินเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ที่ประกอบขึ้นจากโปรตีนหน่วยย่อยขนาดเล็ก โดยส่วนหนึ่งของพอลิเมอร์โปรตีนยังประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดไม่มีขั้ว (hydrophobic) (Wen and Luthe, 1985) หน่วยย่อยขนาดเล็กเหล่านี้เชื่อมต่อกันได้โดยอาศัย

intra และ extra molecular disulfide bonds และแรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interactions) (Utsumi, 1992) ทั้งนี้ Kqczkowski ได้รายงานไว้ในปี 2000 ว่าพันธะไดซัลไฟด์นี้จะเกิดขึ้นในช่วงที่เมล็ดพืชมีการเจริญ โดยการออกซิเดชันของหมู่ซัลไฮไดรล (sulfhydryl groups) ที่ขุดตัวอยู่ในหรือระหว่างสายโปรตีนเอง เกิดเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ขึ้น (highmolecular weight complexes) โดยในปี 2008 Oszvald, Tomoskozi, Larroque, Keresztenyi, Tomas และ Bekes รายงานว่า ขนาดของสายพอร์ลิเมอร์ และขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่แตกต่างกัน มีผลทำให้คุณสมบัติเชิงหน้าที่ในฟลาร์วัวร์แตกต่างกันได้ จากข้อมูลและผลวิจัยของกลุ่มนักวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ปริมาณโปรตีนในข้าวรวมถึงพันธะไดซัลไฟด์ในโครงสร้างโปรตีนมีผลต่อความหนืด และเนื้อสัมผัสของข้าวอย่างชัดเจน โดยปริมาณโปรตีนที่ต่างกันมีผลต่อค่าเนื้อสัมผัสของข้าวสุก โดยข้าวที่มีโปรตีนอยู่น้อยจะให้เนื้อสัมผัสที่นุ่มกว่าข้าวที่มีโปรตีนปริมาณมาก (Lyon, Champagne, Windham, Barton, Webb, McClung, Moldenhauer, Linscombe, McKenzie and Kohlwey, 1999) ขณะที่การเติมเอนไซม์โปรติเอสเพื่อย่อยโปรตีน หรือการเติมไดไทโอไธทอล (DTT) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มรีดิวซิง เพื่อตัดพันธะไดซัลไฟด์ที่ใช้เชื่อมระหว่างโมเลกุลของโปรตีนนั้น มีผลต่อการลดลงของเส้นกราฟความหนืดของฟลาร์วัวร์อย่างชัดเจน (Martin and Fitzgerald, 2002) ทั้งนี้การเติม DTT ยังมีผลต่อการเพิ่มความนุ่มและการเกาะติดกันของเม็ดข้าวสุกข้าวสุกได้ (Derycke, Veraverbeke, Vandeputte, De Man, Hosene, and Delcour, 2005; Hamaker and Griffin, 1990) โดยโปรตีนที่น่าจะมีส่วนสำคัญต่อคุณสมบัติต่าง ๆ ในข้าวก็คือ กลูทีลิน หรือเรียกอีกชื่อว่า ออไรซีนิน (oryzenin) โดย Chrastil (1993) กล่าวว่า มีอนุภาคขนาดเล็ก (small particles) ที่ปกคลุมอยู่ที่ผิวหน้าของข้าวสุกนี้ มีผลต่อลักษณะการเกาะกันข้าวสุกโดยอนุภาคขนาดเล็ก จะประกอบด้วย สององค์ประกอบหลัก คือ สตาร์ชและกลูทีลิน

เมื่อโปรตีนมีผลต่อลักษณะของข้าวแล้ว การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในข้าวก็ย่อมมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติต่าง ๆ ของข้าวด้วยเช่นกัน จากงานวิจัยของ Chrastil ในปี 1994 เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของสตาร์ชและโปรตีน เปรียบเทียบกันระหว่างก่อนและหลังการเก็บรักษา พบว่าขนาดโมเลกุลของสตาร์ช ปริมาณอะไมโลส และค่าการเกาะติดกัน หรือความเหนียวหนึบ (stickiness) ของเจลสตาร์ชข้าวพันธุ์ Lemont ไม่เปลี่ยนแปลงภายหลังการเก็บรักษา ต่างจากความเหนียวของเจลกลูทีลิน และสารผสมระหว่างกลูทีลินกับสตาร์ชที่สกัดจากตัวอย่างข้าวเก่า ที่มีค่าลดลง โดย Chrastil ได้ให้เหตุผลว่าการเปลี่ยนแปลงค่าการเกาะกันที่ลดลงสัมพันธ์กับขนาดโมเลกุลเฉลี่ยของโปรตีน และพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีนกลูทีลินที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Ohno และ Ohisa ในปี 2005 ที่พบว่าระหว่างการเก็บรักษาโปรตีนที่ผิวหน้าของเมล็ดข้าวซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีหมู่ซัลไฮไดรลจะเกิดการออกซิเดชันขึ้น ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลโปรตีน ทำให้โปรตีนขนาดเล็กสามารถเกาะกลุ่ม หรือเชื่อมกันจนมีขนาดใหญ่

เพิ่มขึ้น ทั้งนี้ในโมเลกุล หรือสายพอลิเมอร์ของโปรตีนที่อยู่ในเมล็ดข้าวนั้นประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด ซึ่งสามารถเกิดอันตรกิริยา หรือแรงยึดเกาะอื่น ๆ นอกเหนือจากพันธะไดซัลไฟด์ได้ด้วย และเมื่อโปรตีนมีผลโดยตรงต่อคุณสมบัติของข้าวแล้ว การศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายหลังการเก็บรักษาข้าวย่อมมีประโยชน์ เพื่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจที่ถูกต้อง ถึงการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในด้านต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อคุณภาพของข้าว โดยความรู้พื้นฐานที่ได้ อาจสามารถนำไปสู่วิธีการปรับปรุง หรือป้องกันการเสื่อมคุณภาพของข้าวภายหลังการเก็บได้ ทั้งนี้จากการศึกษารายงานของกลุ่มนักวิจัยที่ผ่านมาแล้วแต่เน้นให้ความสนใจ และมุ่งศึกษาเปรียบเทียบเฉพาะความแตกต่างของตัวอย่างก่อน และหลังการเก็บรักษา ซึ่งเป็นตัวอย่างข้าวสารที่ยังไม่ถูกให้ความร้อนหรือยังไม่ผ่านขั้นตอนการหุงสุก โดยหากพิจารณาตามความเป็นจริงแล้ว คุณลักษณะต่าง ๆ ของข้าว เช่น เนื้อสัมผัสของข้าว คุณสมบัติของเจลที่ได้จากแป้งข้าวล้วนเป็นสิ่งที่เกิดขึ้นหลังให้ความร้อน ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับสตาร์ช ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลัก และโปรตีนด้วย ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่าง ๆ ของโปรตีนในข้าวที่เกิดขึ้นทั้งก่อน และหลังให้ความร้อน ทั้งนี้เพื่อให้สามารถเข้าใจ และสามารถอธิบายถึงการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่มีต่อคุณลักษณะของข้าว และแป้งข้าวได้ชัดเจนขึ้น

4.3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

4.3.1 วัสดุทดลอง

ข้าวเปลือกพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ที่ซื้อจากศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ตั้งอยู่ที่บ้านหนองขอนต.เชิงใน อ.เมือง จ.อุบลราชธานี โดยเป็นตัวอย่างข้าวที่เก็บเกี่ยวใหม่ปี 2551 และตัวอย่างข้าวเปลือกที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ปี

4.3.2 การสกัดโปรตีนในตัวอย่างแป้งข้าว

คัดแปลงจากวิธีการของ Ohno และคณะ (2007) โดยชั่งตัวอย่างแป้งน้ำหนัก 250 มิลลิกรัม ใส่ในหลอด ปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ประกอบด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) เข้มข้นร้อยละ 1 หรือร้อยละ 5 ปริมาตร 5 มิลลิโมลาร์ ผสมให้เข้ากัน ด้วยเครื่องปั่นผสม (ยี่ห้อ IKA โมเดล MS1 ประเทศ สหราชอาณาจักร) สกัดตัวอย่างโดยการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าตัวอย่าง (ยี่ห้อ Heidolph โมเดล UNIMAX1010 ประเทศ เยอรมันนี) ทำการเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 240 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (ยี่ห้อ Thermo Scientific Heraeus Primo R โมเดล 75005441 ประเทศ สหรัฐอเมริกา) ที่ความเร็วรอบ 10,000 xg เป็นเวลา 10 นาที คูดสารละลายส่วนใสเก็บใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวส์

(microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเก็บตัวอย่างโปรตีนสกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนตัวอย่างสารละลายโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายล้างที่มี SDS จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปวิเคราะห์โปรตีนต่อไป (ตัวอย่างที่นำไปวิเคราะห์เก็บไว้ไม่เกิน 24 ชั่วโมง)

4.3.3 การหาสถานะเหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากตัวอย่างข้าวสุก

เมื่อผสมข้าวสุก กับตัวสกัดในข้อ 4.3.2 จะให้ลักษณะสารละลายที่ขุ่นหนืด หากในการสกัดโปรตีนออกมาได้ จึงหาวิธีที่นำมาใช้ในการแก้ปัญหาความหนืดสูงของตัวอย่าง โดยการใช้เอนไซม์อะไมเลส (α -amylase porcine pancrease, EC 3.2.1.1.) ย่อยสายอะไมโลสและอะไมโลเพคติน เพื่อให้ความหนืดลดลง (แสดงไว้ในภาคผนวก ก.) ก่อนจึงสกัดโปรตีนตามวิธีการปกติ โดยข้าวสุกที่ใช้สำหรับการทดลองนี้ เตรียมโดยวิธีเดียวกันกับการเตรียมตัวอย่างเพื่อวัดเนื้อสัมผัสข้าวสุกในบทที่ 3 ข้อ 3.3.9.3 จากนั้นนำข้าวที่หุงสุกที่เตรียมแล้วมาคั่วให้ละเอียดด้วยโกร่งบดตัวอย่าง จากนั้นชั่งตัวอย่างข้าวสุกที่บดแล้ว 800 มิลลิกรัมใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งหลอดใส่ตัวอย่างไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (shaking water bath) ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที (เพื่อให้ตัวอย่างมีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์) จากนั้นเติม เอนไซม์ อะไมเลส เข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อที่ 1) ลงไปและผสมกับตัวอย่างทันที เขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อวินาที ที่เวลาต่าง ๆ กันคือ 1, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบเวลา นำหลอดปั่นเหวี่ยงแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 99 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนในสภาวะที่หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง (ภาคผนวก ก. ข้อที่ 2) พิจารณาเลือกเวลาน้อยที่สุดที่ให้อยู่ยงเจี้ยนได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงซึ่งที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างต่อไป

4.3.4 การสกัดโปรตีนจากตัวอย่างเจลข้าวสุก

จากผลการหาเวลาที่เหมาะสม ในการย่อยเจลตัวอย่างข้าวสุก ด้วยเอนไซม์อะไมเลส ตามข้อ 4.3.3 จะได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการย่อยตัวอย่างเจลแป้งข้าวสุก ด้วยเอนไซม์อะไมเลสเข้มข้นร้อยละ 0.04 ย่อยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงทำการสกัดโปรตีนข้าวสุก โดยใช้ปริมาณของตัวอย่าง และสารละลายตามตารางที่ 4.1 จากนั้นสกัดโปรตีนโดยเติมตัวสกัด ตามตารางที่ 4.2 จากนั้นนำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสเก็บใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไปโดยตัวอย่างที่มีการเติม SDS จะเก็บที่อุณหภูมิห้อง ส่วนตัวอย่างที่ไม่เติม SDS เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.1 การเติมเอนไซม์ในตัวอย่างข้าวสุก

Treatment samples	Cooked rice paste (mg)	Distilled water (ml)	Amylase (ml)	Digestion time (h)
Cooked rice paste + amylase + NaOH	800	3	1	1
Cooked rice paste + amylase + NaOH + 1%SDS	800	3	1	1
Cooked rice paste + amylase + NaOH + 5%SDS	800	2	1	1

ตารางที่ 4.2 การเติมสารละลายสำหรับสกัดโปรตีนในตัวอย่างสารละลายข้าวสุก

Treatment samples	1 M NaOH (μ l)	20% SDS (ml)	H ₂ O (ml)	Extraction time (h)
Cooked rice + amylase + NaOH	50	-	0.950	4
Cooked rice + amylase + NaOH + 1%SDS	50	0.25	0.700	4
Cooked rice + amylase + NaOH + 5%SDS	50	1.25	0.700	4

4.3.5 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ตามวิธีการของ Laemmli (1970) นำตัวอย่างสารสกัดโปรตีนที่ทราบความเข้มข้นแล้วจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีลาร์วีรี (lowry) (ภาคผนวก ก. ข้อที่ 3) นำมาผสมทรีตเมนต์บัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วยทริส-ไฮโดรคลอริก (Tris-HCl) เข้มข้น 0.125 โมลาร์ (พีเอช 6.8) ที่มี SDS เข้มข้นร้อยละ 4 และกลีเซอรอล (glycerol) เข้มข้นร้อยละ 20 ในอัตราส่วนโปรตีนสกัดต่อบัฟเฟอร์ เท่ากับ 1 ต่อ 1 (กรณีของทรีตเมนต์บัฟเฟอร์ที่ผสมกับโปรตีนมีการเติมบีต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล (BME) เข้มข้นร้อยละ 10 จะต้องนำตัวอย่างไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 นาที เช่นเดียวกับโปรตีนมาตรฐานก่อนนำไปโหลด) โดยปริมาณของสารสกัดโปรตีนใช้โหลดเท่ากับ 25 ไมโครกรัม โหลดโปรตีน

สัปดาห์ที่ผสมกับทรินเมตบัพเฟอร์แล้วที่ด้านบนของแผ่นเจล ใช้ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์เจลรันนิ่ง (running gel) ที่ใช้ มีค่าเท่ากับร้อยละ 12.5, 15, 10 หรือ 7.5 และเจลสแตคกิ้ง (stacking gel) มีค่าเท่ากับร้อยละ 4 โดยให้กระแสไฟที่ความต่างศักย์เท่ากับ 120 โวลต์ ย้อมสีตัวอย่างด้วยสารละลายควยสี ย้อม Comassie blue R-250 และล้างสีย้อมด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 และกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 และใช้ standard protein marker สำหรับเปรียบเทียบขนาด โมเลกุล โปรตีน (molecular weight)

4.3.6 การวิเคราะห์ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของโปรตีน (Surface hydrophobicity)

ดัดแปลงจากวิธีการของ Paraman, Hettiarachchy, Schaefer และ Beck (2007) และวิธีของ Kato and Nakai (1980) โดยสกัดโปรตีนฟลาวรรูจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 และโดยชั่งตัวอย่างฟลาวรรู 1000 มิลลิกรัมผสมกับสารที่ใช้สกัดโปรตีนซึ่ง ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปแช่ที่ 4 ชั่วโมง ที่ความเร็ว 240 รอบ ต่อ นาที แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายสารละลายส่วนใสใส่หลอดปั่นเหวี่ยงอันใหม่ ดูดสารละลาย โปรตีนที่สกัดได้ใส่หลอดทดลองขนาดเล็กให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 และ 0.3 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเติมสารละลายคาร์บอนेट โบคาร์บอนเนตบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 10) ปริมาตร 2.0, 1.9, 1.85, 1.80, 1.75 และ 1.70 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการเติมสารละลาย 1-anilino-8-naphthene sulfonate (ANS) เข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 7.0) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในทุกหลอด ผสมให้เข้ากันภายในเวลา 5 วินาที ตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการเรืองแสงของตัวอย่างด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ (RF-1501, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) โดยกำหนดให้ค่า excitation เท่ากับ 390 นาโนเมตร และค่า emission เท่ากับ 470 นาโนเมตร เลือกวัดค่าตัวอย่างสารละลายในโหมดโลเซนซิวิตี (low sensitivity) โดยกำหนดความกว้างของสลิต (slit) อยู่ที่ 10 มิลลิเมตร การรายงานค่า surface hydrophobicity (S_0) ของตัวอย่าง ได้จากค่าความชัน (ε) ของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มของการเรืองแสง (fluorescence intensity) (แกน y) ที่วัดได้ กับความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (แกน x) (ที่ทราบได้โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี lowry) จากสมการ

$$A = \varepsilon bc$$

เมื่อ A คือ ค่าความเข้มของการเรืองแสง (fluorescence intensity; FI)

b คือ path length มีค่าเท่ากับ 1

c คือ ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน
โดยในกรณีตัวอย่างที่เป็นฟลาร์ว

$$\text{Fluorescence Intensity (Net_FI)} = FI_{\text{sample}} - FI_{\text{blank1}}$$

ในกรณีตัวอย่างที่เป็นฟลาร์วขาวสุก

$$\text{Fluorescence Intensity (Net_FI)} = FI_{\text{sample}} - F_{\text{blank1}} - FI_{\text{blank2}}$$

เมื่อ FI_{sample} คือ ค่าการเรืองแสงที่วัดได้จากตัวอย่างที่เติม ANS

FI_{blank1} คือค่าการเรืองแสงของสารละลายที่มีตัวอย่าง (blank 1)

FI_{blank2} คือ ค่าการเรืองแสงของตัวอย่างที่ไม่เติม ANS (blank 2)

4.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล (Total SH) และ พันธะไดซัลไฟด์ (SS)

4.3.7.1. การวิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลไฮดริลทั้งหมด (Total SH)

ปริมาณ Total SH วิเคราะห์ได้โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่าง Ellman's reagent (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) หรือ DTNB) กับกลุ่มไทโธล (thiol group; SH) ของโปรตีน ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Mine (1997) โดยนำตัวอย่างโปรตีนสกัด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยทริส-ไฮโดรคลอริก (Tris-HCl) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 8.0 ที่มีเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก (ethylenediaminetetracetic acid; EDTA) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ ยูเรีย เข้มข้น 8 โมลาร์ (0.5 M Tris-HCl, 10 M EDTA, 8 M urea; pH 8) ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร เปิดสารละลายตัวอย่างที่ผสมบัฟเฟอร์แล้วปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก เติมสารละลาย DTNB เข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร (DTNB เข้มข้นร้อยละ 0.1 ใน โซเดียมไดเฟสเฟด(NaH_2PO_4) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์) นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 นาที เตรียมตัวอย่าง blank โดยใช้น้ำกลั่น ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ 4.5 มิลลิลิตร แทนสารละลายโปรตีนสกัด ดูดสารละลายผสมของ blank ที่เตรียมได้ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DTNB เข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี วิสซิเบล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer) โดยทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ปริมาณ total SH กำหนดได้โดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (extinction coefficient) เท่ากับ $13600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ คำนวณจากสมการ

$$\mu\text{mol SH/g} = 73.53A_{412} \text{ (D/C)}$$

เมื่อ A_{412} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 นาโนเมตร

C คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างในหน่วย มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

D คือ dilution factor ซึ่งเท่ากับ 10

4.3.7.2. การวิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล และหมู่ไดซัลไฟด์ (Total SH + SS)

การวัดปริมาณของ Total SH+SS ตามวิธีการของ Thannhauser และคณะ (1984) โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของ 2-ไนโตร-5-ไธโอซัลโฟเบนโซเอต (2-nitro-5-thiosulfobenzoate ; NTSB) กับสารละลายโปรตีน ในสภาวะที่มีหมู่ซัลไฟด์ (SO_3^-) โดยนำสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (ที่ทราบความเข้มข้นโดยวิธี lowry) ผสมกับสารละลายทริสไฮโดรคลอริก บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 4.5 มิลลิเมตร (พีเอช 9.5) ที่ประกอบด้วย ยูเรียเข้มข้น 8 โมลาร์ EDTA เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ โซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (8 M Urea 10 mM EDTA 100 mM Na_2SO_3 pH 9.5) ผสมสารละลายผสมปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติม NTSB ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 นาที เตรียมตัวอย่าง blank โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 500 ไมโครลิตรแทนโปรตีนสกัด วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 นาโนเมตร ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ คำนวณค่า Total SH + SS ด้วยวิธีการในข้อ 4.3.7 ข้อย่อยที่ 1 ส่วนพันธะไดซัลไฟด์ คำนวณโดยนำค่า Total SH ไปหักลบจากค่า Total SH + SS

4.3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design: CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ (Analysis of Variance: ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 14.0

4.4 ผลการทดลองและการวิจารณ์

4.4.1 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้จากฟลาร์ว

ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากฟลาร์ว 2 ชนิด คือ ฟลาร์วข้าวใหม่ (FRP) และ ฟลาร์วข้าวเก่า (ARP) ในสารละลายต่างที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ร้อยละ 0.04) ซึ่งเป็นระดับที่ต่ำและไม่ทำให้โครงสร้างของสตาร์ชมีการเปลี่ยนแปลงตามการรายงานของ Cardoso, Putaux, Samois และ

Silveira ในปี 2007 ที่ว่าการใช้สารละลายต่างที่เข้มข้นต่ำกว่า ร้อยละ 0.24 ในการสกัดโปรตีนไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงและการจัดเรียงโครงสร้างภายในโมเลกุลของสตาร์ชจากตารางที่ 4.3 พบว่าโปรตีนในข้าวเก่าละลายออกมาในปริมาณที่ต่ำกว่าข้าวใหม่ ($p < 0.05$) โดยปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากข้าวเก่าเท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง

ตารางที่ 4.3 ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากฟลาร์วีข้าวขาวดอกมะลิ 105 ใหม่ และเก่า

Extract solution	Alkaline extractable protein (mg/g sample)	
	FRP	ARP
10 mM NaOH	66±2.4Ab	30±2.6Aa
10 mM NaOH + 1% SDS	86±3.8Bb	69±6.1Ca
10 mM NaOH + 5% SDS	81±2.0Bb	54±6.1Ba

ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันตามแนวนอน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

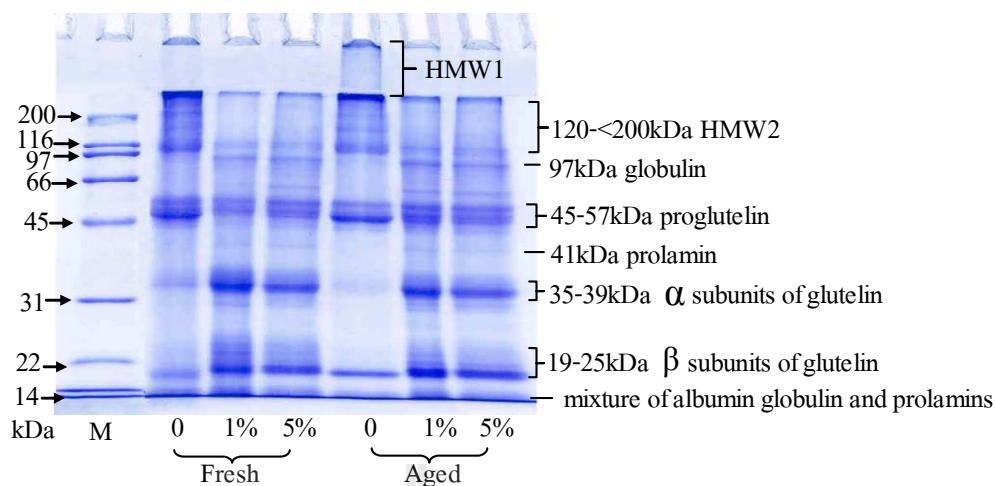
โปรตีนสกัดจาก ฟลาร์วีข้าวใหม่; FRP, โปรตีนสกัดจากฟลาร์วีข้าวเก่า; ARP

ขณะที่ตัวอย่างข้าวใหม่สกัดโปรตีนได้เท่ากับ 66 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง สอดคล้องกับผลการทดลองของ Likitwattanasade และ Hongprabhas ในปี 2010 ที่พบว่าปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากข้าวเก่าที่ผ่านการเร่งที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วันมีค่าลดลง ซึ่งน่าจะเกิดจากอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีน หรือระหว่างโปรตีนและสตาร์ชในเมล็ดข้าว โปรตีนจะสูญเสียสภาพธรรมชาติและเปิดตัวเพิ่มขึ้นอันเป็นผลจากเปลี่ยนแปลงทางเทอร์โมไดนามิกของในโปรตีนเอง ที่เกิดขึ้นภายหลังการเก็บโปรตีนดังกล่าวจะเกาะตัวกันเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ (high molecular weight proteins) เพิ่มขึ้น จาก inter และ intra molecular disulfide bonds รวมทั้ง hydrophobic interaction ของกลูทีลินเองที่เพิ่มขึ้น มีผลทำให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนมีค่าลดลง (Tecson, Esmama, Lontok, และ Juliano, 1970) ส่วนการใช้ SDS เข้มข้นร้อยละ 1 และ 5 มีผลทำให้โปรตีนละลายออกมาเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) ทั้งในข้าวเก่าและใหม่ เพราะ SDS มีผลทำลายแรงไฮโดรโฟบิกของโปรตีน โดยเกิดการจับกันระหว่างส่วนหัวที่เป็นหมู่โคเดซิล ของ SDS กับกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิกของโปรตีน แล้วหันกลุ่มซัลเฟตที่มีประจุลบออกมาด้านนอกเกิดลักษณะของไมเซลล์ที่จับกับน้ำได้ดีมีผลทำให้โปรตีนละลายออกมาเพิ่มขึ้นได้ในทุกตัวอย่าง ดังนั้น ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นจึงน่าจะเป็นผลร่วมกันระหว่างสารสองชนิด คือ ด่าง และ SDS ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Juliano และ Boulter ในปี 1976 ที่รายงานว่า การสกัดโปรตีน

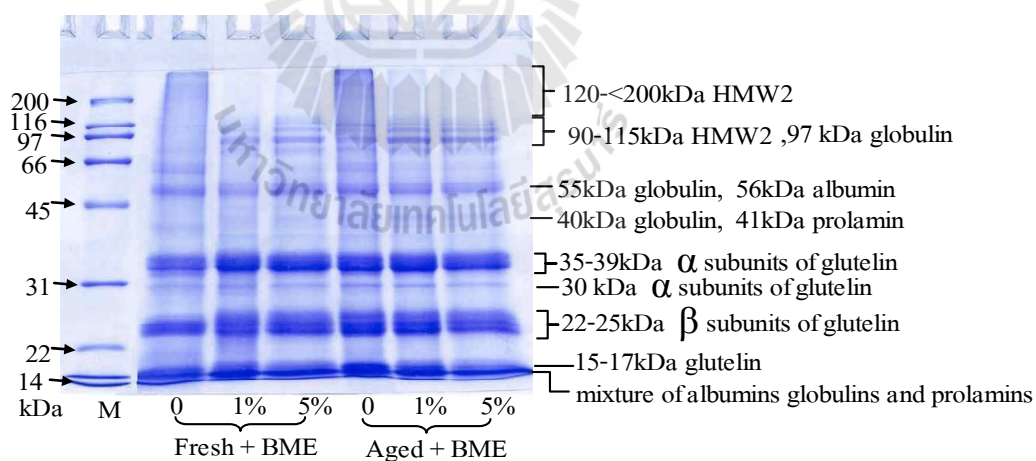
โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ประกอบด้วย SDS ร้อยละ 0.5 และ BME เข้มข้นร้อยละ 0.6 ทำให้ปริมาณโปรตีนที่สกัดออกมาได้มีค่าสูงถึงร้อยละ 94-98 นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงผลการใช้เอนไซม์โปรตีนเอส สำหรับใช้ในการสกัดโปรตีนทำให้ผลการสกัดโปรตีนในฟลาร์วข้าวนั้นมีปริมาณเพิ่มขึ้นได้เช่นกัน เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงในการย่อยโปรตีน ทำให้โปรตีนที่อยู่ในส่วนของฟลาร์วละลายออกมามากขึ้น โดยข้อดีของการใช้เอนไซม์ คือ ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเม็คสตา์ชเลย์ (Lugay and Juliano, 1965) แม้การใช้ SDS ในการสกัดจะเพิ่มปริมาณโปรตีนได้ก็ตาม แต่โปรตีนที่ละลายได้ในข้าวเก่าก็ยังคงมีน้อยกว่าโปรตีนข้าวใหม่อยู่ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากส่วนของโปรตีนซึ่งมีอยู่ในโครงสร้างของเมล็ดข้าวในส่วนของเอ็นโดสเปิร์ม และเกาะเชื่อมอยู่กับผิวด้านนอกของเม็คสตา์ช อย่างหนาแน่น จึงยากที่จะสกัดต่อการสกัดออกมา (Tanaka, Sugimoto, Ogawa and Kasai, 1980) ทั้งนี้การสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ร่วมกับ SDS เข้มข้น ร้อยละ 1 สามารถเพิ่มการละลายของโปรตีนได้ทั้ง 2 ตัวอย่าง ($p < 0.05$) จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนข้าวสาร เมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่มี SDS หรือ ใช้ SDS ร้อยละ 5

4.4.2 ขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE)

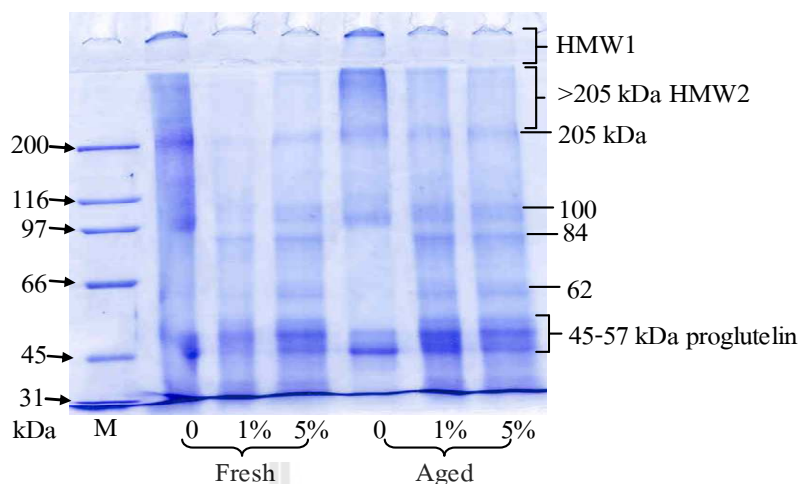
จากผลการศึกษาขนาดของโปรตีนที่สกัดได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เปรียบเทียบก่อนและหลังการเก็บรักษาในสภาวะที่ไม่มีการเติมเบต้า-เมอร์แคปโทเอทานอล ด้วย SDS-PAGE แสดงดังภาพที่ 4.1 พบว่าโปรตีนที่สกัดได้ในฟลาร์วข้าวหอมมะลิ 105 ประกอบด้วยโปรตีนขนาดโมเลกุลต่าง ๆ กัน ตั้งแต่เล็กไปใหญ่ คือ 19-25, 35-39, 41, 45-57, กลุ่มที่มีเล็กกว่า 14.4 กิโลดาลตัน (ปรากฏอยู่ด้านล่างแผ่นเจล) และ กลุ่มโมเลกุลขนาดใหญ่ (HMW2) ที่บริเวณเจลรันนิ่งตั้งแต่ 120 ถึง <200 กิโลดาลตัน และ โปรตีนขนาดใหญ่บริเวณเจลสแตกกิ้ง (HMW1) จากผลการวิจัยก่อนหน้านี้ของ Juliano และ Boulter (1976) และ Takeda, Namba และ Nunokawa (1970) พบโปรตีนกลูทีลินในข้าวมีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 100 ไปจนถึงมากกว่า 1,000 กิโลดาลตัน Sugimoto, Kunisuke และ Kasai (1991) ซึ่งศึกษาพบว่า โปรตีนกลูทีลินในข้าวพันธุ์ Koshihikari จะประกอบด้วย 3 กลุ่มหลัก ๆ มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 64, 130 กิโลดาลตัน และมากกว่า 130 กิโลดาลตันขึ้นไป ในปี 2006 Paraman, Hettiarachchy, Schaefer, และ Beck รายงานว่าพบแถบโปรตีน 6 แถบหลัก ที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 70-97 กิโลดาลตัน คือ 97, 45, 33, 21, 14 และ 7 ตามลำดับ โดยโปรตีนขนาด 33 กิโลดาลตันเป็นแถบโปรตีนที่มีความเข้ม (intensity) สูงสุด แสดงว่านอกจากปริมาณ storage proteins ในข้าวแต่ละพันธุ์จะมีความแตกต่างกันแล้ว (Yang, Shem, Huang, He and Wu, 2005; Kusama, Yangi and Iwamoto, 1984; Zhan and Lin, 1991) รูปแบบโปรตีนในข้าวหอมมะลิ 105 ที่วิเคราะห์ได้นี้ มีทั้งขนาดใกล้เคียง และแตกต่างจากข้าวพันธุ์อื่น ๆ ด้วย โดยมีกลูทีลินเป็นแถบหลัก 3 แถบ คือ เบต้า-กลูทีลิน,



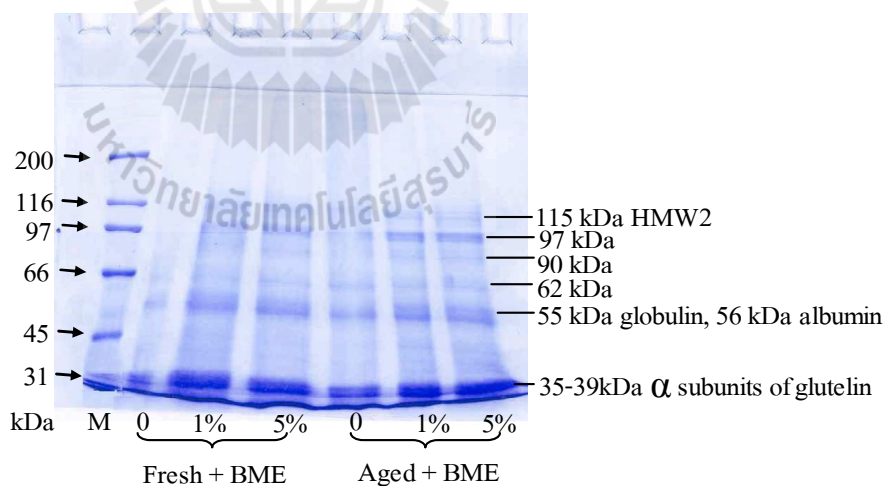
ภาพที่ 4.1 ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ใหม่ (Fresh) และเก่า (Aged) สกัดด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ประกอบด้วยสารละลาย SDS เข้มข้นร้อยละ 0, 1 และ 5 ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่ไม่มีเบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล (BME) และปริมาณอะคริลาไมด์ร้อยละ 12.5 โดยแถบ M (lane M) แสดงโปรตีนมาตรฐาน



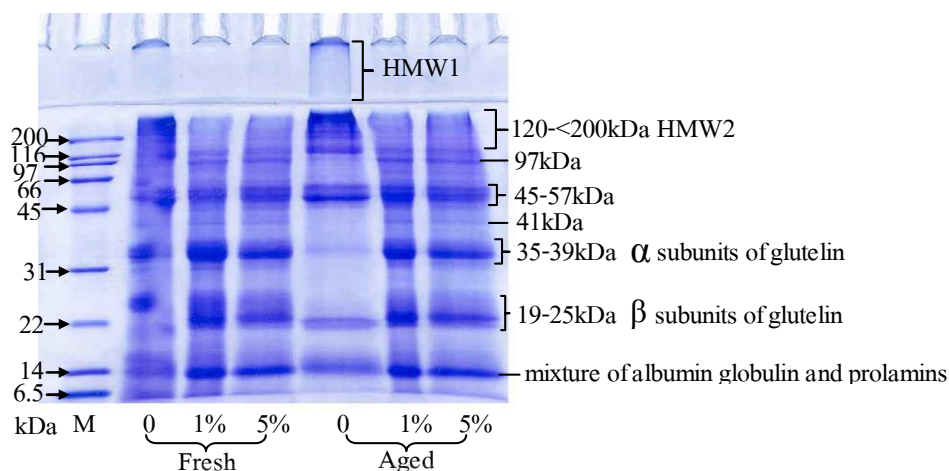
ภาพที่ 4.2 ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ใหม่ (Fresh) และเก่า (Aged) สกัดด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ประกอบด้วยสารละลาย SDS เข้มข้นร้อยละ 0, 1 และ 5 ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่มีเบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล (BME) และปริมาณอะคริลาไมด์ร้อยละ 12.5 โดยแถบ M (lane M) แสดงโปรตีนมาตรฐาน



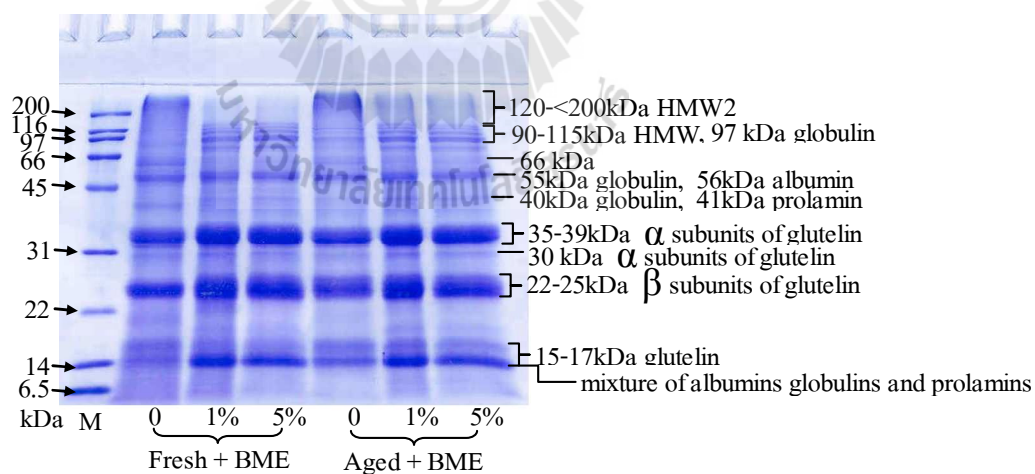
ภาพที่ 4.3 ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ใหม่ (Fresh) และเก่า (Aged) สกัดด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ที่ประกอบด้วยสารละลาย SDS เข้มข้น ร้อยละ 0, 1 และ 5 ตามลำดับ ภายใต้สภาวะไม่มีเบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล (BME) และปริมาณอะคริลาไมด์ร้อยละ 7.5 โดยแถบ M (lane M) แสดงโปรตีนมาตรฐาน



ภาพที่ 4.4 ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ใหม่ (Fresh) และเก่า (Aged) สกัดด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ประกอบด้วยสารละลาย SDS เข้มข้น ร้อยละ 0, 1 และ 5 ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่มีเบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล (BME) และปริมาณอะคริลาไมด์ ร้อยละ 7.5 โดยแถบ M (lane M) แสดงโปรตีนมาตรฐาน



ภาพที่ 4.5 ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ใหม่ (Fresh) และเก่า (Aged) สกัดด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ประกอบด้วยสารละลาย SDS เข้มข้น ร้อยละ 0, 1 และ 5 ตามลำดับ ภายใต้สภาวะไม่มีเบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล (BME) และปริมาณอะคริลาไมด์ร้อยละ 15 โดย แถบ M (lane M) แสดงโปรตีนมาตรฐาน



ภาพที่ 4.6 ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ใหม่ (Fresh) และเก่า (Aged) สกัดด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ประกอบด้วยสารละลาย SDS เข้มข้น ร้อยละ 0, 1 และ 5 ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่มีเบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล (BME) และปริมาณอะคริลาไมด์ร้อยละ 15 โดย แถบ M (lane M) แสดงโปรตีนมาตรฐาน

แอลฟา-กลูทีลิน และโปรกลูทีลิน (proglutelin) ที่เกิดจากการรวมกลุ่มกันของหน่วยย่อยทั้งสอง มีขนาดเท่ากับ 57 กิโลดาลตัน ขณะที่โปรตีนอีก 3 ชนิดได้แก่ โกลบูลิน โปรลามิน และอัลบูมิน ซึ่งมีอยู่ในข้าวจะพบได้เช่นกันแต่มีปริมาณที่น้อย โดยหน่วยย่อยเบต้า-กลูทีลิน แอลฟา-กลูทีลิน และ โปรกลูทีลินที่พบในการทดลองนี้ จะมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 19-25, 35-39 และ 45-57 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ใกล้เคียงกับการรายงานของ Yamagata และ Tanaka (1982) ที่ว่าในโปรตีนกลูทีลินที่สกัดด้วยด่างนั้น จะประกอบไปด้วย 2 กลุ่มหลัก คือ หน่วยย่อยที่เป็นกรด (acidic subunits) มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 37-39 กิโลดาลตัน หน่วยย่อยเบส (basic subunits) มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 22-23 กิโลดาลตัน

นอกจากนี้ขนาดโมเลกุลของโปรตีนยังมีการเปลี่ยนแปลงไป ภายหลังจากเก็บรักษาข้าวเป็นเวลา 1 ปี ดังแสดงในภาพที่ 4.1 ความเข้มของแถบโปรตีนจากข้าวเก่า (aged0) ต่างจากโปรตีนข้าวใหม่ (fresh0) ที่สกัดด้วยสารละลายด่างไม่เติม SDS แถบโปรตีนขนาดใหญ่ในข้าวเก่ามีความเข้มมากกว่า บ่งชี้ได้ว่าภายหลังการเก็บข้าวโปรตีนขนาดเล็ก มีการรวมกลุ่มกันเป็นโปรตีนใหญ่เพิ่มขึ้น ผลที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chrastil และ Zarins (1992) รายงานว่า โปรตีนกลูทีลินขนาดเล็ก (low molecular weight peptide subunit) ที่สกัดจากข้าวเก่ามีปริมาณลดลง ในขณะที่กลุ่มโมเลกุลใหญ่ (high molecular weight) มีปริมาณเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับผลจากรายงานการวิจัยของ Ohno, Tomatsu, Toeda และ Ohisa (2007) ที่พบการลดลงของกลุ่มโปรตีนขนาดเล็ก (21 และ 32 กิโลดาลตัน) และมีค่าเพิ่มขึ้นของโปรตีนขนาดใหญ่ (48, 99 และ 170 กิโลดาลตัน) ในข้าวเก่าพันธุ์อากิตะโคมาจิ (Akitakomachi) ซึ่งจากผลของ SDS-PAGE (ภาพที่ 4.1) สามารถอธิบายได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาข้าวเช่นกัน โดยโปรตีนขนาดเล็กสามารถเกาะกลุ่ม (aggregate) หรือเชื่อมต่อกันระหว่างโมเลกุลของโปรตีนมากขึ้น ซึ่งทำให้เกิดกลุ่มโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่เพิ่มมากขึ้น และจากผลของปริมาณโปรตีนจากฟลาร์วข้าวเก่าที่สกัดด้วยสารละลายด่างเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ที่มีค่าน้อย เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนที่ได้จากฟลาร์วข้าวใหม่ (ตารางที่ 4.3) แสดงให้เห็นว่าในข้าวเก่ายังมีโปรตีนบางส่วนที่ยังติดค้างอยู่กับส่วนของเมล็ดสตาร์ช ซึ่งอาจอยู่ได้ทั้งบริเวณผิวหรือภายในเมล็ดสตาร์ช โดยที่ยังรวมอยู่ในส่วนของตะกอนแป้งไม่หลุดออกมาในขั้นตอนการปั่นเหวี่ยงแยกโปรตีน ซึ่งอาจจะน่าจะเป็นโปรตีนที่มีการเชื่อมหรือเกาะเกี่ยวอย่างแน่นหนาอยู่ที่บริเวณพื้นผิวหรือสายโพลีเมอร์ของสตาร์ช ซึ่งข้อสันนิษฐานนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Cagampang, Cruz, and Espiritu (1996), Mitsuda, Yasumoto, Murakami, Kusano and Kishida (1967), Del Rosario, Briones, Vidal and Juliano (1968) และ Juliano and Boulter (1976) ที่ว่าโปรตีนอัลบูมิน และโกลบูลิน ซึ่งกระจายตัวอยู่บริเวณชั้นแอรูโรน (aleurone layer) จะถูกกำจัดออกไปได้ในขั้นตอนการขัดสีข้าว ขณะที่โปรตีนกลูทีลิน ซึ่งมีรูปร่างกลมขนาดต่าง ๆ ซึ่งกระจายอยู่ทั่วไปภายในส่วนของเอนโดสเปิร์ม โดยจะอยู่ในรูปของ protein bodies ซึ่งมีส่วนหนึ่งเชื่อมกับเมล็ดสตาร์ชอย่างแข็งแรงและแน่นหนา (Beechtel and Pomeranz, 1978; Tanaka,

Resurreccion, Juliano and Bechtel, 1978) จึงไม่สามารถที่จะสกัดออกให้หมดด้วยสารละลายต่าง จากผลการสกัดโปรตีนด้วยสารละลายต่างที่มี SDS อยู่ ร้อยละ 1 หรือ 5 พบว่าปริมาณของโปรตีน ที่สกัดได้ในตัวอย่างทั้ง 2 มีค่าเพิ่มขึ้นได้ ดังตารางที่ 4.3 นอกจากคุณสมบัติของ SDS ที่เพิ่มการ ละลายของโปรตีน (Maningat and Juliano, 1979) แล้ว การใช้ SDS ยังส่งผลให้ลักษณะของแถบ โปรตีนเปลี่ยนแปลงไปจากสภาวะที่ไม่ใช้ SDS (ภาพที่ 4.1) โดยจะไม่ปรากฏโปรตีนกลุ่ม HMW ที่ บริเวณเจลสแตกกิ่งจากทั้งข้าวเก่าและใหม่ ขณะที่ความเข้มของแถบโปรตีนขนาดใหญ่ 120-200 กิโลดาลตัน และโปรตีนขนาด 45-57 กิโลดาลตัน จางลง และพบแถบโปรตีนจากหน่วยย่อยเบต้า และแอลฟา กลูทีลินที่เพิ่มขึ้น (19-25 กิโลดาลตัน และ 35-39 กิโลดาลตัน) ตามลำดับ

โดยขนาดโมเลกุลโปรตีนที่เล็กลง อาจเกิดจากปริมาณ SDS ในตัวอย่างซึ่งใช้สกัดตัวอย่าง รวมกับที่ SDS ในทรีตเมนต์บัฟเฟอร์ที่ใช้ผสมกับโปรตีนก่อนจะโหลดโปรตีนที่มีความเข้มข้นถึง ร้อยละ 10 โดย SDS ที่เข้มข้นมากจะทำให้โปรตีนเสียสภาพโดยแตกตัวเป็น โมเลกุลที่มีขนาดเล็กลง เนื่องจากพันธะไฮโดรโฟบิกถูกทำลาย ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Gururaj และ Narasinga (1983) ที่พบว่า การเพิ่มระดับความเข้มข้นของ SDS มากกว่า 3.7 มิลลิโมลาร์ ทำให้ขนาดโมเลกุล โปรตีนจากที่พบในเมล็ดมัสตาร์ด (mustard) และเมล็ดแคนโนล่า (canola or rape seed) มีขนาดเล็กลง โดยยังเพิ่มความเข้มข้นของ SDS ขนาดโปรตีนก็จะเล็กลง

ผลของการสกัดโปรตีนด้วย SDS ทำให้สามารถอธิบายได้ว่าโปรตีนในกลุ่ม HMW1 และ HMW2 ส่วนใหญ่ และกลุ่มโปรกลูทีลินบางส่วนที่พบในข้าวทั้งก่อนและหลังการเก็บรักษานั้น ส่วนหนึ่งเกิดจากการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนในกลุ่มเบต้า และแอลฟา-กลูทีลิน ด้วยแรงไฮโดรโฟบิก จึงทำให้สามารถอธิบายย้อนกลับถึงปรากฏการณ์การเกาะกลุ่มกันเพิ่มขึ้นของ HMW1 ซึ่งเป็นโมเลกุล ขนาดใหญ่ที่พบติดค้างอยู่บริเวณเจลสแตกกิ่งของโปรตีนภายหลังการเก็บข้าวได้ว่า เป็นการเกาะ กลุ่มกันของโปรตีนด้วยจากแรงไฮโดรโฟบิก ที่เกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโนไม่มีขั้ว คือ ไกลซีน อะลานีน (Wen and Luthe, 1985) ไอโซลิวซีน ลิวซีน เมไทโอนีน วาลีน และฟีนิลอะลานีน (Juliano, 1994) ในโปรตีน แรงไฮโดรโฟบิกที่เกิดขึ้นทำให้เกิดการเชื่อมต่อระหว่างสาย หรือโมเลกุล ของโปรตีน ทำให้โครงสร้างโปรตีนมีความเสถียร

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบแถบโปรตีนของแต่ละตัวอย่างที่ใช้ SDS ที่ระดับความเข้มข้น ต่างกันพบว่าที่ร้อยละ 5 จะมีแถบของโปรกลูทีลิน และ HMW2 เข้มกว่า สอดคล้องกับแถบแอลฟา และเบต้า-กลูทีลินที่จางกว่า แสดงถึงการเกาะตัวกันใหม่ของโปรตีนด้วยแรงไฮโดรโฟบิกซึ่งเป็นผล จากการที่โปรตีนเปิดตัวอันเนื่องมาจากการใช้ SDS ในปริมาณที่สูง

แม้แถบโปรตีนจากข้าวเก่าและใหม่ในสภาวะสกัดที่เดิม SDS จะมีรูปแบบเดียวกัน แต่ความ เข้มของบางแถบโปรตีนจากข้าวเก่า ได้แก่ หน่วยย่อยเบต้าและแอลฟา-กลูทีลินจะมีค่าน้อยกว่า ขณะที่กลุ่มโปรกลูทีลิน และ HMW2 (120-200 กิโลดาลตัน) จะมีความเข้มของแถบโปรตีน

มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวใหม่ โดยแถบโปรตีนขนาดใหญ่ และโปรตีนกลูทีลินที่เข้มมากในโปรตีนข้าวเก่าที่มีการใช้ SDS นี้ อาจเกิดจากพันธะโควาเลนต์หรือแรงยึดเหนี่ยวอื่น ๆ ที่แข็งแรงกว่าแรงไฮโดรโฟบิก จึงทำให้โปรตีนหน่วยย่อยดังกล่าวสามารถเกาะกลุ่มกันได้โดยไม่แยกจากกัน แม้อยู่ภายใต้สภาวะที่มี SDS

เมื่อนำโปรตีนสกัดมาแยกด้วย SDS-PAGE ในสภาวะที่มีเบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล (ภาพที่ 4.2) จะสังเกตเห็นความเข้มของแถบโปรตีน HWM1, HMW2 และ โปรตีนกลูทีลินในตัวอย่างข้าวเก่ามีค่าลดลง ตรงข้ามกับหน่วยย่อยเบต้า และแอลฟา-กลูทีลิน ที่แถบโปรตีนมีความเข้มเพิ่มขึ้น และยังพบโปรตีนกลูทีลินขนาดเล็กเท่ากับ 15-17 กิโลดาลตันทุกตัวอย่าง จากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้ แสดงว่าโปรตีนขนาดใหญ่ที่แยกได้เกิดขึ้นได้จากการรวมตัวของหน่วยย่อยขนาดเล็กหลายโมเลกุล (Sugimoto et al, 1991) โดยที่มีบทบาทสำคัญในการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนภายหลังการเก็บข้าวด้วยพันธะพันธะไดซัลไฟด์ เนื่องจากโปรตีนกลูทีลินประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสทีอีนที่มีหมู่ไทออล (-SH) อยู่ในโครงสร้าง (Juliano, 1985) ทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในรูปแบบของพันธะไดซัลไฟด์ได้ ทำให้เกิดการเชื่อมและการซ้อนทับกันของโปรตีนเกิดเป็นโครงสร้างสามมิติที่มีความเสถียร (Creighton, 1986; Doig and Williams, 1991) โดยพันธะไดซัลไฟด์นี้สามารถถูกทำลายได้ด้วยการเติมสารรีดิวซ์ชนิดต่าง ๆ (Creighton, 1986)

ดังนั้นการใส่ เบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล ซึ่งเป็นสารรีดิวซ์ในสารละลายโปรตีนจึงทำให้พันธะดังกล่าวถูกทำลายลง โปรตีนทั้งหมดที่เคยเกาะกลุ่มกันอยู่ด้วยพันธะไดซัลไฟด์จึงแยกออกจากกัน (Zhou, Robards, Helliwell and Blanchard, 2003) จึงสังเกตเห็นทั้งรูปแบบและความเข้มของแถบโปรตีนที่ไม่แตกต่างกันระหว่างข้าวเก่าและใหม่ที่มี SDS ดังภาพที่ 4.2

การแยกขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ที่ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ร้อยละ 12.5 สามารถแยกโปรตีนขนาด 200-14 กิโลดาลตันได้ แต่ไม่เห็นการแยกที่ชัดเจนของแถบโปรตีนที่น้อยกว่า 14 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 4.1 และ 4.2) ในขณะที่เดียวกันโปรตีนกลุ่ม HMW2 ก็อัดแน่นจนเกิดลักษณะแถบโปรตีนน้ำเงินเข้มอยู่บริเวณด้านบนของเจลรันนิ่งไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านลงมายังด้านล่าง จึงไม่แยกเป็นแถบที่ชัดเจน (ภาพที่ 4.1)

จึงต้องปรับเพิ่มและลดความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ 2 ระดับ คือ ร้อยละ 7.5 และ ร้อยละ 15 จะได้ขนาดรูพรุนบนเจลใหญ่และเล็กกว่าเจลที่เข้มข้นร้อยละ 12.5 เพื่อให้สามารถแยกโปรตีนขนาดใหญ่และเล็กมากได้ตามลำดับแสดงดังภาพที่ 4.3-4.6 โดยที่ระดับความเข้มข้นอะคริลาไมด์เท่ากับร้อยละ 7.5 สามารถแยกโปรตีนได้ตั้งแต่ 31 กิโลดาลตันขึ้นไป ซึ่งโปรตีนที่อยู่ในช่วง 45- <200 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 4.3) และยังคงพบแถบโปรตีนขนาดโมเลกุลใหญ่ HMW1 HMW2 และแถบโปรตีนขนาด 45-57 กิโลดาลตันเหมือนเช่นที่พบในภาพที่ 4.1 โดยความเข้มของแถบโปรตีนทั้งหมดที่พบในข้าวเก่ามีมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวใหม่ นอกจากนี้ยังสามารถแยกโปรตีน

ในช่วง 60-200 กิโลคาลตันเพิ่มขึ้นจากเดิมที่พบในภาพที่ 4.1 อีก 4 แถบโดยมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 62, 84, 100 และ 205 กิโลคาลตันตามลำดับ

โดย ก็ยังพบโปรตีนในกลุ่ม HMW1 บริเวณเจลสแตกกิ่งในตัวอย่างโปรตีนข้าวเก่า และข้าวใหม่ที่ไม่ใช่ SDS แสดงให้เห็นว่าโปรตีนกลุ่มนี้อาจเป็นโปรตีนกลูทีลินขนาดใหญ่กว่ารูปอื่น จึงไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเจลลงมาได้หมด โดยโปรตีนกลูทีลินที่พบในข้าวนั้น มีขนาดเล็กใหญ่แตกต่างกันไปโดยมีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ตั้งแต่ประมาณ 100 ไปจนถึงมากกว่า 1,000 กิโลคาลตัน (Juliano and Boulter (1976) และ Takeda, Namba and Nunokawa 1970) เมื่อพิจารณาตัวอย่างที่มีเบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล ในแผ่นเจลที่ใช้อะคริลาไมด์ ร้อยละ 7.5 ในภาพ 4.4 ที่แถบโปรตีนจากตัวอย่างข้าวเก่าและข้าวใหม่ที่ใช้ SDS ยังคงพบโปรตีนขนาดใหญ่ 55, 56, 90, 97 และ 115 กิโลคาลตันเช่นในภาพที่ 4.2 โดยระยะห่างของแถบโปรตีนแต่ละแถบมากกว่าที่ร้อยละ 12.5 นอกจากนี้ยังพบโปรตีนใหม่ขนาด 62 กิโลคาลตันด้วย การลดขนาดรูปในเจลด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ไปที่ ร้อยละ 15 (ภาพที่ 4.5) ทำให้พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 14 กิโลคาลตัน ที่บริเวณด้านล่างของแผ่นเจลเพิ่มขึ้น ในทุกตัวอย่างโปรตีนสก็ดเมื่อเปรียบเทียบกับภาพที่ 4.1 โดยความเข้มของแถบโปรตีนในข้าวใหม่มีมากกว่า ส่วนตัวอย่างที่เดิม เบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล (ภาพที่ 4.6) ยังคงพบแถบโปรตีนเหมือนกับภาพที่ 4.2 โดยที่ความเข้มของแถบโปรตีนหลัก คือ เบต้า-กลูทีลิน แอลฟา-กลูทีลิน และตำแหน่ง 15-17 กิโลคาลตันไม่ต่างกันในทุกตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าโปรตีนขนาด 15-17 กิโลคาลตันนี้จะรวมกลุ่มกับหน่วยย่อยอื่น ๆ หรือหน่วยย่อยขนาดเล็กเดียวกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์เป็นโปรตีนโมเลกุลขนาดใหญ่ซึ่งจะเกิดขึ้นภายหลังการเก็บรักษาข้าว

4.4.3 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้จากข้าวสุก

ข้าวเก่าและข้าวใหม่ผ่านการหุงสุกแล้วมาบดละเอียด เมื่อนำมาสกัดโปรตีนด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พบว่าปริมาณโปรตีนจากข้าวสุกเก่าและใหม่ที่จะละลายได้ในสารละลายต่าง (CFP₀ และ CAP₀) มีค่าน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับให้ความร้อน (ตารางที่ 4.3) ทั้งนี้เนื่องจากเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของสตาร์ชและโปรตีน (protein-starch interactions) (Likitwattanasade and Hongprabhas, 2010) ในเมล็ดข้าวรวมตัวกันขณะให้ความร้อนเกิดโครงสร้างสามมิติที่แข็งแรง โดยกักเก็บน้ำไว้เอาไว้ภายใน จนเกิดลักษณะเจลที่มีความเหนียวและยืดหยุ่น ซึ่งเมื่อผสมกับสารละลายต่างจะมีความข้นหนืดมาก จึงยากที่จะสกัดโปรตีนออกมาได้ ภายหลังจากการย่อยเจลาตินด้วยเอนไซม์อะไมเลสก่อนการนำไปสกัดโปรตีนนั้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของตัวอย่างข้าวใหม่ (CFP_{EA}) ($p > 0.05$) แต่มีผลทำให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในข้าวเก่า (AP_{EA}) เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างก่อนย่อยด้วยเอนไซม์ (CFP₀ และ CAP₀) จะเห็นว่าปริมาณโปรตีนในข้าวเก่า (CAP_{EA}) ที่เพิ่มขึ้นภายหลังย่อยด้วยเอนไซม์นี้

มีค่าใกล้เคียงเท่ากับข้าวใหม่(CFP_{EA}) ($p>0.05$) แสดงว่า หลังจากให้ความร้อนปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างโปรตีน และสสารในข้าวที่ผ่านการเก็บรักษามีค่ามากกว่าข้าวใหม่

ตารางที่ 4.4 ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากข้าวสุกขาวดอกมะลิ105 ใหม่ และเก่า

Extract solution	Alkaline extractable protein (mg/g dry sample)			
	CFP ₀	CFP _{EA}	CAP ₀	CAP _{EA}
10 mM NaOH	21 ± 0.9Y	24 ± 2.9a	18 ± 0.1AX	24 ± 4.0Ba
10 mMNaOH + 1%SDS	nd	44 ± 1.2cd	nd	45 ± 1.7d
10 mM NaOH + 5%SDS	nd	37 ± 3.8b	nd	39 ± 3.5bc

ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันตามแนวดิ่ง หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันตามแนวนอน หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
a-c ใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของโปรตีนสกัดในข้าวเก่า; CFP_{EA} และข้าวใหม่; CAP_{EA} ที่ย่อยด้วยอะไมเลส; X และ Y ใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของโปรตีนสกัดจากข้าวใหม่; CFP₀และข้าวเก่า CAP₀; A และ B ใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของโปรตีนสกัดจากข้าวใหม่และข้าวใหม่ที่ย่อยด้วยอะไมเลส; nd หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในระหว่างการเก็บรักษานั้น โมเลกุลของโปรตีนมีขนาดใหญ่ขึ้นจากการเกาะกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ โปรตีนขนาดใหญ่จะเกิดปฏิสัมพันธ์กับองค์ประกอบของสสาร ในลักษณะที่โครงสร้างสามมิติที่แข็งแรงมีความซับซ้อนจนเกิดมากกว่าโปรตีนในข้าวใหม่นอกจากนี้ การใช้ SDS ทำให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้มีค่าเพิ่มขึ้นในตัวอย่างข้าวสุกทั้ง 2 ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ (CFP_{EA} และ CAP_{EA}) ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับที่พบในฟลาร์ว (ตารางที่ 4.3) ซึ่งเกิดจากโปรตีนข้าวสุกสามารถจับกับ SDS เป็นลักษณะไมเซลล์และละลายออกมาได้มากขึ้น ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในตัวอย่างข้าวสุกใหม่ และเก่าที่ย่อยด้วยเอนไซม์ (CFP_{EA} และ CAP_{EA}) มีค่าลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SDS จาก ร้อยละ 1 เป็นร้อยละ 5 เช่นเดียวกับที่พบการละลายที่ลดลงในฟลาร์ว จึงกล่าวได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมในการละลายของโปรตีนคือ ค่าเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่มี SDS ร้อยละ 1 แม้ข้าวสุกจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์และใช้ SDS ในการสกัดโปรตีนแล้ว ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในข้าวสุกก็ยังมีค่าน้อยกว่าฟลาร์ว แสดงว่ายังมีโปรตีนบางส่วนที่ไม่สามารถละลายออกมาได้ โดยอาจเป็นกลุ่มโปรตีนที่เกิดปฏิสัมพันธ์อย่างเหนียวแน่นอยู่กับส่วนของตะกอนสสารที่ไม่ถูกย่อย จึงถูกปั่นเหวี่ยงตกตะกอนลงที่ก้นหลอดพร้อมกับสสารส่วนที่ไม่ถูกย่อยได้

4.4.4 ขนาดโมเลกุลของโปรตีนในตัวอย่างข้าวสุกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE)

จากผลการศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนภายหลังให้ความร้อน โดยใช้โปรตีนที่สกัดได้จากตัวอย่างข้าวสุกซึ่งผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส (ตารางที่ 4.4) มาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่า รูปแบบของโปรตีนสกัดจากข้าวสุกในภาพที่ 4.7 (cooked fresh0 และ cooked aged0) เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนสกัดจากตัวอย่างทั้ง 2 ก่อนให้ความร้อน (fresh0 และ aged0) ในภาพที่ 4.1 ภายหลังจากให้ความร้อนแทบจะไม่พบโปรตีนกลุ่ม HMW1 HMW2 และโปรตีนที่ลินขนาด 45-57 กิโลดาลตัน (cooked fresh0 และ cooked aged0) นอกจากนี้ยังพบแถบโปรตีนกลูทีลินหน่วยย่อยแอลฟา แต่ไม่ปรากฏแถบโปรตีนของกลูทีลินที่เป็นหน่วยย่อยเบต้าเลย แต่พบโปรตีนขนาดประมาณ 41 กิโลดาลตัน ในตัวอย่างทั้งสองอย่างชัดเจน ขณะที่ไม่พบโปรตีนกลุ่มนี้ในฟลาร์ว (ภาพที่ 4.1) ใช้สารละลายต่าง ที่มี SDS (cooked fresh และ cooked aged ที่ 1% และ 5% SDS) สกัดโปรตีนจากข้าวสุกโปรตีนขนาดใหญ่ (ประมาณ 47-100 กิโลดาลตัน) รวมถึงหน่วยย่อยเบต้าจะละลายออกมา สอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในตารางที่ 4.4 (CFP_{EA} และ CAP_{EA})

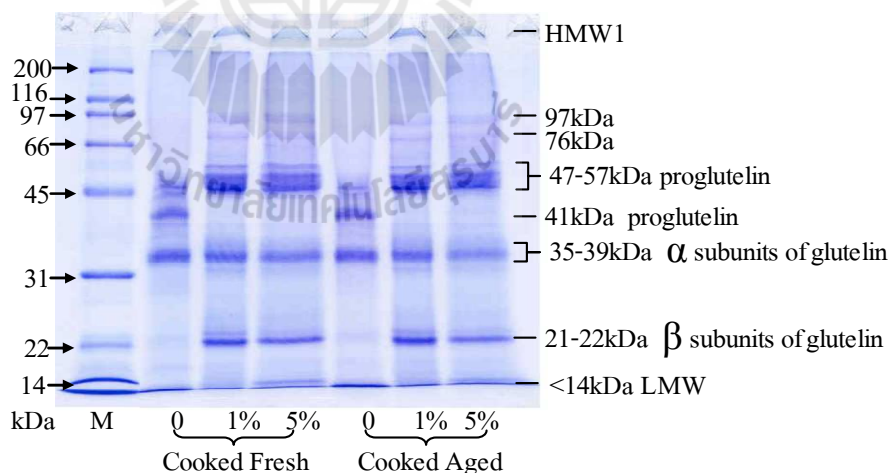
เนื่องจากคุณสมบัติของ SDS ที่ใช้ในการสกัดโปรตีนมีผลต่อโครงสร้างของสตาร์ชโดยสามารถปลดปล่อยโปรตีนที่เกาะอยู่ที่ผิวของสตาร์ช หรือเกาะอยู่กับพอลิเมอร์ของสตาร์ชให้หลุดออกมาได้ (Baldwin, 2001) แสดงว่าโปรตีนดังกล่าวเกิดปฏิสัมพันธ์กับสตาร์ชโดยการเชื่อมหรือเกาะอยู่กับโครงสร้างของสตาร์ชได้ ขณะที่ให้ความร้อน และยังพบว่าใช้ค่าร่วมกับ SDS เข้มข้นร้อยละ 1 หรือ 5 สกัดโปรตีนจากข้าวสุกยังแสดงรูปแบบของโปรตีนหลักที่คล้ายคลึงกับตัวอย่างใน ฟลาร์ว (ภาพที่ 4.1) แต่ต่างกันที่ความเข้มของแถบโปรตีนกลูทีลินที่สกัดได้มากกว่า หน่วยย่อยแอลฟา และเบต้ากลูทีลิน และการสกัดโปรตีนโดยใช้ SDS ยังคงพบโปรตีนขนาดใหญ่ (HMW1) ที่บริเวณเจลสแตกกิ่ง ซึ่งต่างจากในฟลาร์ว ที่สกัดโปรตีนด้วยค่าที่เดิม SDS (ภาพที่ 4.1) นั้นจะพบแถบโปรตีนกลูทีลินที่จางกว่าหน่วยย่อยแอลฟาและเบต้ากลูทีลิน และไม่พบแถบโปรตีนขนาดใหญ่ (HMW1) ที่บริเวณเจลสแตกกิ่ง

เมื่อเปรียบเทียบผล SDS-PAGE ที่เกิดขึ้นระหว่างก่อนและหลังให้ความร้อน แสดงให้เห็นว่าภายหลังจากให้ความร้อน โมเลกุลของโปรตีนมีการรวมตัวเกิดเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ขึ้น ได้แก่ โปรตีนขนาด 41 กิโลดาลตัน (cooked fresh0 และ cooked aged0) ที่พบในภาพที่ 4.7 ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของหน่วยย่อยเบต้ากลูทีลิน ทั้งนี้กลุ่มโปรตีนกลูทีลิน (cooked fresh และ cooked aged ที่ 1% และ 5% SDS) เพิ่มขึ้นได้จากการรวมกลุ่มของหน่วยย่อยแอลฟา และหรือเบต้ากลูทีลิน รวมทั้ง HMW1 ที่เป็นกลุ่มโปรตีนขนาดใหญ่ที่พบหลังให้ความร้อนน่าจะเป็นกลุ่มโปรตีนที่เกิดขึ้นใหม่จากโปรตีนขนาดเล็กที่เกาะกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ที่มีความแข็งแรง และด้วยขนาดที่ใหญ่และซับซ้อนขึ้นนี้เอง จึงทำให้เกิดปฏิสัมพันธ์อยู่กับสตาร์ชได้ดี ดังนั้นการใช้เพียงสารละลายค่าเข้มข้น

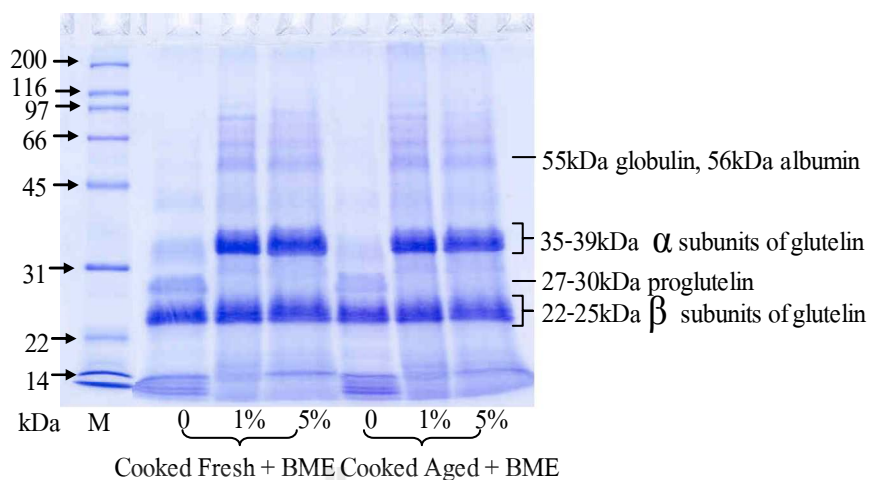
10 มิลลิโมลาร์ ในตอนแรก(cooked fresh0 และ cooked aged0) จึงไม่สามารถละลายโปรตีนกลุ่มนี้ออกมาได้ จึงต้องมีการเติม SDS เพื่อปลดปล่อยให้ HWM1 ที่จับอยู่กับสตาร์ชส่วนเหลือจากการย่อยนั้นหลุดออกมา

การศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนข้าวสาลีที่สกัดได้ในสภาวะที่มี เบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล (cooked fresh0+BME และ cooked aged0+BME) ในภาพที่ 4.8 ทำให้ทราบว่าโปรตีนหลักโดยโปรตีนเกือบทั้งหมดที่สกัดในสัดออกมาได้ด้วยสารละลายต่างเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (cooked fresh0 และ cooked aged0 ในภาพที่ 4.7) เกิดจากการรวมตัวกันของหน่วยย่อยเบต้ากลูทีลิน ขณะที่การใช้สารละลายต่าง ที่มี SDS ร้อยละ 1 และ 5 นั้น มีผลทำให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายออกมามีค่าเพิ่มขึ้นโดยกลุ่มโปรตีนหลักที่ละลายออกมา คือโปรกลูทีลิน ซึ่งเกิดจากหน่วยย่อยแอลฟาและเบต้าที่เชื่อมด้วยพันธะไดซัลไฟด์นั่นเอง (cooked fresh0+BME และ cooked aged0+BME ที่ 1 และ 5% SDS) จากผลที่เกิดขึ้นสามารถอธิบายได้ว่า โปรตีนกลูทีลินขนาดใหญ่เหล่านี้ (ประมาณ 47-100 กิโลดาลตัน) รวมถึงหน่วยย่อยเบต้ายังคงเชื่อมอยู่กับโครงข่ายของสตาร์ชที่หลงเหลือจากการย่อยด้วยอะไมเลส

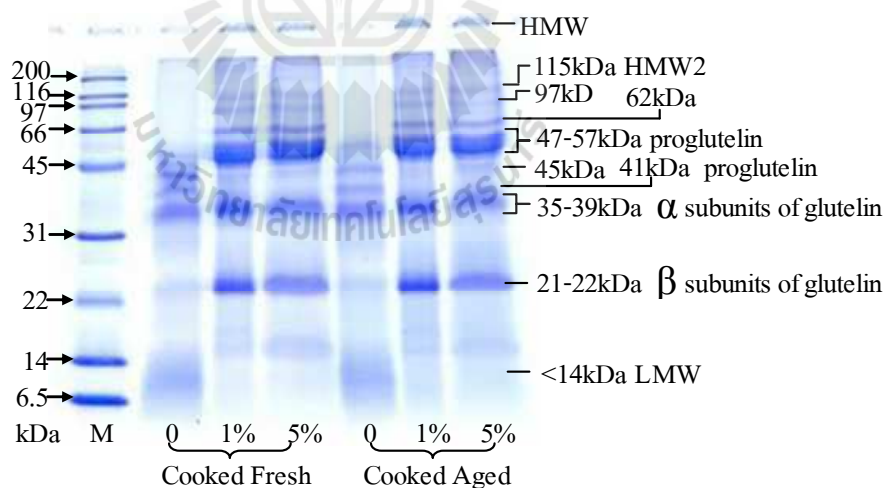
เมื่อพิจารณาที่ด้านล่างของแผ่นเจลในภาพที่ 4.7 และ 4.8 จะสังเกตเห็นแถบโปรตีนที่ต่ำกว่า 14 กิโลดาลตันที่ยังไม่แยกกันอย่างชัดเจน แสดงว่าโปรตีนดังกล่าวมีขนาดเล็กกว่ารูพรุนของ



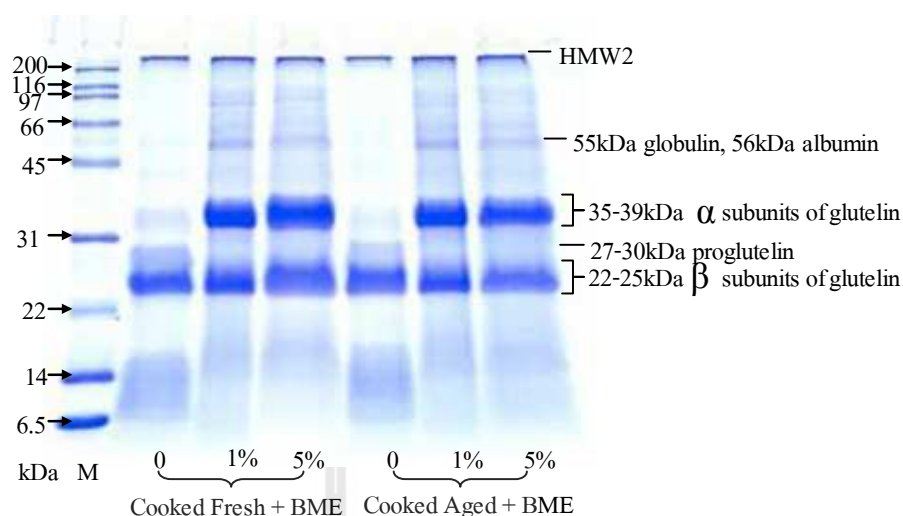
ภาพที่ 4.7 ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากข้าวสาลีขาวดอกมะลิ 105 ใหม่ (Cooked Fresh) และเก่า (Cooked Aged) สกัดด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ประกอบด้วยสารละลาย SDS เข้มข้นร้อยละ 0, 1 และ 5 ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่ไม่มีเบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล (BME) ปริมาณอะคริลาไมด์ร้อยละ 12.5 โดยแถบ M (lane M) แสดงโปรตีนมาตรฐาน



ภาพที่ 4.8 ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ใหม่ (Cooked Fresh) และเก่า (Cooked Aged) สกัดด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ประกอบด้วยสารละลาย SDS เข้มข้นร้อยละ 0, 1 และ 5 ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่มีเบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล (BME) ปริมาณอะคริลาไมด์ร้อยละ 12.5 โดยแถบ M (lane M) แสดงโปรตีนมาตรฐาน



ภาพที่ 4.9 ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากข้าวสุกขาวดอกมะลิ 105 ใหม่ (Cooked Fresh) และเก่า (Cooked Aged) สกัดด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ประกอบด้วยสารละลาย SDS เข้มข้น ร้อยละ 0, 1 และ 5 ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่ไม่ มีเบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล (BME) ปริมาณอะคริลาไมด์ ร้อยละ 15 โดยแถบ M (lane M) แสดงโปรตีนมาตรฐาน



ภาพที่ 4.10 ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากข้าวสุกขาวดอกมะลิ 105 ใหม่ (fresh) และเก่า (aged) สกัดด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ประกอบด้วยสารละลาย SDS เข้มข้นร้อยละ 0, 1 และ 5 ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่มีเบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล (BME) ปริมาณอะคริลาไมด์ร้อยละ 15 โดยแถบ M (lane M) แสดงโปรตีนมาตรฐาน

เจลอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 12.5 จึงเคลื่อนที่ลงมารวมกันอยู่บริเวณด้านล่างของแผ่นเจล โดยไม่เกิดการแยกที่ชัดเจน การทดลองลดขนาดรูพรุนโดยเพิ่มความเข้มข้นของอะคริลาไมด์เป็นร้อยละ 15 ทำให้ประสิทธิภาพการแยกโปรตีนดังกล่าวดีขึ้น โดยทั้ง cooked fresh 0 และ cooked aged 0 จะพบแถบโปรตีนหลักเพียง 3 แถบ คือ โปรตีนกลูเทลินขนาด 45 โปรตีนขนาด 41 กิโลดาลตัน และหน่วยย่อยแอลฟาที่มีขนาด 35-39 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 4.9) ส่วนตัวอย่างที่ใช้ต่างสกัดร่วมกับ SDS เข้มข้นร้อยละ 1 และ 5 พบโปรตีนขนาด 62 และ 115 กิโลดาลตันแยกออกมาอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับภาพที่ 4.7 ทั้งนี้เมื่อพิจารณาที่ส่วนล่างของแผ่นเจลเริ่มที่ตำแหน่ง 14 กิโลดาลตันลงไป กลับไม่พบแถบโปรตีนที่ชัดเจนเหมือนโปรตีนสกัดจากตัวอย่างก่อนให้ความร้อน (ภาพที่ 4.5 และ 4.6) พบเพียงแถบโปรตีนจาง ๆ กระจายอยู่ในบริเวณนั้น จึงอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีนขนาดเล็ก ๆ ที่เคยพบก่อนให้ความร้อนอาจจะติดค้างหรือถูกกักอยู่กับส่วนโครงข่ายสตาร์ช (starch network) ที่หลงเหลือจากการย่อยด้วยเอนไซม์ และเช่นเดียวกันในภาพที่ 4.10 จึงยังคงพบแถบโปรตีนหลักครบทั้ง 4 แถบ (cooked fresh และ cooked aged ที่มี 1 หรือ 5% SDS) เหมือนกับที่พบในภาพที่ 4.9 นอกจากนี้ยังพบโปรตีนขนาดใหญ่ (HMW2) ด้วยซึ่งต่างกับตัวอย่างโปรตีนก่อนให้ความร้อนที่ใช้อะคริลาไมด์ที่ร้อยละ 15 ในภาพที่ 4.6 ที่ไม่พบกลุ่ม HMW2 ที่บริเวณดังกล่าวเหมือนกับโปรตีนสกัดจากข้าวสุก

แสดงว่า โปรตีนกลุ่มนี้อาจจะแทรกอยู่หรือถูกกักไว้ในโครงข่ายของสตาร์ชจึงไม่สามารถถูกสกัดออกมาได้ในตัวอย่างก่อนให้ความร้อน ภายหลังจากเม็ดสตาร์ชพองและแตกตัวด้วยความร้อนจึงทำให้โปรตีนเหล่านี้สามารถหลุดออกมาได้ทำให้พบแถบโปรตีน HMW2 เฉพาะหลังให้ความร้อนเท่านั้น

4.4.5 ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิก (Surface hydrophobicity)

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณพื้นผิวเป็นไฮโดรโฟบิก (So) ของโปรตีนสกัดจากตัวอย่างทั้งสอง ได้แก่ ข้าวใหม่และข้าวเก่า ก่อนการให้ความร้อน พบว่าโปรตีนสกัดจากข้าวเก่ามีปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกสูงกว่าข้าวใหม่ ($p < 0.05$) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกนี้บ่งบอกถึงการเปิดตัว หรือคลายตัวของโมเลกุลโปรตีนภายหลังการเก็บ เป็นผลให้กรดอะมิโนชนิดไม่มีขั้วซึ่งขุดตัวอยู่ด้านในโมเลกุลของโปรตีนเปิดตัวออกสู่ภายนอก เพิ่มโอกาสในการจับตัว หรือเกาะกลุ่มกันของโปรตีนที่ไม่มีขั้ว ผลที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับผล SDS-PAGE (ภาพที่ 4.1 และ 4.2) ที่พบว่ามีจับกันระหว่างโมเลกุลโปรตีนภายหลังการเก็บด้วยแรงไฮโดรโฟบิก สอดคล้องกับผลปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (ตารางที่ 4.3) ในโปรตีนสกัดจากตัวอย่างข้าวเก่าที่มีค่าต่ำกว่าโปรตีนสกัดจากข้าวใหม่ ($p < 0.05$) ที่แสดงถึงการละลายได้มีค่าลดลง โดยภายหลังการหุงข้าวค่าปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกในโปรตีนสกัดมีค่าเพิ่มสูงขึ้นทั้ง 2 ตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนให้ความร้อน

ตารางที่ 4.5 ค่าพื้นผิวความเป็นไฮโดร โฟบิกของตัวอย่างโปรตีนที่สกัดจากฟลาร์ว์และข้าวสุก

Protein extract	Surface hydrophobicity (S_0)	Alkaline extractable protein (mg/g sample)
Raw rice		
FRP	$598.10 \pm 29.87a$	$66 \pm 2.4b$
ARP	$690.80 \pm 28.08 b$	$30 \pm 2.6a$
Cooked rice		
CFP ₀	$1,721.65 \pm 294.37a$	$21 \pm 0.9b$
CAP ₀	$2,418.30 \pm 253.29b$	$18 \pm 0.1a$

ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) FRP หมายถึง โปรตีนสกัดจากฟลาร์ว์ข้าวใหม่ และ CRP₀ หมายถึง โปรตีนสกัดจากข้าวสุกใหม่ ARP หมายถึงโปรตีนสกัดจากฟลาร์ว์ข้าวเก่า และ CAP₀ หมายถึง โปรตีนสกัดจากข้าวสุกเก่า

สอดคล้องกับค่าปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ที่มีค่าลดลงในตัวอย่างข้าวสุก (ตารางที่ 4.4) ซึ่งค่าปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกที่เพิ่มขึ้นนี้ บ่งชี้ถึงการเปิดตัวของโปรตีนมีค่าแปรผันตามการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ (Paraman, Hettiarachchy, Schaefer and Beck, 2006) โดยพบว่าค่าปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของโปรตีนสกัดจากข้าวเก่าสุกมีค่าสูงกว่าโปรตีนสกัดจากข้าวใหม่สุก ($p < 0.05$) บ่งบอกว่าภายหลังการให้ความร้อนโมเลกุลโปรตีนในข้าวเก่าจะมีการเปิดตัวมากกว่าข้าวใหม่ ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้มีค่าน้อยกว่า

4.4.6 ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล (SH) และไดซัลไฟด์ (SS)

จากการวิเคราะห์ปริมาณหมู่ไดซัลไฟด์ของโปรตีนสกัดจากข้าวก่อน และหลังการเก็บรักษา (FRP และ ARP) พบปริมาณหมู่ไดซัลไฟด์ในโปรตีนสกัดจากข้าวเก่ามีค่าสูงกว่าโปรตีนสกัดจากข้าวใหม่ สอดคล้องกับผล SDS-PAGE ในภาพที่ 4.2 และเมื่อพิจารณาพร้อมกับการเปิดตัวของโปรตีนที่มีค่ามากขึ้น (ตารางที่ 4.5) ภายหลังการเก็บรักษา ส่งผลให้หมู่ซัลไฮดริลที่อยู่ภายในโมเลกุลของโปรตีนเปิดตัวออกมาเพิ่มขึ้น และโอกาสที่จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันระหว่างหมู่ซัลไฮดริลเป็นหมู่ไดซัลไฟด์ก็มีเพิ่มขึ้นด้วย ในขณะที่เมื่อพิจารณาหมู่ซัลไฮดริลระหว่างโปรตีนสกัดพบว่ามีความที่ไม่ลดลงภายหลังการเก็บแม้จะพบหมู่ไดซัลไฟด์เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.6 ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล และไดซัลไฟด์ของโปรตีนจากฟลาร์ว และตัวอย่างข้าวสุก

Values	Rice protein extracts			
	FRP	ARP	CFP ₀	CAP ₀
Total SH, $\mu\text{mol/g protein}$	$15 \pm 5.94a$	$16 \pm 4.07a$	$62 \pm 24b$	$83 \pm 43c$
SS, $\mu\text{mol/g protein}$	$49 \pm 1.76a$	$59 \pm 2.54b$	$100 \pm 33c$	$129 \pm 69d$
Alkaline extractable protein (mg/g sample)	$66 \pm 2.4d$	$30 \pm 2.6c$	$21 \pm 0.9b$	$18 \pm 0.1a$

ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่ต่างกันตามแนวนอนหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) FRP หมายถึง โปรตีนสกัดจากฟลาร์วข้าวใหม่ และ CFP₀ หมายถึง โปรตีนสกัดจากข้าวสุกใหม่ ARP หมายถึง โปรตีนสกัดจากฟลาร์วข้าวเก่า และ CAP₀ หมายถึง โปรตีนสกัดจากข้าวสุกเก่า

อธิบายได้ว่าข้าวเก่ามีการเปิดตัวของโปรตีนที่มากกว่าทำให้หมู่ซัลไฟด์ที่ขดตัวอยู่ด้านในโปรตีนเปิดตัวออกมาได้มากด้วย ปริมาณที่วัดหมู่ซัลไฮดริลจะไม่ลดลง

นอกจากนี้โปรตีนที่สกัดจากทั้งข้าวใหม่ และเก่าที่หุงสุกแล้วจะมีการเพิ่มขึ้นของทั้ง หมู่ซัลไฟไดรล และไดซัลไฟด์ โดยปริมาณหมู่ซัลไฟไดรลที่เพิ่มขึ้นนี้คือส่วนของหมู่ซัลไฟไดรลที่อยู่ในโมเลกุลโปรตีนซึ่งเปิดตัวออกมาเมื่อได้รับความร้อนนั้น ยังส่งผลให้หมู่ซัลไฟไดรลของโปรตีนกลูทีลินที่เปิดตัวออกมาเกิดเชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (ภาพที่ 4.7-4.10) จึงทำให้หมู่ไดซัลไฟด์มีค่าเพิ่มขึ้นได้ภายหลังให้ความร้อนด้วย เมื่อเปรียบเทียบปริมาณหมู่ไดซัลไฟด์ของโปรตีนสกัดจากข้าวสุกทั้ง 2 พบว่าหมู่ไดซัลไฟด์ของโปรตีนสกัดจากข้าวเก่ายังมีค่ามากกว่า

4.5 สรุปผลการทดลอง

ข้าวที่เก็บรักษาไว้ 1 ปี จะมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีของโปรตีนที่ต่างไปจากข้าวใหม่ โดยการละลายของโปรตีนในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มีค่าลดลง แต่สามารถเพิ่มขึ้นได้เมื่อเติมโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตร่วมกับด่างสกัดโปรตีน โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากฟลาร์ว คือ ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ที่มี SDS ร้อยละ 1 โปรตีนสกัดจากข้าวเก่าจะมีค่าปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิก และปริมาณหมู่ไดซัลไฟด์ที่สูง บ่งชี้ว่าโปรตีนมีการเปิดตัว หรือคลายตัวเพิ่มขึ้น จึงทำให้กรดอะมิโนไฮโดรโฟบิก รวมทั้งหมู่ซัลไฟไดรล และที่ขดตัวอยู่ด้านในโมเลกุลโปรตีนเคลื่อนที่ออกมายังด้านหน้า จากนั้นจึงเกิดการเชื่อมกันของกรดอะมิโนระหว่างโมเลกุลโปรตีนด้วยอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก และพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งสอดคล้องกับผล SDS-PAGE ที่พบขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในข้าวเก่าจะขัดขวางการซึมผ่านของน้ำเข้าสู่เม็ดสตาร์ช ทำให้การพองตัวและการแตกตัวของสตาร์ชเกิดขึ้นน้อย จึงต้องใช้อุณหภูมิที่สูงในการทำเม็ดสตาร์ชเจลาติไนซ์ นอกจากนี้ยังพบว่าค่าปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของโปรตีนสกัดจากข้าวสุกมีค่ามากกว่าข้าวสาร แสดงถึงโปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติจากความร้อนที่ใช้ในการหุงข้าวเป็นผลให้โมเลกุลโปรตีนเปิดตัวอย่างมาก ทั้งนี้ข้าวหุงสุกจะมีปริมาณโปรตีนที่ละลายออกมาได้น้อยกว่าในข้าวสารด้วย การละลายของโปรตีนข้าวสุกสามารถเพิ่มขึ้นได้เมื่อใช้เอนไซม์อะไมโลส ย่อยพอลิเมอร์ของสตาร์ชก่อนการสกัด ซึ่งแสดงถึงการมีปฏิสัมพันธ์กันระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับสตาร์ชที่เกิดในระหว่างการให้ความร้อน นอกจากนี้ยังพบกลุ่มโปรตีนขนาดเท่าโปรกลูทีลินในปริมาณมากในข้าวสุก โดยเกิดจากการเกาะกลุ่มกันใหม่ของหน่วยย่อยแอลฟา และเบต้ากลูทีลิน ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ จากผลที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าพันธะไดซัลไฟด์มีบทบาทสำคัญต่อความเสถียรของโครงสร้างโปรตีนทั้งก่อน และหลังให้ความร้อน โดยโปรตีนจากข้าวเก่ามีการเกาะกลุ่มกันเป็นโปรตีนขนาดใหญ่มากขึ้น ขัดขวางการพองตัว และการเจลาติไนเซชันของสตาร์ช จากการเพิ่มขึ้นของพันธะไดซัลไฟด์ซึ่งสามารถทำให้โครงสร้างของโปรตีนเสถียรได้มากขึ้น จึงทำให้โปรตีนของข้าวเก่าสามารถเกิดโครงสร้างตาข่ายสามมิติร่วมกับพอลิเมอร์ของสตาร์ชเกิดเป็นเจลที่แข็งแรงได้ด้วย

4.6 รายการอ้างอิง

- Agboola, S., Ng, D., and Mills, D. (2005). Characterisation and functional properties of Australian rice protein isolates. **Journal of Cereal Science** 41: 283–290.
- Baldwin, P.M. (2001). Starch Granule-Associated Proteins and Polypeptides: A Review. **Starch/Stärke** 53: 475-503.
- Bean, M. M., and Nishita, K.D. (1985). Rice flours for baking. **Rice Chemistry and Technology**. 2nd Ed. Juliano, B.O., ed AACC Internation:St. Paul, MN: 59-174.
- Bechtel, D.B. and Pomeranz, Y. (1978). Ultrastructure of the mature ungerminated rice (*Oryza sativa*) caryopsis. **American Journal of Botany** 65: 684-691.
- Cagampang, G.B., Cruz, L.-J., Espiritu, S.G., Santiafo, S.G. and Juliano, B.O. (1966). Studies on the extraction and composition of rice protein. **Cereal Chemistry** 43: 145-155.
- Cardoso, M.B., Putaux, J.L., Samios, D., Silveira, N.P.D. (2007). Influence of alkali concentration on the deproteinization and/or gelatinization of rice starch. **Carbohydrate polymers** 70: 160-165.
- Chrastil, J. and Zarins, Z.M. (1992). Influence of storage on peptide subunit composition of rice oryzenin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 40: 927-931.
- Creighton, TE. (1986). Disulfide bonds as probes of protein folding pathways. **Methods Enzymol** 131: 83-106.
- Cagampang, G.B., Cruz, L.J., Espiritu, S.G., Santiago, R.G. and Juliano, B.O. (1966). Studies on the extraction and composition of rice proteins. **Cereal Chemistry** 43: 145-155.
- Chartil, J. (1993). Changes of oryzenin and starch during preharvest maturing of rice grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 40: 927-930.
- Chrastil, J. (1994). Stickiness of oryzenin and starch mixtures from preharvest and postharvest rice grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 42: 2147-2151.
- Del Rosario, A.R., Briones, V.P., Vidal, A.J. and Juliano, B.O. (1968). Composition and endosperm structure of developing and mature rice kernel. **Cereal Chemistry** 45: 225-235.
- Dogi, A.J. and Williams, D.H. (1991). Is the hydrophobic effect stabilizing or destabilizing in protein? The contribution of disulfide bonds to protein stability. **Journal of Molecular Biology** 217: 389-398.
- Derycke, V., Veraverbeke, W.S., Vandeputte, G.E., De Man, W., Hoseney, R.C. and Delcour, J.A.

- (2005). Impact of protein on pasting and cooking properties of nonparboiled and parboiled rice. **Journal of Cereal Chemistry** 82(4): 468–474.
- Eggum, B.O., Cabrera, M.I.Z., and Juliano, B.O. (1992). Protein and lysine digestibility and protein quality of cooked Filipino rice diets and milled rice in growing rats. **Plant Foods for Human Nutrition** 43: 163-170.
- Fogarty, W.M. and Kelly, C.T. (1990). **Microbial Enzymes and Biotechnology**. Elsevier, London: 149-158.
- Ficochi, A., Travaini, M., D'Auria, E., Banderali, G., Bernardo, L., and Riva, E. (2003). Tolerance to a rice hydrolysate formula in children allergic to cow's milk and soy. **Clinical & Experimental Allergy** 33: 1576-1580.
- Görg, A. and Westermeier, R. (1999). Micorseparation Techniques and Sample Preparation. In R. Kellner, F. Lottspeich and H.E. Meyer (eds.). **Microcharacterization of proteins**. (2nd., pp. 16-17). Weinheim: Wiley-VCH
- Gururaj, A. and Narasinga, M.S. (1983). Effect of sodium dodecyl sulphate on the high molecular weight protein fraction of mustard (*Brassica juncea*) and rapeseed (*Brassica campestris*), **Journal of Biosciences** 5: 301-309.
- Hamaker, B.R. and Griffin, V.K. (1990). Changing the viscoelastic properties of cooked rice through protein disruption, **Cereal Chemistry** 67(3): 261–264.
- Houston, D.F., Iwasaki, T., Mohammad, A. and Chen, L. (1986). Radial distribution of protein by solubility classes in the milled rice kernel. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 5: 720-724.
- Ju, Z. Y., Hettiarachchy, N. S., & Rath, N. (2001). Extraction, denaturation and hydrophobic properties of rice flour proteins. **Journal of Food Science** 66: 229–232.
- Juliano, B. O. (1985). Polysaccharide, proteins and lipid of rice grain composition, *Rice Chemistry and Technology*, 2nd. AACC Internation:St. Paul, MN: 59-174.
- Juliano, B.O. (1985). **Rice chemistry and technology**. The American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA.
- Juliano, B.O. and Boulter, D. (1976). Extraction and composition of rice endosperm glutelin. **Phytochemistry** 15: 1976-1606.

- Kato, A., and Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by an fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. **Biochem. Biophys. Acta.** 624:13-20.
- Kqczkowski, J. (2000). New aspects of the cereal storage protein synthesis and degradation including the role of thioredoxin, as well as its regulatory properties. **Acta physiologiae plantarum** 22(4): 483-494.
- Kusama, T., Yangi, S.O. and Iwamoto, M. (1984). Comparison of rice (*Oryza sativa L.*) seed proteins from several varieties. **Agricultural and Biological Chemistry** 48(6): 1649-1651.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685.
- Likitwattanasade, T. and Hongsprabhas, P. (2010). Effect of storage proteins on pasting properties and microstructure of Thai rice. **Food Research International** 43: 1402-1409.
- Lugay, J.C. and Juliano, B.O. (1965). Crystallinity of rice starch and its fractions in relation to gelatinization and pasting characteristics. **Journal of Applied Polymer Science** 9: 3775-3790.
- Lyon, B.G., Champagne, E.T., Windham, W.R., Barton, F.E., Webb, B.D., McClung, A.M., Moldenhauer, K.A., Linscombe, S., McKenzie, K.S. and Kohlwey, D.E. (1990). Effect of degree of milling, drying condition, and final moisture content on sensory texture of cooked rice. **Cereal Chemistry** 76: 56-62.
- Martin, M. and Fitzgerald, M.A. (2002). Proteins in rice influence cooking properties. **Journal of Cereal Science** 36: 285–294.
- Maningat, C.C and Juliano, B.O. (1979). Properties and degradability of isolated starch granules. **Starch/Starke** 42: 298-301.
- Mitsuda, H., Yasumoto, K., Murikami, K., Kusano, T. and Kishida, H. (1967). Studies on the proteinaceous subcellular particles in rice endosperm: electron-microscopy and isolation. **Agricultural and Biological Chemistry**: 31: 293-300.
- Nigam, P. and Singh, D. (1995). Enzymes and microbial systems involved in starch processing. **Enzyme Microbial Technology** 17: 770-778.
- Ohno, T. and Ohisa, N. (2005). Studies on textural and chemical changes in aged rice grains, **Food Science and Technology Research** 11(4): 385-389.

- Ohno, T., Tomatsu, M., Toeda, K. and Ohisa, N. (2007). Texture of cooked rice prepared from aged rice and its improvement by reducing agents. **Bioscience Biotechnology Biochemistry** 71: 2912-2920.
- Osborne, T.B. (1924). **The Vegetable Proteins**. London: Longmans, Green.
- Oszvald, M., Tomoskozi, S., Larroque, O., Keresztenyi, E., Tamas, L. And Bekes, F. (2008) Characterization of rice storage proteins by SE-HPLC and micro z-arm mixer. **Journal of Cereal Science** 48: 68-76.
- Padhye, V.W. and Salunkhe, D.K. (1979). Extraction and characterization of rice proteins. **Cereal Chemistry** 56: 389-393.
- Paraman, I., Hettiarachchy, S.N., Schaefer, C. and Beck, M.I. (2007). Hydrophobicity, Solubility, and Emulsifying Properties of Enzyme-Modified Rice Endosperm Protein. **Cereal Chemistry** 84(4): 343-349
- Shewry, P.R. and Halford, N.G. (2002). Cereal seed storage proteins: Structures, properties and role in grain utilization. **Journal of Experimental Botany** 53(370): 947-958.
- Sugimoto, T., Tanaka, K. and Kasai, Z. (1991). Heterogeneity in subunit composition of glutelin in rice protein bodies, **Agricultural and Biological Chemistry** 55(1): 273-274.
- Takeda, M., Namba, Y., Nunokawa, Y. (1970). Heterogeneity of rice glutelin. **Agricultural and Biological Chemistry** 34: 473-481.
- Tanaka, Y., Resurreccion, A.P., Juliano, B.O. and Bechtel, D.B. (1978). Properties of whole and undigested fraction of protein bodies of milled rice. **Agricultural and Biological Chemistry** 42: 2015-2033.
- Tanaka, Y., Sugimoto, T., Ogawa, M., and Kasai, Z. (1980). Isolation and characterization of two types of protein bodies in the rice endosperm, **Agricultural and Biological Chemistry** 44: 1633-1639.
- Tecson, E.M.S., Esmama, B.V., Lontok, L.P. and Julino, B.O. (1999). Studies on the extraction and composition of rice endosperm glutelin and prolamin. **Cereal Chemistry** 48: 168-181.
- Teo, C. H., Karim, A. Abd., Cheah, P. B., Norziah, M. H., & Seow, C. C. (2000). On the role of protein and starch in the aging of non-waxy rice flour. **Food Chemistry** 69:229–236.

- Utsumi, S. (1992). Plant food protein engineering. In: Kinsella, J.E. (Ed.), **Advances in Food and Nutrition Research**. Academic Press, San Diego, CA: 89–208.
- Wen, T.N. and Luthe, D.S. (1985). Biochemical and characterization of rice glutelin. **Plant Physiology** 78: 172-177.
- Yang, T.Y., Shen, Y.H., Huang, X.G., He, J.H. and Wu, G.Z. (2005). Identification of genetic diversity in foxtail millet (*Setaria italica* L. Beauv.) by A-PAGE. **Acta Agronomica Sinica** 131(1): 131-133.
- Yamakata, H. and Tanaka, K. (1986). The site of synthesis and accumulation of rice storage proteins. **Plant Cell Physiology** 27: 135-145.
- Yook, C. and Robyt, J.F. (2002). Reactions of alpha amylases with starch granules in aqueous suspension giving products in solution and in a minimum amount of water giving products inside the granule. **Carbohydrate Research** 337: 1113-1117
- Zhan, X.Y. and Lin, R.H. (1991). Electrophoresis analysis of glutelin of cultivar rice and wild rice. **Chinese Journal of Rice Science** 5(3): 109-113.
- Zhang, G., Ao, Z. and Hamaker, B.R. (2006). Slow digestion properties of native cereal starches. **Biomacromolecules** 7: 3252-3258.
- Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S. and Blanchard, C. (2003). Effect of rice storage on pasting properties of rice flour. **Food Research International** 36: 625-634.

บทที่ 5

ผลของสารรีดิวซิงซ์ต่อคุณสมบัติข้าวเก่า

5.1 บทคัดย่อ

ข้าวเก่าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เก็บ 1 ปีที่อุณหภูมิห้อง นำมาศึกษาผลการใช้สารละลายรีดิวซิงซ์ 3 ชนิด คือ โซเดียมซัลไฟท์ (SS) กรดแอสคอร์บิก (AA) และ ซิสทีอีน (CYS) ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ แทนน้ำหุงข้าว พบว่าสารรีดิวซิงซ์ทั้ง 3 ชนิดสามารถเพิ่มความนุ่มให้ใกล้เคียงกับข้าวใหม่ ขณะที่ค่าการเกาะติดกันของเมล็ดข้าวสุกเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ SS และ CYS ที่ 15 มิลลิโมลาร์ แต่ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ AA และยังพบว่าประสิทธิภาพของซิสทีอีนในการเพิ่มความนุ่มข้าวสุกลดลงมากเมื่อใช้ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ การปรับค่าพีเอชของน้ำให้เท่ากับพีเอชของสารรีดิวซิงซ์ในช่วง 3.1-3.3 และ 9.5-9.6 สามารถทำให้ข้าวเก่านุ่มขึ้น แต่ไม่มีผลเพิ่มการเกาะกันของเมล็ดข้าว สารรีดิวซิงซ์ทั้ง 3 ชนิดมีผลในการเปลี่ยนแปลงความหนืดของข้าวเก่าโดยเพิ่มค่าความหนืดสูงสุด (peak viscosity, PV) เบรกดาวน์ (breakdown, BD) และลดค่าเซตแบค (setback, SB) และยังพบการเพิ่มขึ้นของค่า PV และการลดลงของค่า SB ในทุกตัวอย่างที่หุงด้วยสารรีดิวซิงซ์ที่ละลายในบัฟเฟอร์การศึกษาการแช่ตัวอย่างข้าวเก่าด้วยสารละลาย SS ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ และ ไดไทโอไธทอล (DTT) ที่ 5 มิลลิโมลาร์ โดยแช่ที่ 37 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง แล้วอบแห้ง นำมาตรวจสอบคุณสมบัติการเกิดเพสต์ พบการเพิ่มขึ้นของค่า PV และ BD ขณะที่ SB และ FV ลดลงทั้ง 3 ความเข้มข้น เช่นเดียวกับ DTT แต่ SS มีประสิทธิภาพต่ำกว่า การตรวจสอบเนื้อสัมผัสของข้าวสุกที่ผ่านการแช่ SS ที่ 5 มิลลิโมลาร์พบว่ามีความนุ่มขึ้น เมล็ดข้าวเกาะตัวกันดีขึ้น ผล SDS-PAGE แสดงให้เห็นว่า SS สามารถลดขนาดโมเลกุลโปรตีนโดยการตัดพันธะไดซัลไฟด์ ทำให้ปริมาณหมู่ไดซัลไฟด์ลดลง สัมพันธ์กับปริมาณหมู่ซัลไฮดริลที่เพิ่มขึ้น และการางลงของแถบโปรตีนขนาดใหญ่และ แถบโปรกลูทีลิน ขณะที่แถบหน่วยย่อยของกลูทีลินเพิ่มขึ้น

5.2 บทนำ

ในปัจจุบันการบริโภคข้าวในรูปข้าวเต็มเมล็ดมีสัดส่วนที่สูงกว่าการนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ฉะนั้นแล้วคุณภาพในด้านการหุงต้ม และรับประทานจึงถือเป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึง และให้ความสำคัญ (Bao, Sun, Zhu, and Corke, 2004). ผลผลิตข้าวหลังเก็บเกี่ยวเสร็จจะถูกเก็บรักษาอยู่ในรูปข้าวเต็มเมล็ด (Matsukura, Kaneko, and Momma, 2000) เพื่อรอการบริโภคหรือ จัด

จำหน่ายต่อไป การเก็บข้าวไว้ที่อุณหภูมิห้องตั้งแต่ 6 เดือนขึ้นไป ข้าวที่เก็บไว้จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง คุณสมบัติทางกายภาพต่าง ๆ เช่น การดูดซับน้ำ (hydration) การพองตัวของเมล็ดสตาร์ช (swelling) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (solubility) รวมถึงความหนืดของเจลแป้ง (viscosity) (Barber, 1972; Juliano, 1972) ที่ต่างไปจากเดิมในลักษณะของข้าวเก่า เรียกว่า กระบวนการนี้ว่า การเก่าของข้าว (aging process) การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพที่ได้กล่าวถึงมาแล้วนี้ล้วนส่งผลโดยตรงต่อค่าเนื้อสัมผัสของข้าวภายหลังการเก็บ โดยข้าวเก่าสุกจะมีการเกาะกันของเมล็ดข้าวน้อยลง ขณะที่ความแข็งมีค่าเพิ่มขึ้น (Meullenet, Marks, Griffin and Daniels, 1999; Tsugita, Ohta and Kato, 1983) ซึ่งให้ผลเหมือนกันทั้งการวัดด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Okabe, 1979; Shibuya, Ikasaki, Yanase and Chikubu, 1974) หรือการทดสอบทางประสาทสัมผัส คุณภาพเนื้อสัมผัสข้าวสุกที่ด้อยลง มีผลโดยตรงต่อความนิยมในการบริโภคที่ลดลง และส่งผลกระทบต่อยอดจำหน่ายข้าวที่ลดลงตามมา โดยจากผลการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ทราบว่านอกจากสตาร์ชแล้ว โปรตีนก็มีอิทธิพลต่อลักษณะความหนืดและเนื้อสัมผัสของข้าวอย่างมาก (Hamaker, and Griffin; 1990 Hamaker, and Griffin; 1993 Xie, Chen, Duan, Zhu, and Liao, ; 2008) โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนที่เกิดขึ้นภายหลังการเก็บ ทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโมเลกุลโปรตีนระหว่างโมเลกุลโปรตีนที่มีหมู่ซัลไฮดริลด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ส่งผลให้ปริมาณหมู่ซัลไฮดริลอิสระของโปรตีนมีค่าลดลง (Charstil and Zarins, 1992) ขณะเดียวกันพันธะไดซัลไฟด์ก็จะมีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งการเชื่อมกันของหน่วยย่อยโปรตีนทำให้โปรตีนขนาดใหญ่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น (Chrastil, 1990) โปรตีนในเมล็ดข้าวนั้นจะกระจายอยู่ทั่วไป ทั้งในส่วนของผนังเซลล์ ภายในเมล็ดสตาร์ช หรือล้อมรอบบริเวณเมล็ดสตาร์ชไว้ จากการที่มีโปรตีนกระจายอยู่ทั่วเมล็ดข้าวนี้อย่าง โปรตีนจึงสามารถขัดขวางการแพร่เข้าของน้ำสู่เมล็ดสตาร์ช (Kang, Hwang, Kyung and Choi, 2006a) การพองตัวของเมล็ดสตาร์ช และการเกิดเจลทำได้ยาก ส่งผลให้สตาร์ชเกิดการเจลลาคิในข้าวไม่สมบูรณ์ (Kang et al, 2006b) จึงมีผลต่อเนื้อสัมผัสของข้าวได้ (Moritaka, and Yasumatsu, 1972; Watanabe, Arai, Honma and Fuke, 1991a) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ความดันสูง (Watanabe et al, 1991b; Arai, Aoyama and Watanabe, 1993; Shibuya and Iwasaki, 1982; Saleh, M.I. and Meullenet, J-F. 2007) การย่อยเมล็ดสตาร์ช หรือ โปรตีนด้วยเอนไซม์ และแม้แต่การเติมน้ำส้มสายชู (rice vinegar) หรือ น้ำผลไม้ (fruit juice) ในน้ำสำหรับหุงข้าว (Ema and Kainuma, 1991) ก็สามารถปรับเปลี่ยนเนื้อสัมผัสของข้าวที่แข็งให้ความนุ่ม และมีการเกาะติดกันดีของเมล็ดข้าวสุก สารรีดิวซิงซึ่งมีส่วนในการคืนสภาพธรรมชาติของโปรตีนกลั่นเนื้อปลาที่ผ่านการแช่แข็งได้ สามารถนำไปผลิตเป็นซูริมีที่มีคุณภาพสูงให้เนื้อสัมผัสของเจลที่ดี (Itoh et al, 1979) โดยมีค่า gel strength ที่สูง (Itoh, Y., Yoshinaka, R. and Tsai, CY, 1979) และ gel-forming ability ที่ดี (Roussel, H and Cheftel, JC, 1990; Jiang, S.T., Hsieh, Ho and Jiang, S.H., 1998)

และในปี 2005 Benjakul, Thongkaew และ Visessanguan ได้นำสารรีดิวซิงซ์หลายชนิด ได้แก่ ซิสทีอิน กรดแอสคอบิก และโซเดียมซัลไฟท์ เข้มข้นร้อยละ 0.05-0.2 ใส่ผสมในการเตรียมซูริมิ จากปลาทะเลแช่แข็ง พบว่า ค่า gel-forming ability เพิ่มขึ้น ได้น้ำมันของผลิตภัณฑ์ซูริมิที่ดี เนื่องจากสารรีดิวซิงซ์ที่เกิดขึ้นจากการออกซิเดชันของกรดอะมิโนในเนื้อปลาระหว่างการแช่แข็ง ถูกทำลายลง ส่งผลให้โปรตีนกลับคืนสู่สภาพธรรมชาติก่อนการแช่แข็งได้ (Jiang, Lan and Tsai, 1986; Jaing, Hwang and Tsao, 1987) ในปี 2007 ได้มีความพยายามของนักวิจัยญี่ปุ่น ในการนำสารรีดิวซิงซ์บางชนิด ได้แก่ โซเดียมซัลไฟท์ ซิสทีอิน และไดไทโอไธทอล ซึ่งมีคุณสมบัติทำลายพันธะไดซัลไฟด์มาใช้ในการปรับปรุงคุณลักษณะเนื้อสัมผัสของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ อะคิตะโกมะจิ (Akitakomachi) โดยพบว่าสารรีดิวซิงซ์มีผลในการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ทำให้ขนาดโมเลกุลของโปรตีนมีขนาดลดลง และสามารถลดค่าความแข็งขณะเดียวกันก็เพิ่มความนิยของตัวอย่างข้าวเก่าได้ (Ohno, Tomatsu, Toeda and Ohisa, 2007) ผลที่เกิดขึ้นนี้มีความน่าสนใจที่แนะนำให้เป็นแนวทางการศึกษาในกลุ่มของข้าวไทย โดยเฉพาะข้าวหอมมะลิที่เป็นข้าวคุณภาพดีได้รับความนิยมในการบริโภคสูงทั้งในและต่างประเทศ เพื่อเป็นแก้ไขปัญหาคูณภาพข้าวที่ด้อยลงในระหว่างการเก็บรักษา โดยการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษาชนิด และระดับความเข้มข้นของสารละลายรีดิวซิงซ์ ต่อเนื้อสัมผัสของข้าว รวมถึงขนาดโมเลกุลของโปรตีนในข้าวสุกที่ผ่านการหุงด้วยสารรีดิวซิงซ์

5.3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

5.3.1 วัสดุทดลอง

ตัวอย่างข้าวเปลือกพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ชื่อจากศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ตั้งอยู่ที่บ้านหนองขอน ต.เขื่องใน อ.เมือง จ.อุบลราชธานี โดยเป็นตัวอย่างข้าวที่เก็บเกี่ยวใหม่ปี 2551 และตัวอย่างข้าวเปลือกที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ปี

5.3.2 การเตรียมตัวอย่างข้าวสุก

หุงข้าวในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบมีฝาปิด โดยเติมน้ำให้ได้ระดับอย่างน้อยเท่ากับครึ่งหนึ่งของความสูงอ่าง ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 100 องศาเซลเซียส จากนั้นชั่งน้ำหนักกระป๋องอะลูมิเนียมพร้อมฝาปิดแล้วบันทึกน้ำหนักที่แน่นอนไว้ ชั่งตัวอย่างข้าวสารให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนใส่ในกระป๋องอะลูมิเนียมจำนวน 31 กระป๋อง โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ ชั่งข้าวใหม่ใส่ กระป๋องใบที่ 1 และ 2 แล้วชั่งข้าวเก่าใส่ในกระป๋องใบที่เหลือจนครบ 31 ใบ จากนั้น เติมน้ำกลั่นในกระป๋องอะลูมิเนียมใบที่ 1 และ 3 เติมสารละลายโซเดียมซัลไฟท์เข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์

ในกระป๋องใบที่ 4, 5 และ 6 ตามลำดับ เติมสารละลายซีสทีนเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ ในกระป๋องใบที่ 7, 8 และ 9 ตามลำดับ เติมสารละลายกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ ในกระป๋องใบที่ 10, 11 และ 12 ตามลำดับ เติมละลายในฟอสเฟสบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ในกระป๋องใบที่ 2 และ 13 เติมสารละลายโซเดียมซัลไฟต์เข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ ซึ่งละลายในฟอสเฟสบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ในกระป๋องใบที่ 14, 15 และ 16 ตามลำดับ เติมสารละลายซีสทีน ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ ซึ่งละลายในฟอสเฟสบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ในกระป๋องใบที่ 17, 18 และ 19 ตามลำดับ เติมสารละลายกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 5, 10 และ 15 ซึ่งละลายในฟอสเฟสบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ในกระป๋องใบที่ 20, 21 และ 22 ตามลำดับ เติมน้ำกลั่นพีเอช 9.51, 9.46 และ 9.63 ที่ปรับด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ ในใบที่ 23, 24 และ 25 ตามลำดับ เติมน้ำกลั่นพีเอช 3.30, 3.15, 3.07 ที่ปรับด้วยสารละลายกรดซิตริกเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ในกระป๋องใบที่ 26, 27 และ 28 ตามลำดับ และสุดท้าย เติมน้ำกลั่นพีเอช 5.59, 5.38 และ 5.34 ที่ปรับด้วยสารละลายกรดซิตริกเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ในกระป๋องใบที่ 29, 30 และ 31 ตามลำดับ

โดยใช้น้ำหนักตัวอย่าง และปริมาณน้ำหรือสารละลายตามที่ระบุไว้ในตาราง 5.1 เขย่ากระป๋องเล็กน้อยเพื่อให้ผิวหน้าของตัวอย่างข้าวเรียบเสมอกัน วางแผ่นพลาสติกคลุมใส่ที่ตัดเตรียมให้ขนาดพอดีกับขอบผนังด้านในของกระป๋องปิดทับด้านบนบนตัวอย่าง ปิดฝากระป๋องให้สนิท โดยใช้เทปกาวปิดทับรอยต่อระหว่างฝากับตัวกระป๋องให้สนิท เพื่อป้องกันน้ำระเหยเข้าออกจากภาชนะ ให้ความร้อนตัวอย่าง หลังจากเติมน้ำให้ทำการจับเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำกระป๋องอะลูมิเนียมที่ใส่ตัวอย่าง และปิดสนิทแล้วตั้งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่เตรียมไว้ ใช้เวลาเท่ากับเวลาในการหุงต้มตามตารางที่ 5.1 เมื่อครบเวลานำตัวอย่างข้าวออกจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ทำการพลิกกลับให้กลับกระป๋องกลับอยู่ด้านบนเพื่อกระจายความชื้นของตัวอย่างให้สม่ำเสมอ ไม่ให้เกิดการสะสมความชื้นที่ก้นกระป๋อง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปให้ความร้อนซ้ำในอ่างน้ำเดือดอีกครั้ง เป็นเวลา 7 นาที เนื่องจากในการหุงข้าวเพื่อวัดเนื้อสัมผัสมีการใส่ตัวอย่างครั้งละมาก ๆ ปริมาณความร้อนที่ตัวอย่างได้รับจะมีค่าน้อยกว่าในขั้นตอนการหาเวลาในการหุงข้าวที่หาได้ในตอนแรกจึงต้องเพิ่มเวลาในการให้ความร้อนเพื่อให้ตัวอย่างสุกพอดี และเมื่อครบเวลา นำตัวอย่างข้าวออกจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ พลิกให้ก้นกระป๋องกลับมายู่ด้านบนอีกครั้งแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งน้ำหนักตัวอย่างที่เย็นแล้วเพื่อตรวจสอบปริมาณความชื้น โดยกำหนดให้ปริมาณน้ำในตัวอย่างระเหยออกไปไม่เกินร้อยละ 5

อัดตัวอย่างข้าวในกระป๋องด้วยแรงคงที่ขนาด 500 กรัม ให้ได้ระยะความสูงของทุกตัวอย่าง เท่ากับระดับความสูงของข้าวใหม่ที่หุงสุกแล้ว โดยทำการวัดระยะความสูงจากด้านล่าง

กระป๋องขึ้นสู่ด้านบนกระป๋องมีค่าประมาณ 2 เซนติเมตร เมื่ออัดตัวอย่างเสร็จทุกครั้ง นำตัวอย่างที่อัดได้ระยะความสูงแล้วไปชั่งตัวอย่างอีกครั้ง โดยน้ำหนักที่ชั่งได้ควรมีค่าใกล้เคียงน้ำหนักเดิมหลังหุงสุก เพื่อให้แน่ใจว่าน้ำจากตัวอย่างระเหยออกจากในปริมาณน้อย

ตารางที่ 5.1 ปริมาณตัวอย่าง น้ำ และเวลาที่ใช้ในการหุงข้าว

Treatment samples	Sample weight (g)	Cooking water (ml)	Soaking time (s)	Cooking time (s)
Fresh rice	20	30	10	21
Aged rice 1 y	20	36	10	22

5.3.3 การวัดเนื้อสัมผัสข้าวสุก

วัดเนื้อสัมผัสด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (ยี่ห้อ Texture analyzer รุ่น TA-XTplus ประเทศสหราชอาณาจักร) ที่มี load cell เท่ากับ 50 กิโลกรัม โดยนำตัวอย่างข้าวสุกที่เตรียมได้ตามวิธีการในบทที่ 3 ข้อ 3.3.9.3 มาวัดเนื้อสัมผัสแบบคอมเพลสชัน (compression) โดยใช้หัววัดทรงกระบอก (cylinder probe) ขนาด 35 มิลลิเมตร ตั้งระดับความสูงเริ่มต้นของหัววัดกับฐาน เท่ากับ 50 มิลลิเมตร และตั้งค่า pretest speed 1 มิลลิเมตร / วินาที posttest speed 1 มิลลิเมตร / วินาที กำหนดระยะที่หัววัดกดอัดลงไปที่ผิวตัวอย่างที่ความลึก 1.2 เซนติเมตร ค่าที่วัดได้จะอยู่ในรูปของค่าแรง (force) ที่เกิดขึ้นระหว่างหัววัดกับตัวอย่างในหน่วยกรัม และรายงานผลเป็นค่าความแข็ง (hardness) และ ค่าการเกาะติดกันของเมล็ดข้าวสุก (stickiness)

5.3.4 คุณสมบัติการเกิดเพสท์ของแป้งในสารละลายรีดิวิซิงซ์ (Pasting properties)

คำนวณหาน้ำหนักตัวอย่าง และปริมาณสารละลายที่จะใช้ในการเตรียมตัวอย่าง คำนวณได้จากสูตรนี้

$$W = (25 + A - S)$$

$$S = \frac{(86 \times A)}{(25 + A - M)}$$

- เมื่อ S คือ น้ำหนักที่ปรับแล้ว (กรัม)
 A คือ น้ำหนักแบ่งที่ความชื้นร้อยละ 14 ในที่นี้คือ 3 กรัม
 M คือ ความชื้นของแป้งที่จะวัด (ร้อยละ)
 W คือ น้ำหนักของน้ำที่ปรับแล้ว (กรัม)

ทำการชั่งสารละลายยีสต์ยีสต์แต่ละชนิด ได้แก่ โซเดียมซัลไฟต์แอนไฮไดรต์, กรดแอสคอร์บิก และ ซิสทีน ที่ระดับ 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ และไดไทโอไธทอล (DTT) เพิ่มขึ้น 0.05 มิลลิโมลาร์ (คำนวณได้จากสูตร) ใส่ในกระบอกใส่ตัวอย่าง (RVA canister) จากนั้นชั่งตัวอย่างแป้งข้าวเจ้า น้ำหนักตามที่คำนวณได้จากสูตรใส่ลงในกระบอกใส่ตัวอย่างที่มีสารยีสต์ยีสต์ให้ได้น้ำหนัก แนนอนกระบอกละ 3 กรัม โดยทำการชั่งและวัดที่ละกระบอก กวนจนแป้งกับสารละลายยีสต์ยีสต์ ผสมเข้ากันดีด้วยใบกวนพลาสติก (plastic paddle) นำไปวัดความหนืด ด้วย ใช้เครื่องวิเคราะห์ความ หนืดแบบรวดเร็ว (RVA model 4, New port scientific, Australia) ใช้โปรแกรมการวัดแบบ standard1 คือ สารละลายแป้งจะถูกกวนผสมอย่างรวดเร็วที่ 10 วินาทีแรกด้วยความเร็ว 960 รอบต่อ นาที จากนั้นลดความเร็วมาที่ 160 รอบต่อนาทีจนกระทั่งตลอดการวัด โดยสารละลายจะถูกให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มระดับอุณหภูมิ จาก 50 เป็น 95 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 12.2 องศาเซลเซียสต่อนาที ในเวลา 3 นาที 42 วินาที (นาทีที่ 4.42) คง อุณหภูมิไว้ที่ระดับ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที 30 วินาที (นาทีที่ 7.12) ก่อนที่จะลดอุณหภูมิลงไปที่ 50 องศาเซลเซียสซึ่งใช้เวลา 3 นาที 48 วินาที (นาทีที่ 11) คงอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียสเป็น เวลา 1 นาที ใช้เวลาในการวัดตัวอย่างเท่ากับ 13 นาที ผลความหนืดแสดงในหน่วย อาร์วียู (RVU) รายงานเป็นค่า peak viscosity, though, final viscosity, pasting temperature และ peak time ค่า setback และ breakdown คำนวณโดย setback = peak viscosity – final viscosity และ breakdown = peak viscosity – though

5.3.5 การเตรียมตัวอย่างข้าวเจ้าที่ปรับปรุงคุณภาพด้วยสารยีสต์ยีสต์

พิจารณาเลือกสารยีสต์ยีสต์ ที่ให้คุณลักษณะการเกิดเพสท์ตัวอย่างข้าวเจ้าเปลี่ยนแปลงใกล้เคียง กับฟลาร์ข้าวใหม่มากที่สุดมา 1 ชนิดจาก 3 ชนิด ในที่นี้คือ โซเดียมซัลไฟต์แอนไฮไดรต์ ศึกษาผลที่ เกิดขึ้นจากการใช้สารยีสต์ยีสต์ต่อลักษณะโปรตีนก่อนการให้ความร้อน โดยมีการเตรียมตัวอย่าง ด้วยวิธีการแช่และอบตัวอย่าง โดยเตรียมขวดรูปหมูปูขนาด 600 มิลลิลิตร 5 ใบใส่สารละลายโซเดียมซัลไฟต์ เพิ่มขึ้น 0, 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ และไดไทโอไธทอลเพิ่มขึ้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยฟิล์มพลาสติกโดยเจาะรูขนาดเล็กให้ทั่วบริเวณไว้ (เพื่อลดแรงดันของ

โอน้ำขณะแช่ตัวอย่าง) นำไปตั้งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อปรับให้อุณหภูมิของสารละลายมีค่าเท่ากับอุณหภูมิของน้ำในอ่าง จากนั้นชั่งข้าวสารน้ำหนัก 250 กรัม เทใส่ในขวดรูปชมพู่เขย่าให้ตัวอย่างกระจายสม่ำเสมอแล้วปิดฝาขวดอีกครั้งด้วยแผ่นฟิล์มพลาสติก ตั้งรอบการเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที ใช้เวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเทตัวอย่างบนตะแกรงรูเล็ก เพื่อสกัดน้ำออกจากตัวอย่าง และใช้น้ำชะสารละลายส่วนเกินออกโดยให้น้ำไหลผ่านตัวอย่างขณะอยู่บนตะแกรงเป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เมล็ดข้าวสารสะเด็ดน้ำ เทเมล็ดข้าวใส่ภาชนะคลุมนิยมนที่ปูรองไว้ด้วยกระดาษทิชชู เปลี่ยนให้เมล็ดข้าวกระจายสม่ำเสมอทั่วภาชนะ ให้ได้ความหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร และปิดทับตัวอย่างด้วยกระดาษทิชชู นำไปอบไล่ความชื้นด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยทำการพลิกกลับตัวอย่างทุกๆ 30 นาที นำตัวอย่างที่ไล่น้ำออกแล้วใส่ถุงซิฟพลาสติก จากนั้นนำตัวอย่างประมาณ 50 กรัมนำไปบดด้วยเครื่องบดตัวอย่างที่ควบคุมอุณหภูมิตัวอย่างได้ 15 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลา 8 รอบนาที จากนั้นนำแบ่งที่บดแล้วมาผ่านตะแกรงร่อน เลือกแบ่งที่มีขนาดอนุภาค ≤ 125 ไมโครเมตร เก็บใส่ถุงพลาสติกใสเพื่อรอการวิเคราะห์คุณสมบัติการเกิดเพสต์ตามวิธีในข้อ 5.3.4 และศึกษาในหัวข้อที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนต่อไป

5.3.6 การเตรียมสารละลายโปรตีนสกัด

การสกัดโปรตีนจากข้าวที่แช่สารรีดิวซิงซ์ นำตัวอย่างแบ่งที่เตรียมได้จากข้อ 5.3.5 มาชั่งน้ำหนัก 250 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร ปั่นผสมให้เข้ากัน เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ใช้ความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 xg เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งไป ละลายตะกอนแบ่งด้วยน้ำกลั่น 30 มิลลิเมตร เขย่าและปั่นเหวี่ยงตามซ้ำทั้งหมด 6 รอบ นำตะกอนแบ่งที่ล้างสารรีดิวซิงซ์ออกไปแล้วมาสกัดโปรตีนโดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่มีโซเดียมโคเคซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 240 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 xg เวลา 15 นาที ถ่ายสารละลายส่วนใสลงในหลอดปั่นเหวี่ยงหลอดใหม่ นำไปวิเคราะห์ต่อไป

5.3.7 การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE)

ตามวิธีการของ Laemmli (1970) โดยนำตัวอย่างโปรตีนสกัดจากข้อ 5.3.6 ที่ทราบความเข้มข้นแล้ว (วิเคราะห์ตามวิธีการ lowry ในภาคผนวก ก.) ผสมกับทริตเมนด์บัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วยทริส-ไฮโดรคลอริก (Tris-HCl) เข้มข้น 0.125 โมลาร์ (พีเอช 6.8) ที่มี SDS เข้มข้นร้อยละ 4 กลีเซอรอล (glycerol) เข้มข้นร้อยละ 20 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยปริมาณของโปรตีนสกัดที่ใช้คือ 25 ไมโครกรัม โหลดสารละลายโปรตีนที่ผสมกับทริตเมนด์บัฟเฟอร์แล้วที่ด้านบนของแผ่นเจลตามช่องที่เตรียมไว้ ตัวอย่างที่ผสมทริตเมนด์บัฟเฟอร์ที่เบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล เข้มข้นร้อยละ 10 ก่อนโหลดโปรตีนจะต้องนำไปให้ความร้อนที่ 99 ± 1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 นาที เช่นเดียวกับโปรตีนมาตรฐาน (standard protein marker) ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ในเจลรันนิ่ง (running gel) มีค่าเท่ากับร้อยละ 12.5 และ 15 และเจลสแตคกิ้ง (stacking gel) มีค่าเท่ากับร้อยละ 4 โดยให้กระแสไฟความต่างศักย์เท่ากับ 120 โวลต์ ย้อมสีตัวอย่างด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย 1.25 กรัม comassie blue R-250 และล้างสีย้อมด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 กับกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 และใช้ standard protein marker สำหรับเปรียบเทียบ molecular weight

5.3.8 การวิเคราะห์ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของโปรตีน (Surface hydrophobicity)

ดัดแปลงจากวิธีการของ Paraman 2007 และ Kato and Nakai (1980) คูณสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากข้อ 5.3.6 ใส่หลอดทดลองขนาดเล็กให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 และ 0.3 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเติมสารละลายคาร์บอนเนต ไบคาร์บอนเนตบัฟเฟอร์ (พีเอช 10) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.0, 1.9, 1.85, 1.80, 1.75 และ 1.70 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย 1-anilino-8-naphthene sulfonate (ANS) (พีเอช 7.0) ที่เข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในทุกหลอด ผสมให้เข้ากันภายในเวลา 5 วินาที ตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการเรืองแสงของตัวอย่างด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ (ยี่ห้อ Shimadzu, โมเดล RF-1501, ประเทศญี่ปุ่น) เลือกวัดค่าตัวอย่างสารละลายในโหมดโลเซนซิวิตี (low sensitivity) โดยกำหนดความกว้างของสลิต (slit) ที่ 10 มิลลิเมตร รายงานค่าปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิก (surface hydrophobicity, S_0) ของตัวอย่าง ได้จากค่าความชัน (ε) ของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มของการเรืองแสง (fluorescence intensity) (แกน y) ของตัวอย่างกับความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (แกน x) จากสมการ

$$A = \varepsilon bc$$

- เมื่อ A คือ ค่าความเข้มของการเรืองแสง (fluorescence intensity; FI)
 b คือ path length มีค่าเท่ากับ 1
 c คือ ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน

โดยในกรณีตัวอย่างที่เป็นฟลาร์ว

$$\text{Fluorescence Intensity (Net_FI)} = FI_{\text{sample}} - FI_{\text{blank1}}$$

ในกรณีตัวอย่างที่เป็นฟลาร์วข้าวสุก

$$\text{Fluorescence Intensity (Net_FI)} = FI_{\text{sample}} - FI_{\text{blank1}} - FI_{\text{blank2}}$$

- เมื่อ FI_{sample} คือ ค่าการเรืองแสงที่วัดได้จากตัวอย่างที่เติม ANS
 FI_{blank1} คือค่าการเรืองแสงของสารละลายที่มีตัวอย่าง (blank 1)
 FI_{blank2} คือ ค่าการเรืองแสงของตัวอย่างที่ไม่เติม ANS (blank 2)

5.3.9 การวิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล (Total SH) และ ฟังก์ชันไดซัลไฟด์ (SS)

5.3.9.1. การวิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลไฮดริลทั้งหมด (Total SH)

ปริมาณ Total SH วิเคราะห์ได้โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่าง Ellman's reagent (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) หรือ DTNB) กับกลุ่มไธออล (thiol group; SH) ของโปรตีน ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Mine (1997) โดยนำตัวอย่างโปรตีนสกัด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับ สารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยทริส-ไฮโดรคลอริก (Tris-HCl) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 8.0 ที่มีเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก (ethylenediaminetetracetic acid; EDTA) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ ยูเรีย เข้มข้น 8 โมลาร์ (0.5 M Tris-HCl, 10 M EDTA, 8 M urea; pH 8) ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ผสมบัฟเฟอร์แล้วปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก เติมสารละลาย DTNB เข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร (DTNB เข้มข้นร้อยละ 0.1 ในโซเดียมไดเฟสเฟต(NaH_2PO_4)เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์) นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที เตรียมตัวอย่าง blank โดยใช้น้ำกลั่น ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ 4.5 มิลลิลิตร แทนสารละลายโปรตีนสกัด ดูดสารละลายผสมของ blank ที่เตรียมได้ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DTNB เข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี วิสซิเบล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer) โดยทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ปริมาณ total SH จำนวนได้โดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (extinction coefficient) เท่ากับ $13600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ จำนวนจากสมการ

$$\mu\text{mol SH/g} = 73.53A_{412} (D/C)$$

เมื่อ A_{412} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 นาโนเมตร

C คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างในหน่วย มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

D คือ dilution factor ซึ่งเท่ากับ 10

5.3.9.2. การวิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล และหมู่ไดซัลไฟด์ (Total SH + SS)

การวัดปริมาณของ Total SH+SS ตามวิธีการของ Thannhauser และคณะ (1984) โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของ 2-ไนโตร-5-ไธโอซัลโฟเบ็นโซเอต (2-nitro-5-thiosulfobenzoate ; NTSB) กับสารละลายโปรตีน ในสภาวะที่มีหมู่ซัลไฟด์ (SO_3^-) โดยนำสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (ที่ทราบความเข้มข้นโดยวิธี lowry) ผสมกับสารละลายทริสไฮโดรคลอริก บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 4.5 มิลลิเมตร (พีเอช 9.5) ที่ประกอบด้วย ยูเรียเข้มข้น 8 โมลาร์ EDTA เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ โซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (8 M Urea 10 mM EDTA 100 mM Na_2SO_3 pH 9.5) ผสมสารละลายผสมปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติมน้ำ NTSB ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 นาที เตรียมตัวอย่าง blank โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 500 ไมโครลิตรแทนโปรตีนสกัด วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 นาโนเมตร ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ จำนวนค่า Total SH + SS ด้วยวิธีการในข้อ 4.3.7 ข้อย่อยที่ 1 ส่วนพันธะไดซัลไฟด์ จำนวนโดยนำค่า Total SH ไปหักลบจากค่า Total SH + SS

5.3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

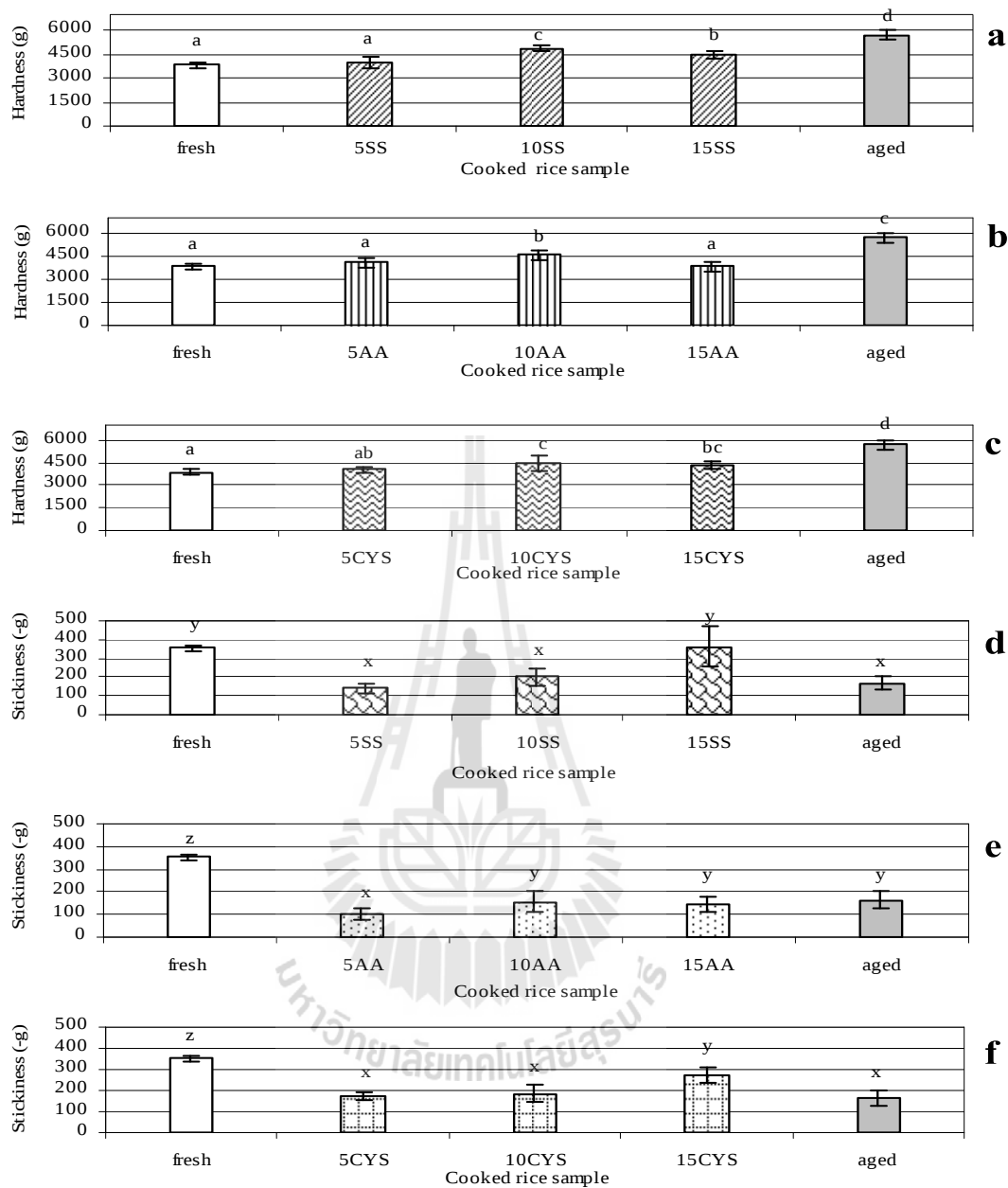
วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design: CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ทางแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 14.0

5.4 ผลการทดลอง และวิจารณ์

5.4.1 ผลของสารละลายรีดิวซิงซ์ต่อเนื้อสัมผัสข้าวสุก

ข้าวเก่าที่หุงด้วยสารละลายรีดิวซิงซ์ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ โซเดียมซัลไฟท์ (SS) กรดแอสคอร์บิก (AA) และซิสทีอีน (CYS) ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น คือ 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 5.1a-c) มีความนุ่มเพิ่มขึ้นซึ่งสังเกตได้จากค่าความแข็ง (hardness) ที่ลดลง ($p < 0.05$) ตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ สอดคล้องกับการศึกษาในข้าวเก่าพันธุ์อะคิตะโกมาจิ (Akitakomachi) เก็บอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ 2 และ 5 เดือน ที่หุงด้วยสารละลายโซเดียมซัลไฟท์เข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ (Ohno and Ohisa, 2005; Ohno, Tomatsu, Toeda and Ohisa, 2007) และข้าวพันธุ์ Sang Tarom ที่หุงด้วยสารละลายกรดอะซิติก และ กรดแลกติกเข้มข้น 0.05 โมลาร์ จะให้ลักษณะข้าวสุกที่มีความนุ่ม และเมล็ดข้าวเกาะตัวกันดีขึ้น (Ghasemi, Mosavian and Khodaparast, 2008) ความนุ่มที่เกิดขึ้นในข้าวเก่าเป็นผลจากการที่กลุ่มโปรตีนขนาดใหญ่ซึ่งเกาะกลุ่มกันอยู่ด้วยพันธะไดซัลไฟด์แตกออกเป็นโมเลกุลขนาดเล็ก (Ohno et al, 2007) โดยโปรตีนข้าวเก่าที่อยู่ในเอนโดสเปิร์มจะมีการกระจายตัวเป็นลักษณะตาข่าย (network of proteins) ล้อมรอบเม็ดสตาร์ชไว้ ด้วยกลุ่มโปรตีนที่เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ จึงเกิดขัดขวางการพองตัว และการเจลลิ่งในซังของสตาร์ช โดยในระหว่างให้ความร้อนในสภาวะที่มีน้ำโปรตีนจะคลายตัว และรวมตัวกับสตาร์ช (starch-protein complex) เป็นเหมือนตาข่ายขนาดใหญ่ และแข็งแรงโอบอุ้มโมเลกุลของน้ำและสตาร์ชไว้ สารรีดิวซิงซ์ได้เข้าตัดบริเวณพันธะไดซัลไฟด์ซึ่งเป็นจุดเชื่อมโมเลกุลโปรตีนดังกล่าวเข้าไว้ด้วยกัน ให้โครงสร้างตาข่าย (network linked) โปรตีนถูกทำลาย (Xie, Chen, Duan, Zhu and Liao, 2008) สตาร์ชสามารถดูดน้ำ และพองตัวได้ดี เป็นผลทำให้ความแข็งของข้าวเก่าลดลง (Saleh and Meullenet, 2007) สารรีดิวซิงซ์ทั้ง 3 ชนิด ทำให้โปรตีนที่เปลี่ยนแปลงรูปร่าง (denature) จากการออกซิเดชันซึ่งเกิดขึ้นภายหลังการเก็บ กลับคืนสภาพเดิม (recovered) (Benjakul, Thongkaew and Visessanguan, 2005) โดยเมื่อเปรียบเทียบผลของระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ต่างกันต่อประสิทธิภาพสารรีดิวซิงซ์ พบว่าประสิทธิภาพในการลดความแข็งในข้าวสุกของโซเดียมซัลไฟท์ และกรดแอสคอร์บิกจะลดลงเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นขึ้นเป็น 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ แต่ค่าความแข็งของข้าวเก่าสุกที่หุงด้วยสารรีดิวซิงซ์ทั้ง 2 ระดับก็ยังลดต่ำกว่าข้าวเก่าที่หุงด้วยน้ำปกติ ($p < 0.05$)

เมื่อพิจารณาค่าการเกาะกันของเมล็ดข้าวเก่าสุก ที่หุงด้วยสารละลายทั้ง 3 ชนิด (ภาพที่ 5.1d-f) พบว่าการหุงข้าวด้วยสารละลายรีดิวซิงซ์ทั้ง 3 ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลต่อค่าการเกาะกันของเมล็ดข้าวเก่าสุก ($p > 0.05$) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมซัลไฟท์และซิสทีอีนเป็น 15 มิลลิโมลาร์ ค่าการเกาะกันของเมล็ดข้าวสุกจะเพิ่มสูงขึ้น (ภาพที่ 5.1d และ 5.1f)



ภาพที่ 5.1 ค่าความแข็ง (a-c) และ ค่าการเกาะตัวกัน(d-f) ของข้าวสุกใหม่ (fresh) เก่า (aged) ที่หุงด้วย น้ำ และข้าวสุกเก่าที่หุงด้วย โซเดียมซัลไฟท์ (SS) กรดแอสคอร์บิก (AA) และ ซิสทีอิน (CYS) ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

แสดงให้เห็นว่า จะต้องใช้ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมซัลไฟท์ และซิสทีอินที่ 15 มิลลิโมลาร์ จึงมีผลในการเพิ่มทั้งความนุ่ม และค่าการเกาะกันของเมล็ดข้าวเก่าสุกให้ใกล้เคียงกับข้าวใหม่ได้ จากผลการทดลองอธิบายได้ว่า ค่าการเกาะกันของเมล็ดข้าวสุกเพิ่มขึ้นจากการที่พันธะ

ไคซัลไฟด์ของโปรตีนถูกทำลาย โปรตีนที่มีหน่วยย่อยจึงแตกออก ทำให้เมล็ดstarfish ด้เต็มที่เกิดลักษณะเจลที่มีความเหนียวส่งผลให้เมล็ดข้าวสุกเกาะตัวกันได้ดีขึ้น ทั้งนี้ไม่พบการเพิ่มขึ้นของการเกาะตัวของเมล็ดข้าวเก่าสุกหุงด้วยสารละลายกรดแอสคอร์บิก (ภาพที่ 5.1e) แต่กลับพบว่าเมล็ดข้าวสุกเกาะกันได้น้อยลงในข้าวเก่าที่หุงด้วยสารละลายกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากค่าพีเอชที่ต่ำของสารละลายกรดแอสคอร์บิก (พีเอช 3.07-3.30) ในตารางที่ 5.2 ที่มีผลทำลายโครงสร้างของโปรตีนไม่เพียงแต่ทำลายพันธะไคซัลไฟด์ ที่เชื่อมระหว่างหน่วยย่อยของโปรตีนที่เกิดขึ้นภายหลังเท่านั้นและอาจมีผลในการย่อยโครงสร้างของstarfish ทำให้ไม่สามารถเกิดเจลที่มีความเหนียว และยืดหยุ่นได้ จึงให้ผลลักษณะความนุ่มที่เพิ่มขึ้นเพียงอย่างเดียวเท่านั้น จากการศึกษาของ Ohishi, Kasai, Shimada และ Hatae (2003) ที่ใช้สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (พีเอช 2.7) แช่ข้าวพันธุ์ Nipponbare ที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะให้ลักษณะเนื้อสัมผัสของข้าวที่นุ่มเหนียวกว่าตัวอย่างที่แช่น้ำปกติ ซึ่งเป็นผลจากการที่โปรตีน และstarfish ถูกย่อยให้มีขนาดเล็กลง ทำให้ผิวของเมล็ดข้าวด้านนอกดูดซับน้ำ และพองตัวได้มากขึ้น จึงเกิดลักษณะเจลที่อ่อนนุ่มได้ จากความแตกต่างของเนื้อสัมผัสที่เกิดขึ้นแสดงว่า สารละลายทั้ง 3 ชนิดมีประสิทธิภาพการทำงานที่ต่างกัน โดยสารละลายโซเดียมซัลไฟท์ มีประสิทธิภาพในการปรับเปลี่ยนเนื้อสัมผัสของข้าวเก่าให้มีค่าใกล้เคียงกับข้าวใหม่มากที่สุด ($p < 0.05$)

สารละลายรีดิวซิงทั้ง 3 ชนิดจะมีค่าพีเอชต่างจากพีเอชของน้ำกลั่นแสดงดังตารางที่ 5.1 โดยสารละลายโซเดียมซัลไฟท์มีค่าพีเอชเป็นด่าง (9.46-9.63) สารละลายกรดแอสคอร์บิกมีค่าพีเอชเป็นกรด (3.07-3.15) และสารละลายซีสทีนมีค่าพีเอชเป็นกรดอ่อน (5.34-5.59) จากค่าพีเอชของสารละลายที่แตกต่างจากค่าพีเอชน้ำ เช่นนั้นค่าพีเอชจึงอาจมีส่วนทำให้เนื้อสัมผัสข้าวสุกเปลี่ยนแปลงไปเมื่อหุงด้วยสารละลายรีดิวซิงทั้ง 3 ชนิด จึงทำการศึกษาผลของพีเอชสารละลายต่อเนื้อสัมผัสข้าวต่อไป

5.4.2 ผลของพีเอชในสารละลายรีดิวซิงต่อคุณลักษณะเนื้อสัมผัสของข้าวเก่า

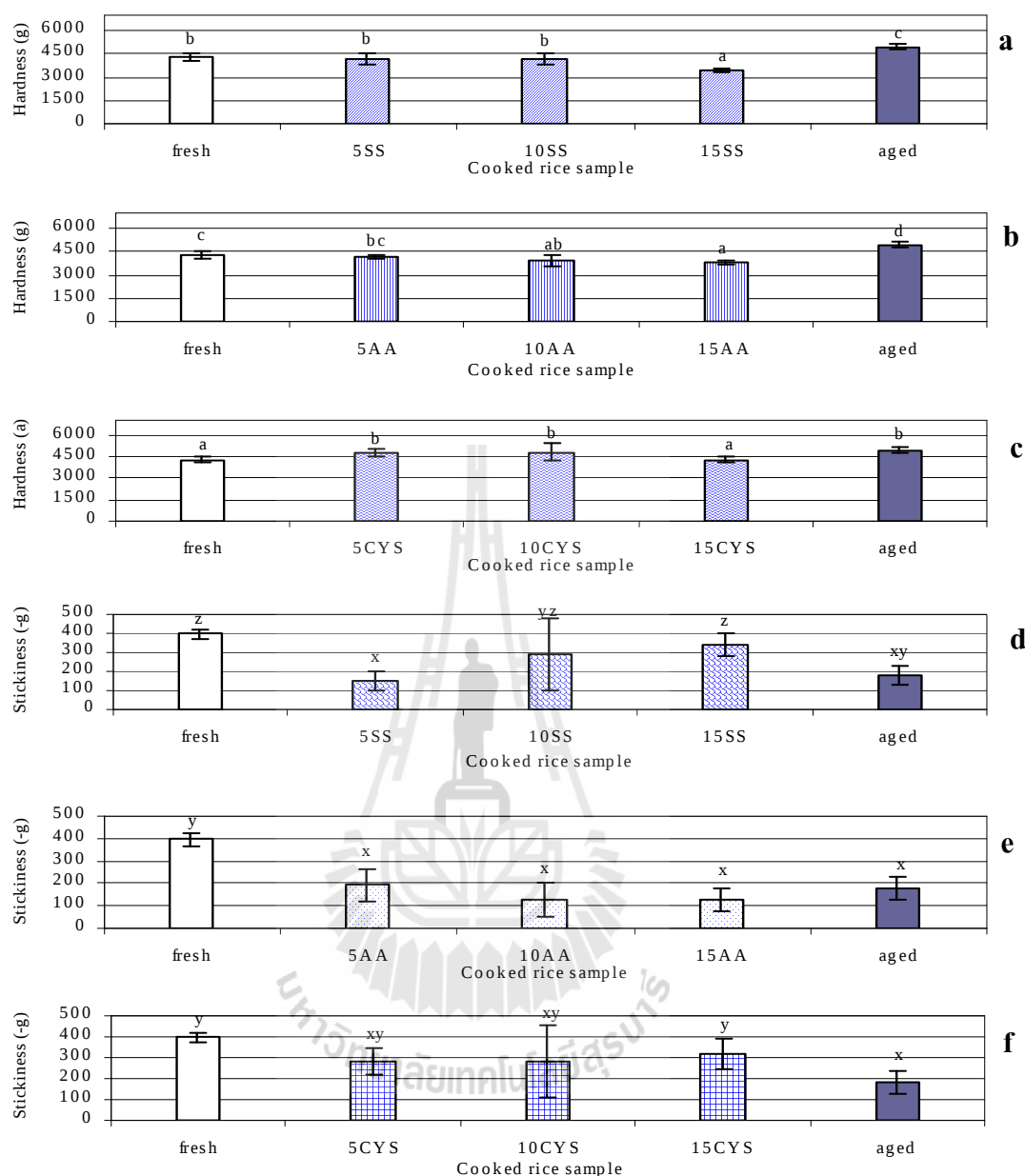
ลักษณะเนื้อสัมผัสของข้าวที่หุงด้วยสารละลายรีดิวซิงที่ควบคุมพีเอชด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ดังแสดง ในภาพที่ 5.2a-f ตามลำดับ โดยพีเอชของสารรีดิวซิงจะถูกควบคุมให้เท่ากันน้ำกลั่นด้วยระบบบัฟเฟอร์มีค่าอยู่ในช่วง 6.4-7.20 (ตารางที่ 5.2) จะเห็นได้ว่าความแข็งของข้าวสุกยังคงลดลงเช่นกันแม้จะอยู่ในสถานะที่ใช้บัฟเฟอร์ควบคุมพีเอช (ภาพที่ 5.2a และ 5.2b) โดยในตัวอย่างที่ใช้โซเดียมซัลไฟท์ และกรดแอสคอร์บิก ตั้งแต่ที่ 5 มิลลิโมลาร์ แสดงว่าสารทั้งสองชนิดนี้ยังมีผลในการลดค่าความแข็งของข้าวสุกอยู่ขณะที่ซีสทีนเมื่ออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์สามารถลดค่าความแข็งของเมล็ดข้าวสุกที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 5.2c) แสดงว่าพีเอชมีผลต่อประสิทธิภาพของซีสทีนด้วย

ตารางที่ 5.2 พีเอชของรีดิวซิงซ์ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำกลั่น และฟอสเฟตบัฟเฟอร์

Reducing agents	Concentration (mM)	pH value	
		distilled water	phosphate buffer
Sodium sulfite	5	9.46 ± 0.01	7.04±0.01
	10	9.51 ± 0.00	7.24±0.31
	15	9.63 ± 0.01	7.16±0.01
Ascorbic acid	5	3.30 ± 0.01	6.85±0.01
	10	3.15 ± 0.01	6.61±0.01
	15	3.07 ± 0.01	6.42±0.01
Cysteine	5	5.59 ± 0.01	7.00±0.01
	10	5.38 ± 0.03	6.95±0.01
	15	5.34 ± 0.01	6.97±0.01

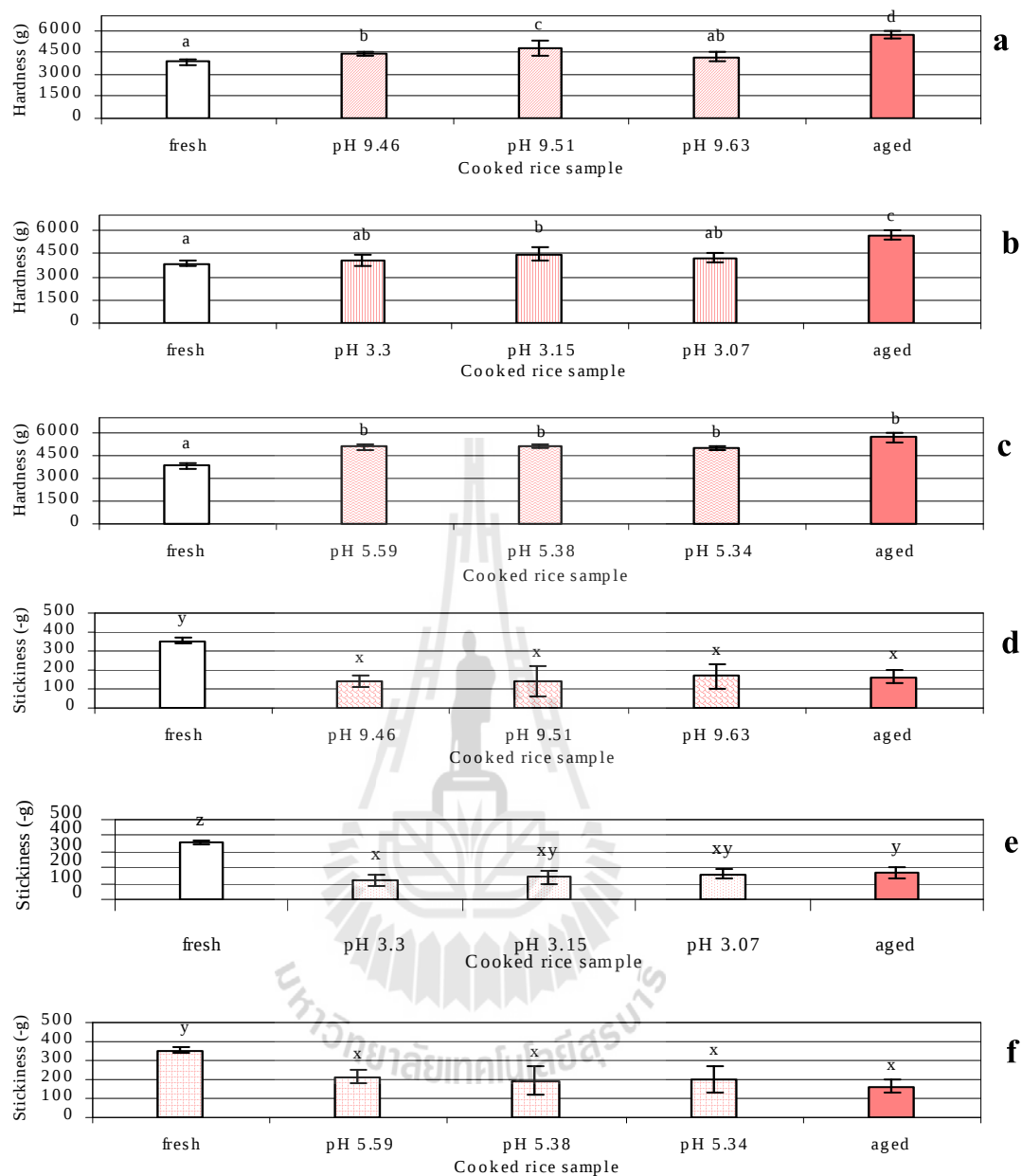
เพราะเมื่อถูกควบคุมพีเอชประสิทธิภาพการลดความเข้มของข้าวเก่าสุกก็จะลดลงไปด้วย อย่างไรก็ตามไม่พบการเปลี่ยนแปลงค่าการเกาะตัวกันของเมล็ดข้าวเก่าสุกที่หุงด้วย สารละลายกรดแอสคอร์บิกในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ภาพที่ 5.2e) ซึ่งต่างจากข้าวเก่าที่หุงด้วยสารละลายโซเดียมซัลไฟต์และซีสทีนในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ 15 มิลลิโมลาร์จะมีค่าการเกาะตัวกันของเมล็ดข้าวสุกเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 5.2d และ 5.2f) จึงแสดงให้เห็นว่าค่าพีเอชของสารละลายโซเดียมซัลไฟต์และซีสทีนไม่มีผลต่อการเพิ่มค่าการเกาะตัวกันของเมล็ดข้าวเก่าสุก ค่าพีเอชของกรดแอสคอร์บิกให้ผลในการลดค่าความเข้มของข้าวแต่ไม่เพิ่มค่าการเกาะกันของเมล็ดเช่นเดียวกับที่พบในภาพที่ 5.1e

เมื่อพิจารณาภาพที่ 5.3a-c จะพบว่าการปรับพีเอชของน้ำที่ใช้หุงข้าวให้มีค่าเท่ากับพีเอชของสารรีดิวซิงซ์ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มของข้าวสุก โดยความเข้มของข้าวสุกที่หุงด้วยน้ำกลั่นที่ปรับพีเอชให้เป็นด่าง(9.5-9.6) และกรด (3.1-3.3) มีค่าความเข้มลดลง ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับข้าวที่หุงด้วยน้ำปกติ โดยกรดจะเข้าทำลายโครงสร้างของโปรตีน โดยมีผลทำให้การละลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น จากการที่โปรตีนซึ่งล้อมรอบเมล็ดสตาร์ช และขัดขวางการดูดน้ำของสตาร์ชที่บริเวณผิวหน้าเมล็ดข้าวบางส่วนหลุดออก หรือถูกทำลายไป จึงเกิดช่องว่างให้น้ำและความร้อนผ่านเข้าสู่ด้านในเมล็ดสตาร์ชได้มาก ทำให้การดูดซับน้ำของเมล็ดสตาร์ชเกิดได้ง่ายขึ้น (Ghasemi et al, 2008) เม็ดสตาร์ชมีการพอง และแตกตัวได้ดี สามารถรวมตัวกับโปรตีน และกักเก็บน้ำไว้ในโครงสร้างได้ดีเกิดเจลที่มีความหนานุ่มบริเวณผิวหน้าของเมล็ดข้าวสุก จึงให้ลักษณะของข้าวสุกที่นุ่ม



ภาพที่ 5.2 ค่าความแข็ง (a-c) และ ค่าการเกาะตัวกัน (d-f) ของข้าวสุกใหม่ (fresh) เก่า (aged) ที่หุงด้วยสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และข้าวสุกเก่าที่หุงด้วย โซเดียมซัลไฟท์ในฟอสเฟตบัพเฟอร์ (SS) กรดแอสคอร์บิกในฟอสเฟตบัพเฟอร์ (AA) และ ซิสทีอินในฟอสเฟตบัพเฟอร์(CYS) ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

ทั้งนี้ไม่พบเปลี่ยนแปลงค่าความแข็งของข้าวสุกที่หุงด้วยน้ำกลั่นปรับพีเอชอยู่ในช่วง 5.3-5.6 นอกจากนี้ ข้าวสุกที่หุงด้วยน้ำกลั่นปรับพีเอชเลียนแบบพีเอชของสารรีดิวซิงซ์ทั้ง 3 (ภาพที่ 5.3d, 5.3e และ 5.3f) ไม่พบการเกาะตัวกันเพิ่มขึ้นในเมล็ดข้าวเก่า ดังนั้นสารรีดิวซิงซ์จึงมีคุณสมบัติใน



ภาพที่ 5.3 ค่าความแข็ง (a-c) และ ค่าการเกาะตัวกัน (d-e) ของข้าวสุกใหม่ (fresh) เก่า (aged) และข้าวสุกเก่าที่หุงด้วยน้ำกลั่นที่มีค่าพีเอชเลียนแบบพีเอชของสารละลายรีดิวซิงซ์

การเปลี่ยนแปลงค่าเนื้อสัมผัสของข้าวเก่า โดยลดความแข็งขณะเดียวกันก็เพิ่มการเกาะตัวกันของเมล็ดข้าวสุกด้วยโดยค่าพีเอชของสารละลายที่เป็นกรดหรือด่างนั้น มีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของสารรีดิวซิงซ์ในการลดค่าความแข็งของข้าวสุกได้ แต่ไม่มีผลในการเพิ่มการเกาะติดกันของเมล็ดข้าวสุก

นอกจากนี้ยังพบว่าบัพเฟอร์ที่ใช้มีผลต่อเนื้อสัมผัสของข้าวได้ โดยข้าวเก่าที่นำไปหุงในฟอสเฟตบัพเฟอร์จะให้เนื้อสัมผัสด้านความแข็งของข้าวสุกลดลง ขณะที่ค่าการเกาะกันของเมล็ดข้าวสุกเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$)

ในกรณีของข้าวใหม่ที่ถูกหุงด้วยสารละลายบัพเฟอร์นั้น พบว่ามีค่าความแข็งมีค่าความแข็งมากกว่าข้าวใหม่ที่ถูกหุงด้วยน้ำปกติ และน้ำกลั่นที่ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับพีเอชของสารรีดิวซิงส์ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับผลของ Moritaka และ Nakamura (2005) ที่ทดลองนำข้าวญี่ปุ่น 3 พันธุ์ คือ Koshihikari, Yukinosei และ Akihikari นำมาหุงด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ หรือ แคลเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ผลการวัดเนื้อสัมผัสพบว่าจะต้องใช้แรงกดตัวอย่างมากกว่าเมื่อเทียบกับข้าวที่ถูกหุงด้วยน้ำกลั่นปกติ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณการดูดน้ำของเมล็ดข้าวสุกที่ลดลงในตัวอย่างข้าวทั้ง 3 พันธุ์ที่ถูกหุงด้วยสารละลายเกลือ Moritaka และ Nakamura พบการขยายตัวของเมล็ดข้าวหลังได้รับความร้อนลดลงเหมือนกันในเกลือทั้ง 2 ชนิด แสดงให้เห็นว่าไอออนของเกลือในบัพเฟอร์มีผลต่อการเพิ่มความแข็งของข้าวสุก ซึ่งเป็นผลจากการเชื่อมกัน (cross-linking) ระหว่างผนังเซลล์ (cell walls) ของเมล็ดข้าวกับไอออนของเกลือ (salt bridge) และ electrostatic interaction ระหว่างสายพอลิเมอร์ของสตาร์ช (polysaccharide) และ โปรตีนที่อยู่รอบ ๆ โดยไอออนเกลือจะเข้าจับกับโปรตีนที่อยู่รอบ ๆ เม็ดสตาร์ชทั่วบริเวณเมล็ดข้าว โดยเฉพาะที่ผิวนอก เกิดเป็นโครงสร้างที่อัดตัวกันแน่นมีช่องว่างน้อย จึงลดการซึมผ่านและกักเก็บน้ำไว้ในโครงสร้าง ส่งผลให้ความนุ่มลดลง (Moritaka and Nakamura, 2005) ในข้าวใหม่

แต่ในกรณีค่าความแข็งที่ลดลงของข้าวเก่าที่ถูกหุงด้วยฟอสเฟตบัพเฟอร์นั้น อาจเกิดจากไอออนของเกลือมีส่วนจับกับน้ำได้ดี จึงทำให้มีน้ำอยู่ภายในโครงสร้างเม็ดสตาร์ชมากกว่าปกติ การพองตัวจึงเพิ่มขึ้น เกิดเจลาติไนซ์ได้มากขึ้น ทำให้ความแข็งของข้าวลดลงได้ และพบว่าการเกาะติดของเมล็ดข้าวสุกเพิ่มขึ้นทั้งข้าวใหม่ และเก่าที่ถูกหุงด้วยบัพเฟอร์ ($p < 0.05$) โดยในกรณีข้าวใหม่อาจเกิดจากโครงสร้างที่แน่นหนาของเมล็ดข้าวสุกที่เกิดขึ้นทำให้เกาะกับหัววัดได้ดีกว่าปกติ ขณะที่ข้าวเก่าจะมีไอออนของเกลือคอยจับน้ำเข้าไปในโครงสร้างเจลาได้มากขึ้นจึงเกิดชั้นเจลที่นุ่มขึ้น และเกาะกับหัววัดได้ดีขึ้นเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าไอออนของเกลือในสารละลายบัพเฟอร์ที่ใช้ มีผลการเปลี่ยนแปลงค่าเนื้อสัมผัสของได้ทั้งข้าวเก่าและใหม่

5.4.3 ผลของใช้สารรีดิวซิงส์ต่อคุณสมบัติการเกิดเพสท์ของฟลาร์ว

คุณสมบัติการเกิดเพสท์ของฟลาร์วที่เตรียมจากข้าวเก่าเกิดการเปลี่ยนแปลงได้เมื่อใช้สารละลายรีดิวซิงส์ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ โซเดียมซัลไฟท์ กรดแอสคอร์บิก และซิสทีอีน เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์เป็นตัวแทนละลาย โดยเปรียบเทียบผลที่ได้กับฟลาร์วจากข้าวใหม่ และข้าวเก่าที่ไม่มีสารรีดิวซิงส์ (ตารางที่ 5.3) พบการเพิ่มขึ้นของค่าความหนืดสูงสุด (peak viscosity, PV) และ เบรคดาวน์ (breakdown, BD) และค่าความหนืดสุดท้าย (final viscosity, FV) และ เซทบาค (setback, SB) ที่ลดลงในทุกตัวอย่างที่ใช้สารละลายรีดิวซิงส์ ($p < 0.05$) บ่งชี้ว่าเมล็ดสตาร์ชสามารถพอง และแตกตัวมากขึ้น และยังคงถึงการคืนตัวของแป้งหลังเย็นตัวมีค่าลดลง เกิดลักษณะเจลแป้งที่มีความนุ่มและยืดหยุ่นเพิ่มขึ้น ผลดังกล่าวสอดคล้องกับที่พบในฟลาร์วที่เตรียมจากข้าวเก่าพันธุ์ Koshihikari, Kyeema และ Doongara เก็บที่ 37 องศาเซลเซียส 16 เดือน โดยภายหลังผสมกับ เบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล ซึ่งเป็นสารรีดิวซิงส์ชนิดหนึ่ง (Zhou, Robards, Helliwell and Blanchard, 2003) และ ข้าวพันธุ์ (Motti) ที่แช่กรดแลกติก และ โซเดียมไบซัลไฟต์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 3 และ ร้อยละ 7 (Neves, Pereira, Zavareze, Dias and Elias, 2010) ก็พบค่า PV และ BD ที่เพิ่มขึ้นได้เช่นเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเริ่มต้น ซึ่งความหนืดที่เพิ่มขึ้นนี้เป็นผลมาจากการตัดพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีนโดยสารรีดิวซิงส์ เมื่อไม่มีกลุ่มโปรตีนที่เกาะตัวกันเป็นโครงสร้างตาข่ายล้อมรอบเมล็ดสตาร์ชไว้แล้ว เม็ดสตาร์ชจึงพองตัวได้ดีขึ้น และมีระดับการเจลาติไนซ์ที่เพิ่มขึ้น (Hamaker and Griffin, 1993) กรณีการปรับพีเอชน้ำเพื่อให้เท่ากับสารรีดิวซิงส์ทั้ง 3 ชนิดพีเอชนั้น พบการเปลี่ยนแปลงได้เฉพาะน้ำพีเอชให้เป็นกรดเท่ากับพีเอชของสารละลายกรดแอสคอร์บิก ($p < 0.05$) (ตารางที่ 5.4) มีผลทำให้ค่า PV ของฟลาร์วข้าวเก่ามีค่าลดลงได้เช่นเดียวกับที่พบในตัวอย่างฟลาร์วจากข้าวพันธุ์ Dongmi จะมีการลดลงของค่า PV, FV และ SB ในตัวอย่างที่เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล ซึ่งมีค่า พีเอช 4.10 โดยเปรียบเทียบกับฟลาร์วที่เติมน้ำปกติ (พีเอช 6.20) (Wang, Sun, Zeng and Lu, 2000) แสดงให้เห็นว่าค่าพีเอชที่ต่ำก็มีผลทำให้การคืนตัวของเจล (retrogradation) มีแนวโน้มลดลง โดย Wang และคณะ (2000) ให้เหตุผลว่าอาจเกิดจากโมเลกุลของสตาร์ชมีขนาดเล็ก (short-chain starch molecules) อันเป็นผลของการถูกย่อยจากกรดที่ใช้ เมื่อสตาร์ชที่อยู่ในสารละลายกรดได้รับความร้อน กรดจากสารละลายจะแทรกเข้าไปตามช่องเปิด (intermicellar areas) ของเม็ดสตาร์ช และเข้าย่อยที่โมเลกุลของสตาร์ชที่บริเวณพันธะกลูโคซิดิก (glucosidic linkages) ในส่วนของอสัญฐาน (amorphous) ทำให้โครงสร้างภายในของเม็ดสตาร์ชอ่อนตัวลง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิของสารละลายกรดจนสตาร์ชเกิดการเจลาติไนซ์ เม็ดสตาร์ชจำนวนมากจะแตกสลาย และปลดปล่อยอะไมโลสสายสั้นที่ถูกย่อยด้วยกรดให้ละลายออกมามาก ทำให้ความหนืดของเพสท์ลดลงได้มากขึ้น (Leach and Schoch, 1962) เมื่อส่วนอะไมโลสขนาดเล็กรวมทั้งส่วนที่ถูกย่อยนี้อาจกลับมารวมตัวกัน เกิดเป็นตาข่าย สามมิติที่ไม่แข็งแรงเจล

ตารางที่ 5.3 คุณสมบัติการเกิดเพสท์ของฟลาร์วในรีควิงซ์เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์

Rice flour	RVA value				
	Pasting Temp (°C)	Peak viscosity (RVU)	Breakdown (RVU)	Final viscosity (RVU)	Setback (RVU)
FF	89.43±0.46	101.31±1.63e	40.58±1.10d	125.50±2.96b	64.78±1.54b
AF	91.07±0.49	81.59±0.38a	18.64±1.03a	135.61±1.69c	72.66±0.38c
AF+5SS	89.38±1.26	93.50±1.40d	31.02±3.35c	108.92±2.57a	46.44±0.47a
AF+5AA	89.15±0.91	90.42 ±0.17c	29.31±0.34bc	126.44±0.27b	65.33±0.51b
AF+5CYS	89.57±1.01	85.17±1.58b	26.94±0.71b	122.69±2.70b	64.47±0.65b

ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันตามแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
 FF หมายถึง ตัวอย่างแป้งข้าวใหม่ที่ผสมกับน้ำกลั่น, AF หมายถึง ตัวอย่างแป้งข้าวเก่าที่ผสมกับน้ำกลั่น, 5SS หมายถึง โซเดียมซัลไฟท์เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์, 5AA หมายถึง กรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ และ 5CYS หมายถึง ซิสทีอินแอสิดเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์

ตารางที่ 5.4 คุณสมบัติการเกิดเพสท์ของฟลาร์วในที่ใช้ น้ำกลั่นปรับพีเอชเลียนแบบสารรีควิงซ์

Rice flour	RVA value				
	Pasting Temp (°C)	Peak viscosity (RVU)	Breakdown (RVU)	Final viscosity (RVU)	Setback (RVU)
FF	89.43±0.46	101.31±1.63c	40.58±1.10b	125.50±2.96a	64.78±1.54a
AF	91.07±0.49	81.59±0.38b	18.64±1.03a	135.61±1.69bc	72.66±0.38bc
AF+DI _{pH 9.46}	90.53±0.83	81.59±1.76b	18.78±1.47a	136.72±4.06c	74.08±0.88c
AF+DI _{pH 3.30}	90.48±0.83	79.19±0.13a	18.08±0.55a	131.50±1.42b	70.39±1.11b
AF+DI _{pH 5.59}	90.23±0.51	80.81±0.71ab	19.39±0.85a	133.64±2.09bc	72.22±3.12bc

ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันตามแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
 FF หมายถึง แป้งข้าวใหม่ผสมน้ำกลั่น, AF หมายถึง แป้งข้าวเก่าผสมน้ำกลั่น, DI_{pH 9.46} หมายถึง น้ำกลั่นที่พีเอชเดียวกับโซเดียมซัลไฟท์ 5 มิลลิโมลาร์, 5AA DI_{pH 3.30} หมายถึง น้ำกลั่นที่พีเอชเดียวกับกรดแอสคอร์บิก 5 มิลลิโมลาร์และ AF+DI_{pH 5.59} หมายถึง น้ำกลั่นที่พีเอชเดียวกับซิสทีอิน 5 มิลลิโมลาร์

ตารางที่ 5.5 คุณสมบัติการเกิดเพสท์ของฟลาร์วในสารรีดิวซ์เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ในสารละลาย
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

Rice flour	RVA value				
	Pasting	Peak	Breakdown	Final viscosity	Setback
	Temp	viscosity	(RVU)	(RVU)	(RVU)
	(°C)	(RVU)			
FF+P	92.08±0.06b	126.86±2.24d	35.25±3.17c	162.53±1.93d	70.92±3.93bc
AF+P	92.95±0.00b	101.06±0.68b	20.36±4.00ab	155.69±0.98c	75.00±3.73bc
AF+5SS+P	92.98±0.83b	103.20±1.68bc	26.70±6.38b	148.16±1.70b	71.67±7.36c
AF+5AA+P	90.47±1.40a	105.89±2.46c	21.67±5.05ab	147.94±4.21b	63.72 ±6.15ab
AF+5LC+P	92.72±0.45b	89.16±0.88a	15.67±2.29a	132.11±2.26a	58.61±1.56a

ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันตามแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
FF หมายถึง ตัวอย่างแป้งข้าวใหม่ที่เหมาะกับน้ำกลั่น, AF หมายถึง ตัวอย่างแป้งข้าวเก่าที่เหมาะกับน้ำกลั่น, P หมายถึง ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, 5SS หมายถึง โซเดียมซัลไฟต์เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์, 5AA หมายถึง กรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ และ 5CYS หมายถึง ซิสทีนเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์

ที่ได้จึงอ่อนนุ่มลง แสดงให้เห็นว่าการที่ข้าวเก่านุ่มขึ้นเมื่อหุงด้วยสารละลายกรดแอสคอร์บิกทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นนั้นนอกจากจะเป็นผลจากการที่พันธะไดซัลไฟด์ถูกทำลายลง จากคุณสมบัติของสารรีดิวซ์เองแล้ว ยังเกี่ยวข้องกับฟิโอะที่ต่ำของสารละลายเอง โดยทำให้โปรตีน และสตาร์ชส่วนหนึ่งถูกย่อย (acid hydrolysis) ให้เล็กลง (Short-chain starch molecules) (Ghasemi et al, 2008) สำหรับตัวอย่าง ฟลาร์วข้าวเก่าที่ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย ไม่พบการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการเกิดเพสท์ในฟลาร์วข้าว ที่ใช้น้ำปรับฟิโอะให้เท่ากับฟิโอะของสารละลายซิสทีน (ฟิโอะ 5.59) และ โซเดียมซัลไฟต์ (ฟิโอะ 9.46) ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์

ผลของสารรีดิวซ์ทั้ง 3 ชนิดที่มีต่อคุณสมบัติการเกิดเพสท์ของตัวอย่างแป้งข้าวเก่าในสภาวะที่มีบัฟเฟอร์ แสดงดังตารางที่ 5.5 โดยมีการเพิ่มขึ้นของค่า PV และการลดลงของค่า FV และค่า SB ของตัวอย่าง ฟลาร์วที่ใช้สารละลายรีดิวซ์บางชนิด โดยพบว่าตัวอย่างฟลาร์วที่ใช้สารละลายซิสทีนในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นตัวทำละลาย จะแสดงคุณสมบัติ การเกิดเพสท์ลดลงเกือบทุกค่า ซึ่งให้ผลแตกต่างจากสภาวะที่ไม่มีบัฟเฟอร์ในตารางที่ 5.3 นอกจากนี้คุณสมบัติการ

เกิดเพสท์ในตัวอย่างฟลาร์วข้าวใหม่ และข้าวเก่าที่ใช้สารละลายบัพเฟอร์ เป็นตัวทำละลายในตารางที่ 5.5 ต่างจากที่วัดได้ในตัวอย่างที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย (ตารางที่ 5.3 และ 5.4) ($p < 0.05$) โดยสารละลายบัพเฟอร์ที่ใช้ทำให้ค่า PV, FV, SB, รวมทั้ง PT สูงขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากหมู่ฟอสเฟตเอสเทอร์ (phosphate ester groups) ที่อยู่ในสารละลายฟอสเฟตที่จะเข้าผลึกและขัดขวาง (repulsion) การรวมตัวของโมเลกุลของน้ำ กับโมเลกุลสตาร์ช (Craig, Maingat, Seib and Hosney, 1989)

การใช้สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์มาควบคุมค่าพีเอชของสารรีดิวซิงซ์ ส่งผลทำให้สารรีดิวซิงซ์ทำหน้าที่ได้น้อยลง หรือลดประสิทธิภาพลง เนื่องจากอยู่ในสภาวะพีเอชที่ไม่เหมาะสม สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Elkhalfi, Chandrashekar, Mohamed และ Tinay (1999) ที่วัดการเกิดเพสท์ในฟลาร์วข้าวฟางเมื่อปรับค่าพีเอชของสารละลายกรดแอสคอร์บิก และซีสทีน มีค่าพีเอชเปลี่ยนไปจากปกติคือ 4.5 ไปที่ 7.0 มีผลทำให้ค่า SB ของตัวอย่างมีค่าเพิ่มขึ้น

5.4.4 การปรับปรุงคุณภาพข้าวเก่าด้วยการแช่สารรีดิวซิงซ์

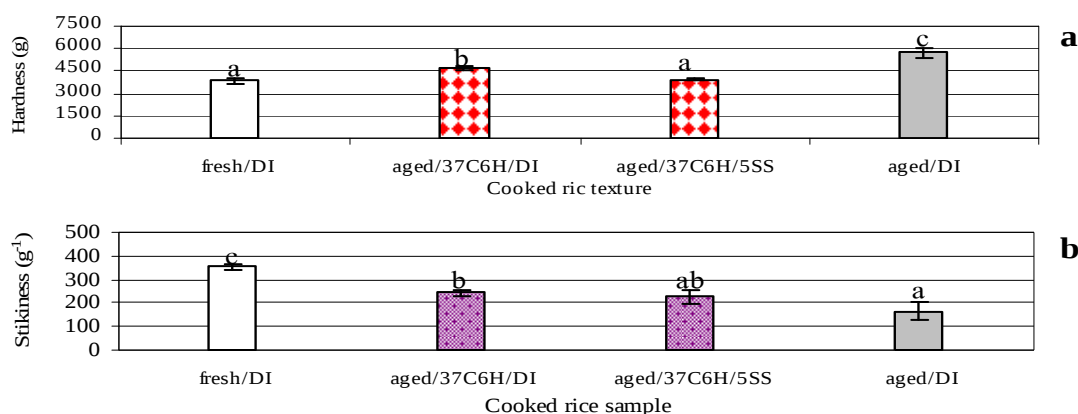
จากผลเนื้อสัมผัสข้าวเก่าที่หุงด้วยสารละลายรีดิวซิงซ์ (ภาพที่ 5.1) และคุณสมบัติการเกิดเพสท์ (ตารางที่ 5.3) ทำให้ทราบว่าจากสารรีดิวซิงซ์ทั้ง 3 ชนิดที่ศึกษามาแล้วนั้น โซเดียมซัลไฟต์เป็นสารรีดิวซิงซ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดความแข็ง และเพิ่มความเกาะติดของเมล็ดข้าว รวมทั้งทำให้คุณสมบัติการเกิดเพสท์ในฟลาร์วข้าวเก่าเปลี่ยนไปสู่ข้าวใหม่ได้ จึงเลือกโซเดียมซัลไฟต์นำมาศึกษาต่อในส่วนของการปรับปรุงวิธีการใช้สารรีดิวซิงซ์ให้เหมาะสม ในข้าวแทนการใช้ในรูปสารละลายสำหรับหุงข้าว โดยอาศัยน้ำเป็นตัวนำสารรีดิวซิงซ์เข้าสู่เมล็ดข้าวด้วยการใช้วิธีแช่ แล้วกำจัดน้ำออกโดยใช้วิธีการอบ เพื่อให้ได้ข้าวเก่าที่พร้อมนำไปหุงบริโภคได้โดยไม่ต้องเตรียมสารรีดิวซิงซ์ในรูปสารละลาย โดยใช้สภาวะการแช่ที่เหมาะสมคือที่ 37 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง ($p < 0.05$) (ตารางที่ 8 ในภาคผนวก) แสดงในตารางที่ 5.6 เป็นสภาวะที่ข้าวอัมตั่วด้วยน้ำเต็มที่ เวลาที่ใช้แช่ตัวอย่างนี้ต่างกับผลการทดลองของ Han และ Lim (2009) ทดลองแช่ข้าวกล้องญี่ปุ่น (Japonica-type brown rice) ที่อุณหภูมิต่างกันสองอุณหภูมิ คือ 25 และ 50 องศาเซลเซียส จะใช้เวลา 8 ชั่วโมง การซึมผ่านของน้ำสู่เมล็ดข้าวทั้ง 2 อุณหภูมิจึงคงที่ ขณะที่ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นข้าวที่ผ่านการขัดสีแล้วดังนั้นเวลาในการแช่ตัวอย่างข้าวสารจึงเร็วกว่า

จากการศึกษาการแช่ตัวอย่างด้วยโซเดียมซัลไฟต์ ที่ 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ และ DTT แสดงผลดังตารางที่ 5.6 พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของค่า PV และ BD ได้ลักษณะของเจลที่มีความนุ่มขึ้น นอกจากนี้อุณหภูมิในการเกิดเพสท์ PT ของตัวอย่างที่ผ่านการแช่ก็มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับผลจากฟลาร์วข้าวใหม่ และเก่าที่ไม่ผ่านการแช่จากตารางที่ 5.3 แสดงถึงการเกิดเจลลาติไนซ์ได้ ที่อุณหภูมิต่ำลง โดยการใช้สารรีดิวซิงซ์น่าจะมีผลทำให้เม็ดแป้งพอง และแตกตัวได้ดีขึ้น เมื่อได้รับความร้อน

ตารางที่ 5.6 คุณสมบัติการเกิดเพสท์ในฟลาร์ว์ที่เตรียมจากข้าวแช่สารรีดิวซิงซ์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 6 ชั่วโมง

RVA value	Treatment samples					
	FF/DI	AF/DI	AF/5SS	AF/10SS	AF/15SS	AF/DTT
Peak viscosity (RVU)	101.31±1.63d	89.28±0.09b	95.50±0.66c	83.47±2.21a	90.42±1.34b	103.17±1.25d
Trough (RVU)	60.72±2.66b	62.44±0.57bc	61.39±0.46b	53.86±1.83a	56.65±3.30a	65.89±1.42c
Breakdown (RVU)	40.58±1.10e	26.83±0.55a	34.11±0.26c	28.95±0.41b	33.75±1.98c	37.28±1.26d
Final Viscosity (RVU)	125.50±2.96d	115.53±0.81c	110.30±1.04b	97.81±1.57a	100.70±3.89a	107.86±1.27b
Setback (RVU)	64.78±1.54e	53.08±0.25d	48.92±0.75c	43.95±0.29b	44.03±0.65b	41.97±0.38a
Peak Time (min)	6.04±0.10a	6.11±0.03a	6.09±0.08a	6.11±0.08a	6.07±0.14a	6.27±0.00a
Pasting Temperature (°C)	89.43±0.46bc	89.95±0.48c	87.77±1.25ba	87.28±1.37a	86.67±1.30a	86.95±1.28a

ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันตามแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p < 0.05$), FF/DI หมายถึง ตัวอย่างแป้งข้าวใหม่ที่ไม่แช่ AF/DI หมายถึง ตัวอย่างแป้งข้าวเก่าที่ผ่านการแช่น้ำที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 6 ชั่วโมง, 5SS-15SS หมายถึง โซเดียมซัลไฟท์ที่ระดับความเข้มข้น 5-15 มิลลิโมลาร์ DTT คือ ไดไทโอไธทอล ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 5.4 ค่าความแข็ง (a) และ ความเหนียว (b) ของข้าวสุกใหม่ (fresh/DI) เก่า(aged/DI) ที่หุงด้วยน้ำกลั่น ข้าวสุกเก่าที่แช่ด้วยน้ำกลั่น 37 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง (aged/37C6H/DI) และ ข้าวสุกเก่าที่แช่ด้วยสารรีดิวซิงซ์ 37 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง (aged/37C6H/5SS)

(Harmaker and Griffin, 1993) ทั้งนี้เกิดจากเมื่อพันธะไดซัลไฟด์ที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลโปรตีน และขัดขวางการพองตัวของสตาร์ชถูกทำลายลง ทำให้เม็ดสตาร์ชพองตัวง่ายขึ้น และเกิดเจลลิตในเซชันได้ง่ายขึ้น เมื่อได้รับแรงเฉือนจากการกวนจึงทำให้เม็ดสตาร์ชแตกตัวง่ายกว่าสตาร์ชที่แช่ด้วยน้ำกลั่นปกติเช่นเดียวกับที่พบในฟลารัวจากกลุ่มข้าวพันธุ์ Zhongzheyou1, Koshihikari, Fengliangyou3GET, HTRD-12, Tong03-4060, Liangyoupeijiu, BoIIIyou 169, Zhongzao25 และ Ilyou 26 เมื่อใช้ DTT เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์แทนน้ำกลั่น ทำให้ค่า PV และ BD เพิ่มขึ้น (Xie et al. 2008)จากผลการทดลองพบว่า DTT ทำให้คุณสมบัติการเกิดเพสท์ในข้าวเก่าใกล้เคียงกับข้าวใหม่มากที่สุดตามด้วยโซเดียมซัลไฟท์ ที่ระดับ 5 มิลลิโมลาร์ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก DTT มีความเป็นสารรีดิวซิงซ์ที่แรงกว่า (Tsen, 1969) จึงสามารถตัดพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีนได้มากกว่า จึงมีผลต่อสมบัติการเกิดเพสท์ในข้าวมากกว่าได้

เมื่อนำเมล็ดข้าวเก่าที่ผ่านการแช่โซเดียมซัลไฟท์มาตรวจวัดเนื้อสัมผัส พบว่าค่าความแข็งของตัวอย่างข้าวเก่าลดลง (ภาพที่ 5.4a) นอกจากนี้การใช้น้ำกลั่นแช่ตัวอย่างก็มีผลทำให้ความแข็งที่มีในข้าวเก่าลงได้เช่นกัน การแช่ข้าวเก่ายังมีผลทำให้ค่าการเกาะติดกันของเมล็ดข้าวสุกนั้นเพิ่มขึ้นได้ทั้ง สภาวะที่มีโซเดียมซัลไฟท์ และการใช้น้ำกลั่นปกติที่ไม่มีโซเดียมซัลไฟท์ ทั้งนี้อาจเกิดจากผลการแช่ตัวอย่างทำให้สตาร์ชบางส่วนคูดน้ำ และพองตัวขึ้น เมื่อไถ่น้ำที่เมล็ดข้าวคูดซบไว้ให้ระเหยออกไปจากเม็ดข้าว จึงเกิดช่องว่างที่ผิวของเม็ดข้าว เมื่อนำมาหุงให้ความร้อนอีกครั้ง ทำให้น้ำแทรกเข้าไปในเม็ดข้าวได้ดีขึ้นจากช่องว่างที่เกิดขึ้น ทำให้เกิดความนุ่มของข้าวสุกได้ ซึ่งเป็นผลจากการพองตัวและคูดซบน้ำที่ดีขึ้น ทำให้สายอะไมโลสหลุดออกมาได้เยอะ สตาร์ชจึงเกิดเจลลิตในเซชัน

ได้ง่าย และการมีน้ำในโครงสร้างเจลมาก ทำให้เจลมีความนุ่มและเหนียวขึ้นได้

5.4.5 ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล (SH) และไดซัลไฟด์ (SS)

จากการวัดปริมาณหมู่ซัลไฮดริลของโปรตีนสกัด ที่ได้เตรียมจากข้าวเก่าที่ผ่านการแช่ด้วย สารรีดิวซิงซ์ ระดับความเข้มข้น 5-15 มิลลิโมลาร์ และ DTT เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์มีปริมาณสูงขึ้น ($p < 0.05$) (ตารางที่ 5.7) สอดคล้องกับหมู่ไดซัลไฟด์ที่มีปริมาณลดลง ซึ่งอธิบายได้ว่าเกิดจาก พันธะไดซัลไฟด์ ที่เชื่อมระหว่างหมู่ซัลไฮดริลของโมเลกุลโปรตีนถูกทำลายลง ด้วยปฏิกิริยารีดักชัน ของโซเดียมซัลไฟท์ และ DTT ทำให้ปริมาณหมู่ซัลไฮดริลเพิ่มขึ้น และในขณะเดียวกันปริมาณหมู่ ไดซัลไฟด์ก็มีค่าลดลง ทั้งนี้ DTT ซึ่งเป็นสารรีดิวซิงซ์ที่มีประสิทธิภาพสูง (strong reducing agents) จึงสามารถทำลายหรือตัดพันธะไดซัลไฟด์ได้ดี ส่งผลให้ปริมาณหมู่ไดซัลไฟด์ในตัวอย่างลดลงมาก ที่สุด สอดคล้องกับปริมาณหมู่ซัลไฮดริลที่เพิ่มขึ้นสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมซัลไฟท์

ตารางที่ 5.7 ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล และไดซัลไฟด์ของตัวอย่างแป้งข้าวหลังผ่านการแช่ด้วย สารละลายรีดิวซิงซ์ ที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 6 ชั่วโมง

Sample	Total SH	SS	Alkaline extractable
	$\mu \text{ mol / g protein}$	$\mu \text{ mol / g protein}$	proteins (mg/ g sample)
AF/0SS	16 $\pm$ 3.0a	58 $\pm$ 3.2d	50 $\pm$ 3.5ab
AF/5SS	25 $\pm$ 2.3bc	46 $\pm$ 2.7b	52 $\pm$ 1.6b
AF/10SS	23 $\pm$ 0.6b	53 $\pm$ 2.6c	55 $\pm$ 1.5c
AF/15SS	26 $\pm$ 0.4c	48 $\pm$ 1.7b	53 $\pm$ 1.7ab
AF/5DTT	38 $\pm$ 0.6d	36 $\pm$ 0.7a	67 $\pm$ 1.9c

ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันตามแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) AF หมายถึง ตัวอย่างแป้งข้าวเก่า, SS หมายถึง สารละลายโซเดียมซัลไฟท์ที่ 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ และ DTT หมายถึง สารละลาย DTT ที่ 5 มิลลิโมลาร์

นอกจากนี้การเกิดขึ้นของพันธะไดซัลไฟด์มีผลทำให้การละลายของโปรตีนมีค่าลดลงได้ เนื่องจาก เป็นพันธะโควาเลนท์ทำให้โปรตีนมีความเสถียร ถูกย่อย (proteolysis) หรือทำลายได้ยาก (Takeuchi, Masui and Yamaguchi, 1999) จากผลการทดลองเมื่อพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีนถูกทำลายลง ด้วยสารรีดิวซิงซ์ จึงมีผลทำให้ความเสถียรของโปรตีนลดลง ปริมาณโปรตีนที่ละลายก็จะมีค่าเพิ่มขึ้น

เช่นผลของโปรตีนในข้าวแช่ DTT (ตารางที่ 5.7) ทั้งนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพในการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ของโซเดียมซัลไฟท์ที่ 5 และ 15 มิลลิโมลาร์ มีค่าใกล้เคียงกันโดยพิจารณาปริมาณหมู่ซัลไฮดริลที่เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกัน ขณะที่โซเดียมซัลไฟท์ที่ 10 มิลลิโมลาร์มีปริมาณหมู่ซัลไฮดริลที่ต่ำกว่า

5.4.6 ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิก

ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของโปรตีนสกัดที่ได้จากฟลาร์วข้าว ที่ผ่านการแช่ด้วยสารรีดิวซิงซ์ 2 ชนิดได้แก่ โซเดียมซัลไฟท์เข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ (5SS, 10SS และ 15SS) และไดไทโอไธทอลเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (5DTT) ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่สกัดได้จาก ฟลาร์วข้าวเก่าที่แช่ด้วยน้ำกลั่นปกติ (OSS) ที่อุณหภูมิและเวลาเดียวกัน (ตารางที่ 5.7)

ตารางที่ 5.8 ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของโปรตีนในตัวอย่างฟลาร์วข้าวที่ผ่านการแช่ด้วยโซเดียมซัลไฟท์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Treatment samples	Surface hydrophobicity (So)	Alkaline extractable protein (mg/g sample)
OSS	659±32	50±3.5ab
5SS	653±49	52±1.6b
10SS	703±11	55±1.5c
15SS	699±12	53±1.7ab
5DTT	666±46	67±1.9c

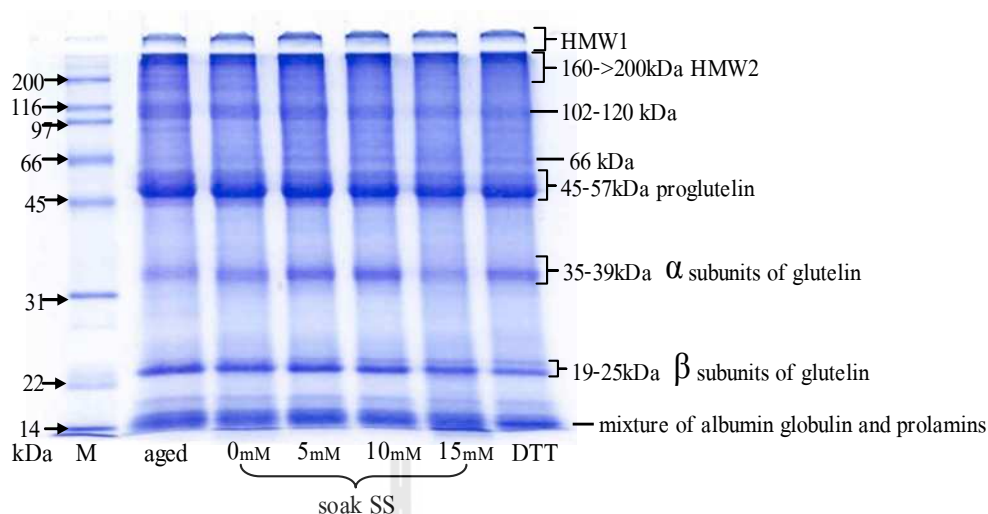
ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) SS หมายถึง สารละลายโซเดียมซัลไฟท์ที่ 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ และ DTT หมายถึง สารละลาย DTT

เมื่อพิจารณาค่าปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในบางตัวอย่างที่ใช้แช่โซเดียมซัลไฟท์และ DTT และปริมาณซัลไฮดริลอิสระที่เพิ่มขึ้นและปริมาณไดซัลไฟด์ที่ลดลงในทุกตัวอย่าง แสดงถึงโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างภายหลังจากการใช้สารรีดิวซิงซ์ แต่ค่าปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิก ที่วัดได้กลับมีค่าไม่ต่างกันอาจเกิดจาก ANS ซึ่งเป็นสารที่ใช้ทำปฏิกิริยากับโปรตีนถูกรบกวนจากประจุลบที่มีในหมู่ SO_3^- และ S^- ซึ่งเป็นประจุลบในโครงสร้างของสารรีดิวซิงซ์ในโซเดียมซัลไฟท์ และ DTT บางส่วนที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับโปรตีนเหลืออยู่ ในตัวอย่างที่ผ่านการ

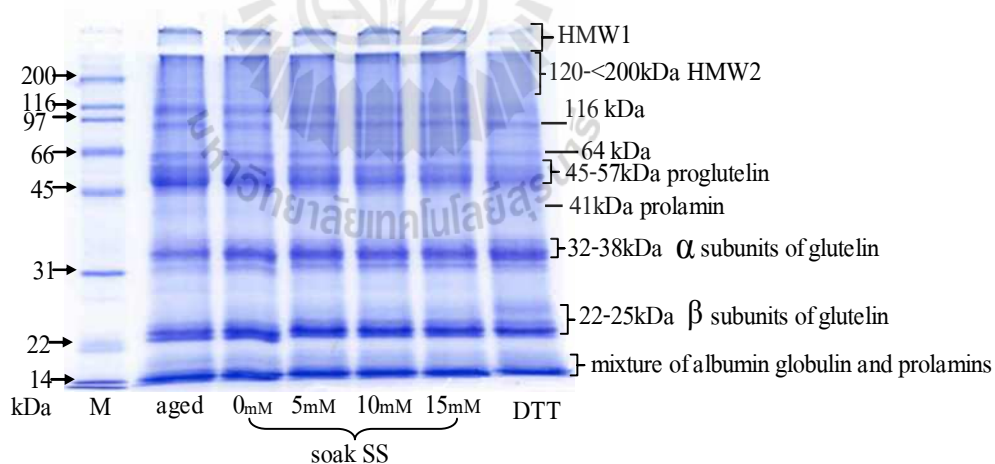
แซ่สารรีดิวซิงซ์ ประกอบกับการมีประจุลบของกรดอะมิโน แอสพาติก และกลูตามิก ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่พบมากในโปรตีนที่ได้จากข้าว (Houston, Allis and Kohler, 1969) เคลื่อนที่ภายนอกพร้อมกับการเปิดหรือคลายตัวของโมเลกุลโปรตีนอันเนื่องมาจากพันธะไดซัลไฟด์ ที่เชื่อมโมเลกุลของโปรตีนเข้าไว้ด้วยกันถูกทำลายลงไปได้ จากการใช้อิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยตัวเอง นอกจากนี้สภาวะทดลองที่ใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 10.0 นี้ทำให้กลุ่มคาร์บอกซิล (COOH) ของกรดอะมิโนดังกล่าวเกิดการแตกตัวไปเป็น COO⁻ ซึ่งทำให้ประจุลบในระบบเพิ่มขึ้น โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาของ Pasdar and Li-Chan ในปี 2000 ซึ่งทำการเปรียบเทียบค่าพื้ผิวไฮโดรโฟบิกของตัวอย่าง whey protein isolate, β -lactoglobulin และ bovine serum albumin ก่อนให้ความร้อนที่สภาวะพีเอชต่างกัน 3.0-9.0 โดยใช้ ANS พบว่าเมื่อค่า พีเอชในระบบเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ปริมาณพื้ผิวไฮโดรโฟบิกของตัวอย่างที่วัดได้มีค่าน้อยลงด้วย ซึ่งน่าจะเกิดจาก ANS เข้าจับกับกรดอะมิโนในกลุ่มที่ไม่มีประจุได้ยาก เพราะโครงสร้างของ ANS เองจะประกอบด้วยซัลโฟเนตไอออนที่มีประจุลบอยู่ด้วย ประสิทธิภาพการทำงานของ ANS จึงลดลง อาจเป็นเหตุให้ปริมาณพื้ผิวไฮโดรโฟบิกที่วัดได้จากตัวน้อยกว่าความเป็นจริง

5.4.7 การศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE)

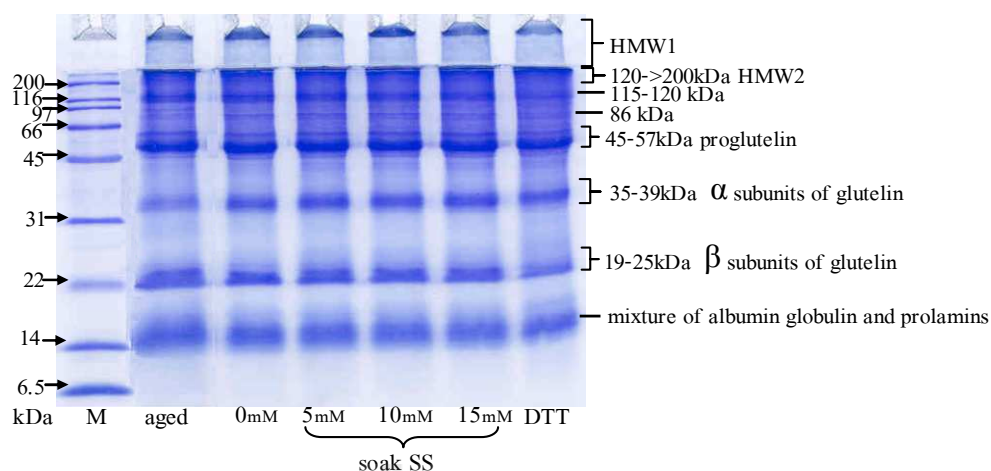
จากการวิเคราะห์ตัวอย่างโปรตีนสกัด เปรียบเทียบระหว่างโปรตีนที่สกัดจากข้าวเก่าก่อนและหลังการแซ่สารรีดิวซิงซ์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 5.5 จะพบการลดลงของความเข้มของแถบโปรตีนกลูติลิน และโปรตีนโมเลกุลใหญ่ที่มีขนาดในช่วง 102-120 และ 160->200 กิโลดาลตัน ขณะที่โปรตีนขนาดเล็กได้แก่หน่วยย่อยเบต้า และแอลฟา-กลูติลินมีความเข้มของแถบโปรตีนเพิ่มขึ้นในตัวอย่างทั้ง 3 ที่ผ่านการแซ่ด้วยโซเดียมซัลไฟท์ (5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์) และไดไทโอไธทอลเข้มข้น แสดงให้เห็นว่าโปรตีนขนาดใหญ่ที่เคยจับตัวกันอยู่นั้นเกิดการแยกออกจากกันเป็นโปรตีนขนาดเล็ก เนื่องจากพันธะไดซัลไฟด์ที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของโปรตีนซึ่งเพิ่มขึ้นในข้าวเก่าถูกทำลายด้วยสารรีดิวซิงซ์ทั้ง 2 ชนิด สอดคล้องกับปริมาณหมู่ไดซัลไฟด์ที่ลดลงในตารางที่ 5.6 เมื่อโปรตีนขนาดใหญ่ ถูกรีดิวซ์ให้มีขนาดเล็กลงเหมือนก่อนเริ่มต้นการเก็บรักษา ทำให้สภาวะการคูดน้ำ การพองตัว และเกิดเจลลิตในเซชันได้ดีขึ้น ส่งผลให้คุณลักษณะการเกิดเพสท์ และเนื้อสัมผัสบางอย่างของข้าวเปลี่ยนไปเหมือน หรือใกล้เคียงกับข้าวใหม่ก่อนเริ่มเก็บรักษา โดยแถบโปรตีนขนาดใหญ่มีความเข้มลดลงอย่างมากในตัวอย่างที่แซ่ด้วย DTT แสดงว่า DTT มีประสิทธิภาพสูงกว่าโซเดียมซัลไฟท์ สอดคล้องกับค่าปริมาณหมู่ไดซัลไฟด์ที่ลดลง และคุณสมบัติการเกิดเพสท์ของข้าวที่เปลี่ยนแปลงไปมากกว่าฟลาร์วี่ที่แซ่โซเดียมซัลไฟท์ สำหรับโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายต่างร่วมกับ โซเดียมโดดีซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 1 (ภาพที่ 5.6) พบว่า



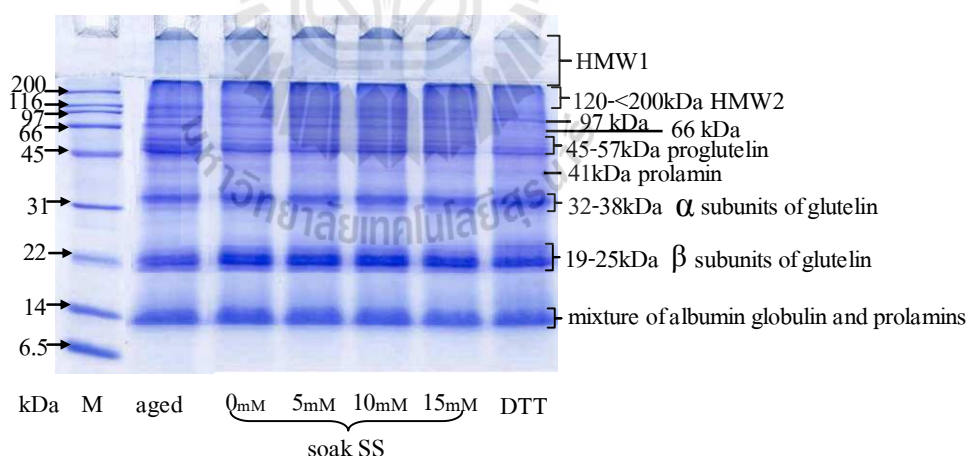
ภาพที่ 5.5 ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 เก่า (aged) ที่แช่ด้วยโซเดียมซัลไฟต์ (SS) เพิ่มขึ้น 0, 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ และ ไดไทโอไธทอล เพิ่มขึ้น 5 มิลลิโมลาร์ (DTT) สกัดด้วยสารละลาย NaOH เพิ่มขึ้น 10 มิลลิโมลาร์ ใช้ปริมาณอะครีลาไมด์ร้อยละ 12.5 โดยแถบ M (lane M) แสดงโปรตีนมาตรฐาน



ภาพที่ 5.6 ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 เก่า (aged) ที่แช่ด้วยโซเดียมซัลไฟต์ (SS) เพิ่มขึ้น 0, 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ และ ไดไทโอไธทอลเพิ่มขึ้น 5 มิลลิโมลาร์ (DTT) สกัดด้วยสารละลาย NaOH เพิ่มขึ้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ประกอบด้วยสารละลาย SDS เพิ่มขึ้นร้อยละ 1 ใช้ปริมาณอะครีลาไมด์ร้อยละ 12.5 โดยแถบ M (lane M) แสดงโปรตีนมาตรฐาน



ภาพที่ 5.7 ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 เก่า (aged) และข้าวเก่าที่แช่ด้วยโซเดียมซัลไฟต์ (SS) เพิ่มขึ้น 0, 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ และไโทโอริทอลเพิ่มขึ้น 5 มิลลิโมลาร์ (DTT) สกัดด้วยสารละลาย NaOH เพิ่มขึ้น 10 มิลลิโมลาร์และใช้ปริมาณอะคริลาไมด์ร้อยละ 15 โดยแถบ M (lane M) แสดงโปรตีนมาตรฐาน



ภาพที่ 5.8 ผลการแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายโปรตีนจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 เก่า (aged) และข้าวเก่าที่แช่ด้วยโซเดียมซัลไฟต์ (SS) เพิ่มขึ้น 0, 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ และไโทโอริทอลเพิ่มขึ้น 5 มิลลิโมลาร์ (DTT) ใช้สารละลาย NaOH เพิ่มขึ้น 10 มิลลิโมลาร์ที่ประกอบด้วยสารละลาย SDS เพิ่มขึ้นร้อยละ 1 เป็นตัวสกัด และใช้ปริมาณอะคริลาไมด์ร้อยละ 15 โดยแถบ M (lane M) แสดงโปรตีนมาตรฐาน

โปรตีนขนาดใหญ่ตั้งแต่โปรตีนกลูตินขึ้นไปมีความเข้มข้นของแถบโปรตีนลดลงในทุกตัวอย่างทั้งที่แช่และไม่แช่สารรีดิวซิงซ์ (aged, 0mM, 5mM, 10mM, 15mM และ DTT) เมื่อเทียบกับภาพที่ 5.5

แสดงให้เห็นว่าสารรีดิวซิงซ์มีผลทำลายเฉพาะพันธะไดซัลไฟด์เท่านั้น ไม่สามารถทำลายโปรตีนที่เชื่อมกันด้วยแรงไฮโดรโฟบิกได้ โดยในภาพที่ 5.6 พบแถบโปรตีนกลูติน และกลุ่มโมเลกุลใหญ่ (HMW1 และ HMW2) หลงเหลืออยู่ในปริมาณที่มาก แสดงว่า โปรตีนกลุ่มดังกล่าวนี้อาจเชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ และขดตัวอยู่ภายใน การที่จะทำลายพันธะไดซัลไฟด์ที่พับตัวอยู่ภายในได้นั้นอาจต้องทำให้โปรตีนเกิดการเปิดตัวโดยการให้ความร้อน จึงบ่งชี้ว่าสารรีดิวซิงซ์จะทำงานได้นั้น โปรตีนจะต้องมีการเปิดตัวด้วยความร้อนหรือปฏิกิริยาเคมีก่อน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอะคริลาไมด์เป็นร้อยละ 15 จะพบแถบโปรตีนผสมระหว่างอัลบูมิน โกลบูลิน และโพรลามิน ที่มีขนาดประมาณ 14 กิโลดาลตัน โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแถบโปรตีนภายหลังการใช้สารรีดิวซิงซ์ (ภาพที่ 5.7 และ 5.8) แต่ยังคงพบการลดลงของโปรตีนขนาดใหญ่ และการเพิ่มขึ้นของโปรตีนขนาดเล็กอยู่ จึงอธิบายได้ว่าสารรีดิวซิงซ์จะรีดิวซ์พันธะไดซัลไฟด์ซึ่งเป็นพันธะหลักที่มีความสำคัญในการเสถียร โครงสร้างของโปรตีนกลูตินเป็นส่วนใหญ่

5.5 สรุปผลการทดลอง

เนื้อสัมผัสของข้าวเก่าสุกที่แข็งและร่วน สามารถปรับเปลี่ยนให้นุ่มและมีการเกาะกันของเมล็ดข้าวมากขึ้นด้วยสารรีดิวซิงซ์ได้ โดยการใช้ SS และ CYS ที่ 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ แทนน้ำหุงข้าว สามารถเพิ่มทั้งความนุ่ม และการเกาะกันของเมล็ดได้ ต่างจาก AA ที่เพิ่มเพียงความนุ่มในข้าวเก่าแต่ไม่เพิ่มการเกาะกันของเมล็ด การใช้บัฟเฟอร์เพื่อควบคุมพีเอชของสารรีดิวซิงซ์ทั้ง 3 ชนิดให้เท่ากันนั้น สามารถเพิ่มเพียงความนุ่มแต่ไม่เพิ่มค่าการเกาะกันในเมล็ดข้าวสุกโดยเห็นผลที่ระดับ 15 มิลลิโมลาร์ การปรับพีเอชของน้ำที่ใช้หุงข้าวให้เท่ากับสารรีดิวซิงซ์ที่ 9.46-9.63 และ 3.07-3.30 มีผลทำให้ข้าวเก่าสุกนุ่มขึ้นได้ สารรีดิวซิงซ์ทั้ง 3 ชนิดทำให้ค่า PV และ BD เพิ่มขึ้น ขณะที่ค่า SB ต่ำลง แสดงถึงสตาร์ชเจลาตินไนซ์ได้ง่ายขึ้น จากการพอง และแตกตัวดีขึ้นของเม็ดสตาร์ช ส่งผลให้ เจลยืดหยุ่น และอ่อนนุ่มขึ้น การปรับค่าพีเอชให้เท่ากับพีเอชของสารรีดิวซิงซ์ที่พีเอช 3.30 ทำให้การพองตัวของเม็ดสตาร์ช ค่าความหนืดสุดท้าย และค่าการกั้นตัวของเจลมีค่าต่ำ จากผลทั้งหมดสรุปได้ว่า SS มีประสิทธิภาพสูงสุดในการปรับเปลี่ยนค่าเนื้อสัมผัสและการเกิดเพสท์ในข้าวเก่าให้ใกล้เคียงข้าวใหม่ได้ การแช่ข้าวเก่าด้วยสารละลาย SS เข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ แสดงการลดลงของค่า PV และ BD แสดงถึงการพองและแตกตัวได้ดีขึ้นในเม็ดสตาร์ช และให้ค่าการกั้นตัวของเจลที่ต่ำ เจลที่ได้จึงอ่อนนุ่มกว่าตัวอย่างข้าวเก่าปกติ โดย SS และ DTT ที่ใช้แช่ข้าวสามารถตัดพันธะไดซัลไฟด์ที่เชื่อมโมเลกุลขนาดใหญ่ให้แตกเป็นหน่วยย่อย จึงไม่ขัดขวาง

การพองตัว และการเจลาติไนเซชันของสตาร์ช ทำให้เมล็ดข้าวเก่าการเกาะตัวกันเพิ่มขึ้น และมีความนุ่มที่ใกล้เคียงข้าวใหม่

5.6 รายการอ้างอิง

- Arai, E., Aoyama, K. and Watanabe, M. (1993). Enzymatic improvement of the cooking quality of aged rice: A main mode of protease action. **Bioscience Biotechnology Biochemistry** 57: 911-914.
- Bao, J.S., Sun, M., Zhu, L.H., Corke, H. (2004). Analysis of quantitative trait loci for some starch properties of rice (*Oryza sativa* L.): thermal properties, gel texture and swelling volume. **Journal of Cereal Science** 39: 379-385.
- Barber, S. (1972). Milled rice and changes during aging. **Rice Chemistry and Technology**, (D.F. Houston, ed.), American Association of Cereal chemists, St. Paul. USA. page 215-263.
- Benjakul, S., Thongkaew, C. and Visessanguan, W. (2005). Effect of reducing agents on physicochemical properties and gel-forming ability of surimi produced from frozen fish. **European Food Research and Technology** 20: 316-321.
- Chrastil, J. and Zarins, Z.M. (1992). Influence of storage on peptide subunit composition of rice oryzenin. **Journal of Agricultural Food Chemistry** 40: 927-930.
- Craig, S. A. S., Maningat, C. C., Seib, P.A. and Hosney, R.C. (1989). Starch paste clarity. **Cereal Chemistry** 66: 173.
- Eklhalifa, A.E.O., Chandrashekar, A., Mohamed, B.E. and Tinay, A.H.El. (1999). Effect of reducing agents on the in vitro protein and starch digestibilities of cooked sorghum **Food Chemistry** 66: 323-326
- Ema, S. and Kainuma, Y. (1991). Use of citrus fruits for rice cooking (Part 2) (in Japanese). **Journal. Cookery Science of Japan**, 24: 89-95.
- Ghasemi, E., Mosavian, M.T.H and Khodaparast, M.H.H (2008). The Effect of Acetic and Lactic Acid on the Oil Uptake Texture and Color of Rice (Sang Tarom) During Cooking. **World Applied Science Journal** 4(2): 183-187.
- Hamaker, B.R. and Griffin, V.K. (1990). Changing the Viscoelastic properties of cooked rice Through protein Disruption. **Cereal Chemistry** 67(3): 261-264.

- Hamaker, B.R. and Griffin, V.K.(1993) Effect of Disulfide bond-containing protein on rice starch gelatinization and pasting. **Cereal Chemistry** 70(4): 377-380.
- Hamaker, B.R. and Griffin, V.K. (1993). Effect of Disulfide Bond-Containing Protein on Rice Starch Gelatinization and Pasting, **Cereal Chemistry** 70(4): 377-380.
- Han, J.-H. and Lim, S.-T. (2009). Effect of presoaking on Textural, Thermal, and Digestive Properties of Cooked Brown Rice, **Cereal Chemistry** 86 (1): 100-105.
- Itoh, Y., Yoshinaka, R., and Ikeda, S. (1979). Effects of cysteine and cystine on the gel formation of fish meats on heating. **Bulletin of the Japanese Society for the Science of fish** 45: 341-345.
- Juliano, B.O.(1985). Criteria and tests for rice grain qualities. **Rice Chemistry and Technology**, American Association of Cereal chemists, St. Paul. USA. page 443-524.
- Kang, H.-J., Hwang, I.-K., Kim, K.-S. and Choi, H.-C. (2006). Comparison of the physicochemical properties and ultrastructure of Japonica and Indica rice grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 54: 4833-4838.
- Leach, H.W. and Schoch, T.J. (1962). Structure of the starch granule. III. Solubilities of Granular Starches in dimethyl Sulfoxide, **Cereal Chemistry** 39: 318-326.
- Meullenet, J.-F.C., Marks, B.P., Griffin, K. and Daniels, M.J. (1999). Effects of rough rice drying and storage conditions on sensory profiles of cooked rice, **Cereal Chemistry** 76: 483-486.
- Moritaka, S. and Yasumatsu, K. (1972). Studies on cereals. X. The effects of sulfhydryl groups on storage deterioration of milled rice. **Eiyo To Shokuryo** 25:59-62.
- Moritaka, S., Sawada, K. and Yasumatsu, K. (1972). Studies on cereals. VI. Effect of fat extraction on rice quality and storage deterioration of defatted rice, **Eiyo To Shokuryo** 24: 457-460.
- Moritaka, H. and Nakamura, K. (2005). Effect of salts on mechanical properties of heated rice grains. **The Society of Rheology**: 22 (2): 75-79.
- Neves, F.M.D., Pereira, J.M., Zavareze, E.D.R., Dias, A.R.G and Elias, M.C. (2010) Expansion of rice flour treated with lactic acid and sodium bisulphite. **LWT-Food Science and Technology** 43: 326-330.
- Ohno, T. and Ohisa, N. (2005). Studies on textural and chemical changes in aged rice grains, **Food Science and Technology**.11(4): 385-389.

- Ohno, T., Tomatsu, M., Toeda, K. And Ohisa, N. (2007). Texture of Cooked rice prepared from Aged Rice and Its improvement by reducing agents. **Bioscience Biotechnology Biochemistry** 70(12): 2912-2920.
- Okabe, M. (1979). Texture measurement of cooked rice and its relationship to the eating quality. **Journal of texture studies** 10: 131-152.
- Ohishi, K., Kasai, M., Shimada, A. And Hatae, K. (2003). Effect of acetic acid added to cooking water on the dissolution of proteins and activation of protease in rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51: 4054-4059.
- Roussel, H., Cheftel, J.C. (1990). Mechanisms of gelation of sardine proteins: influence of thermal processing and of various additives on the texture and protein solubility of kamaboko. **Journal of Food Science and Technology** 25:260–280
- Saleh, M.I. and Meullenet, J-F. (2007). Effect of protein disruption using proteolytic treatment on cooked rice texture properties. **Journal of Texture Studies** 38: 423-437.
- Shibuya, N and Iwasaki, T. (1982). Effect of the enzymatic removal of endosperm cell wall on the gelatinization properties of aged and unaged rice flours, **Starch/ Sterke** 34: 300-303.
- Takeuchi, W. Masui, H. and Yamaguchi, J. (1999). Reducing-agents-mediated Solubilization and Activation of Debranching Enzyme (Pullulanase) in Rice Flour, **Bioscience Biotechnology Biochemistry** 63 (3): 510-514.
- Tsugita, T., Ohta, T. and Kato, H.(1983). Cooking flavour and texture of rice stored under different conditions, **Agricultural and Biological Chemistry** 47: 543-549.
- Tsen, C.C. (1969). **Effect of oxidizing and reducing agents on changes of flour proteins during dough mixing.** (pp. 435-442) American Institute of baking: Chicago, Illinois.
- Villareal, C.P. and Juliano, B.O. (1986). Waxy gene factor and residual protein of rice starch granules. **Starch/Sterke** 38: 118.
- Wang, H. –H., Sun, D.-W., Zeng, Q. and Lu, Y. (2000). Effect of pH, Corn starch and phosphates on the pasting properties of rice flour. **Food Engineering** 46: 133-138.
- Xie, L., Chen, N., Duan, B., Zhu, Z. and Liao, X (2008). Impact of proteins on pasting and cooking properties of waxy and non-waxy rice. **Journal of Cereal Science** 47: 376-379.
- Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S. and Blanchard, C. (2003). Effect of rice storage on pasting properties of rice flour, **Food Research International** 36: 625-634.

บทที่ 6

บทสรุป

การศึกษาข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 3 กลุ่ม คือ ข้าวเก่า 1 ปี ข้าวแช่แข็ง 1 ปี และข้าวเร่งความเก่า พบว่าตัวอย่างข้าวทั้ง 3 กลุ่มมีลักษณะเนื้อสัมผัส คุณสมบัติการเกิดเพลสต์ รวมทั้งคุณสมบัติทางความร้อน ที่แตกต่างกันจากข้าวใหม่อย่างชัดเจน โดยข้าวเก่ามีเนื้อสัมผัสที่แข็งและร่วน เม็ดสสารหอง และแตกตัวน้อย ต้องใช้อุณหภูมิที่สูงในการเกิดเจลลิตในเซชัน การเก็บข้าวที่สภาวะแช่แข็ง 1 ปี ไม่สามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของข้าวได้ โดยความนุ่ม และการเกาะติดกันของเมล็ดข้าวสุกจะลดลง การพองตัวของสสารหองลดลง ขณะที่อุณหภูมิในการเกิดเจลลิตในเซชันลดลง การใช้อุณหภูมิสูงเร่งความเก่าของข้าวทำให้การเกาะติดกันของเมล็ดข้าวสุกมีค่าลดลงได้แต่ความแข็งไม่เพิ่มขึ้น เม็ดสสารหองและแตกตัวได้น้อยมาก อุณหภูมิในการเกิดเจลลิตในเซชันสูงเช่นเดียวกับข้าวเก่า ความแตกต่างของคุณสมบัติต่าง ๆ เช่น กำลังการพองตัว ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ คุณสมบัติการเกิดเพลสต์ และคุณสมบัติทางความร้อน สามารถลดระดับลงได้ ภายหลังจากโปรตีนที่ขัดขวางการพองตัว และเจลลิตในเซชันของสสารหองถูกกำจัดออกไป แสดงว่าโปรตีนมีผลอย่างมากต่อคุณภาพของข้าวที่เปลี่ยนแปลงไป

การเก็บรักษาข้าว 1 ปีมีผลทำให้คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไปโดยการละลายของโปรตีนลดลง โปรตีนมีการเปิดตัวหรือคลายตัวเพิ่มขึ้น ทำให้หมู่ซัลไฮดริล และกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิกที่ขุดตัวอยู่ด้านในโมเลกุลเคลื่อนที่ออกมายังด้านหน้า จากนั้นจึงเกิดการเชื่อมกันของกรดอะมิโนระหว่างโมเลกุลโปรตีนด้วยอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก และพันธะไดซัลไฟด์ ทำให้โปรตีนมีขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้น ขัดขวางการซึมผ่านของน้ำเข้าสู่เม็ดสสารหอง การพองตัว และการแตกตัวของสสารหองเกิดขึ้นน้อย ต้องใช้อุณหภูมิที่สูงในการทำให้เม็ดสสารหองเจลลิตในเซชัน นอกจากนี้ความร้อนที่ใช้ในการหุงข้าวก็ทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพ โดยโมเลกุลโปรตีนมีการเปิดตัวเพิ่มขึ้น ข้าวหุงสุกมีปริมาณโปรตีนที่ละลายออกมาได้น้อยกว่าข้าวสาร ทั้งนี้การละลายของโปรตีนสามารถเพิ่มขึ้นได้เมื่อใช้เอนไซม์อะไมโลส ย่อยพอลิเมอร์ของสสารหองก่อนการสกัดโปรตีน ซึ่งแสดงถึงการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับสสารหองที่เกิดขึ้นระหว่างการให้ความร้อน นอกจากนี้ยังพบกลุ่มโปรตีนขนาดเท่าโปรตีนลูทีนในปริมาณมาก ซึ่งเกิดจากการเกาะกลุ่มกันใหม่ของหน่วยย่อยแอลฟา และบีตาไกลูทีน ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ แสดงว่าพันธะไดซัลไฟด์มีบทบาทสำคัญต่อความเสถียรของโครงสร้างโปรตีนทั้งก่อนและหลังให้ความร้อน และจากปริมาณหมู่ไดซัลไฟด์ที่มีมาก

ในข้าวเก่า ทำให้โครงสร้างตาข่ายสามมิติของเจลจากข้าวเก่ามีความเสถียรมากกว่านั่นเอง

สารรีดิวซิงซ์ 2 ชนิดได้แก่ โซเดียมซัลไฟท์ (SS) และ ซิสทีอีน (CYS) สามารถปรับเปลี่ยนเนื้อสัมผัสข้าวเก่าโดยเพิ่มทั้งความนุ่ม และการเกาะกันของเมล็ดได้ ต่างจากกรดแอสคอร์บิก (AA) ที่เพิ่มเพียงความนุ่มในข้าวเก่าแต่ไม่เพิ่มการเกาะกันของเมล็ด สารรีดิวซิงซ์ทั้ง 3 ทำให้สตาร์ช เจลาติไนซ์ได้ง่ายขึ้น จากการพองและแตกตัวดีขึ้นของเม็ดสตาร์ชส่งผลให้เจलयืดหยุ่นและอ่อนนุ่มลงได้ ค่าพีเอชของสารละลายทั้ง 3 ชนิดก็มีส่วนช่วยเพิ่มความนุ่มในข้าวเก่าด้วย จากการที่โครงสร้างของโปรตีนถูกทำลายทำให้สตาร์ชพองตัวและคูดน้ำได้มาก ค่าพีเอชที่เป็นกรด (พีเอช 3.30) ลดการพองตัวของเม็ดสตาร์ช แสดงว่ากรดย่อยโมเลกุลสตาร์ชให้เล็กลง ค่าความหนืดสุดท้ายและค่าการคั่นตัวของเจลมีค่าต่ำได้ จากสารรีดิวซิงซ์ทั้ง 3 ชนิด SS มีประสิทธิภาพสูงสุดในการปรับเปลี่ยนค่าเนื้อสัมผัส และการเกิดเพสท์ในข้าวเก่าให้ใกล้เคียงข้าวใหม่ การแช่ข้าวเก่าด้วย SS สามารถทำให้เม็ดสตาร์ชพองและแตกตัวได้ดีขึ้น การคั่นตัวของเจลมีค่าต่ำ เจลที่ได้จึงอ่อนนุ่มลง นอกจากนี้ปริมาณหมู่ไดซัลไฟด์ของโปรตีนสกัดจากข้าวแช่ SS ที่ 5 mM และ DTT ลดลง สัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของหมู่ซัลไฮดริล รวมถึงผล SDS-PAGE ที่แสดงการลดลงของแถบโปรตีนขนาดใหญ่ และโปรกลูทีลิน และการเพิ่มขึ้นของหน่วยย่อยกลูทีลิน แม้ประสิทธิภาพของ SS จะต่ำกว่า DTT แต่ค่าเนื้อสัมผัสของข้าวเก่าแช่ SS ก็ยังมีความนุ่มและมีการเกาะกันของเมล็ดข้าวสุกเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับข้าวใหม่ได้





ภาคผนวก

ภาคผนวก

วิธีการเตรียมตัวอย่างและสารเคมี

1. การเตรียมเอนไซม์อะไมเลส

คัดแปลงจากวิธีการของ Zihua Ao และคณะ (2007) และ Yook และคณะ (2002) สารละลายเอนไซม์อะไมเลสเข้มข้นร้อยละ 0.05 เตรียมได้โดยชั่งเอนไซม์ 0.0125 กรัม ใส่ใน บีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำบีกเกอร์ที่มีสารละลายเอนไซม์อยู่ตั้งในอ่าง น้ำแข็งขนาดเล็ก ทำการกวนผสมเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายสารละลายใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 1,500 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ถ่ายสารละลายส่วนใสใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงหลอดใหม่ นำไปเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อร่อนนำไปใช้ย่อยตัวอย่างเจลข้าวสุกต่อไป (โดยในการย่อยตัวอย่างทุกครั้งควรเตรียมเอนไซม์ใหม่เสมอ)

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงซ์ตามวิธีการของ Somogyi (1952)

ตารางที่ 1 อัตราส่วนสารละลายที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงซ์

Solution	Standard glucose (ml)	Distilled water (ml)
standard glucose	0	1
	0.02	0.980
	0.04	0.960
	0.08	0.920
	0.120	0.880
	0.160	0.840
	0.100	0.800
sample	-	-

หมายเหตุ: sample หมายถึง สารละลายส่วนใสจากตัวอย่างข้าวสุกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส ที่เวลาในการย่อยต่างกัน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 40, 80, 120, 160 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ละลายกลูโคส 1 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตรในขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร) ดังแสดงไว้ในภาคผนวกตารางที่ 1 จากนั้นเติม อัลคาร์ไลนคอปเปอร์รีเอเจนต์ (alkaline copper reagent) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที เมื่อครบเวลา ลอดอุณหภูมิตัวอย่างลงให้เท่าอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม เนลสันรีเอเจนต์ (nelson reagent) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไปผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เมื่อครบเวลาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงซ์ในตัวอย่าง โดยเทียบจากกราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ตารางที่ 2 ปริมาณกลูโคสและโปรตีนที่สกัดได้จากสารละลายส่วนใสเจลข้าวสุกหลังย่อยด้วย เอนไซม์อะไมเลสที่ระยะเวลาต่าง ๆ

sample	digestion time (h)	glucose (µg/ g dry sample)	alkaline extractable protein (mg/g sample)
fresh cooked	1	176	39
	3	277	36
	5	337	42
	8	335	38
aged cooked	1	235	30
	3	272	28
	5	298	25
	8	390	25

2.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงซ์ด้วยวิธี Somogyi

2.1.1 Arsenomolybdate color reagent

ชั่งแอมโมเนียม โมลิบเดต (ammonium molybdate: $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24}$) 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมอาร์ซีเนต (sodium arsenate: Na_2HAsO_7) โดยชั่งโซเดียมอาร์ซีเนต 3 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 นาที เก็บสารละลายใส่ขวดสีชา

2.1.2 Copper carbonate-tartrate reagent

นำสารละลาย A (เติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 2 ลิตร ซึ่งแอนไฮไดรอสโซเดียมคาร์บอเนต (anhydrous sodium carbonate: Na_2CO_3) 24 กรัม และ Rochelle salts 12 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตรอันเดิม ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต เข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยกวนผสมตลอดเวลาขณะที่ทำการเติมสารละลาย และเติมโซเดียมไบคาร์บอเนต 6 กรัม) คนผสมให้ละลายเข้ากัน และสารละลาย B (น้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือด เติมแอนไฮไดรอสโซเดียมซัลเฟต ปริมาตร 180 กรัมลงไป ต้มให้ความร้อนจนกว่าเกลือจะละลายหมด แล้วลดอุณหภูมิสารละลายลง) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 2000 มิลลิลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา

2.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับสกัดโปรตีนข้าวสาลี

2.2.1. สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)

SDS เข้มข้นร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดย SDS 4 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตรละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร โดยค่อย ๆ คนสารละลายเบาๆ เพื่อไม่ให้เกิดฟอง จนกว่า SDS จะละลายหมด

2.1.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3. การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีลาวรี (lowry)

สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin: BSA) (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการวิเคราะห์) โดยดูดสารละลายมาตรฐาน BSA ปริมาตร 0, 10, 20, 30, 50, 70 และ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลองใหม่ แล้วปรับปริมาตรทุกหลอดด้วยน้ำกลั่นให้หลอดเป็น 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมรีเอเจนต์ดี 1 มิลลิลิตร (สารผสมระหว่างรีเอเจนต์เอกับรีเอเจนต์บี) ปั่นผสมทันทีจนครบทุกหลอด จากนั้นเติมรีเอเจนต์ซีปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ในทุกหลอด (โดยเริ่มเติมจากหลอดแรกที่เคยเติมสารรีเอเจนต์ดี) จับเวลา 30 นาทีโดยเริ่มจับเวลาดังแต่หลอดแรกที่เคยเติมรีเอเจนต์ดี วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้คำนวณจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลาย BSA ในหน่วย มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.1 สารเคมีสำหรับหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีลาวรี (lowry)

3.1.1 รีเอเจนต์เอ

โซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 2 ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ เตรียมได้โดยชั่งโซเดียม 21.2 กรัมต่อลิตร ผสมกับ 10 มิลลิลิตร ของ 1.0 โมลาร์ NaOH ในปริมาตรรวมเท่ากับ 100 มิลลิลิตร

3.1.2 รีเอเจนต์บี

สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) เข้มข้นร้อยละ 0.5 ละลายในโซเดียมซิเตรท เข้มข้นร้อยละ 1

3.1.3 รีเอเจนต์ซี

Folin-Ciocalteu's phenol reagent เข้มข้น 1 นอร์มอล ผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 1

3.1.4 รีเอเจนต์ดี

รีเอเจนต์บี 1 มิลลิลิตร ผสมกับ รีเอเจนต์เอ 50 มิลลิลิตร

4. การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส ระบบ SDS-PAGE

4.1 สารละลายที่ใช้เตรียมเจล

4.1.1 อะคริลาไมด์ (acrylamide) (30%T, 2.7%C)

ชั่งสารเคมีได้แก่ อะคริลาไมด์ 29.2 กรัม และ Bis – (N,N' methylene-bis-acrylamide) 0.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นถ่ายสารละลายใส่ขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.1.2 รั้นนึ่ง บัฟเฟอร์ (4x) (Tris-HCl เข้มข้น 1.5 โมลาร์, พีเอช 8.8)

ชั่งทริสเบส (Tris base) 18.15 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชเท่ากับ 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

4.1.3 สแต็กกิง บัฟเฟอร์ (4x) (Tris HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์, พีเอช 6.8)

ชั่งทริสเบส (Tris base) 3 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับพีเอชเท่ากับ 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

4.1.4 สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น ร้อยละ 10

ชั่ง SDS 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4.1.5 แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) เข้มข้นร้อยละ 10

ชั่ง ammonium persulfate 0.1 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อต้องการใช้งาน และหุ้มด้วยกระดาษอะลูมิเนียม

4.1.6 ทริตเมนต์ บัฟเฟอร์ (2x) ประกอบด้วย Tris-HCl เข้มข้น 0.125 โมลาร์, พีเอช 6.8, SDS ร้อยละ 4, กลีเซอรอล ร้อยละ 20 และ บีต้าเมอร์แคปโตเอทานอล เข้มข้นร้อยละ 10

ปีเปต Tris-HCl (พีเอช 6.8) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เติม SDS เข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร กลีเซอรอล 2 มิลลิลิตร เบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล 1 มิลลิลิตร และโบรโมฟินอลบลู เข้มข้นร้อยละ 0.1 (ทำให้เกิดสี) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร ถ่ายใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง

4.1.7 แทงก์บัฟเฟอร์ ประกอบด้วย Tris 0.025 โมลาร์, พีเอช 8.3, ไกลซีน 0.192 โมลาร์, SDS ร้อยละ 0.1)

ชั่งทริสเบส (Tris base) 12 กรัม ไกลซีน 57.6 กรัม และ SDS 4 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 4 ลิตร ปรับค่าพีเอชสุดท้ายให้เท่ากับ 8.3

4.1.8 สีย้อมโปรตีน (staining solution)

ชั่ง Coomassie blue R-250i 1.25 กรัม เติมเอทานอลปริมาตร 250 มิลลิลิตร และกรดอะซิติกปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

4.1.9 น้ำล้างสีย้อม (destaining solution)

เตรียม เอทานอล 250 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 ลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

4.2 การเตรียมตัวอย่างโปรตีน

นำสารละลายโปรตีนสกัดที่ทราบความเข้มข้นแล้วผสมกับทริตเมนต์บัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยคำนวณความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีนที่จะโหลดเข้าสู่แผ่นเจลให้มีค่า 25 ไมโครกรัม โปรตีนในทุก ๆ ตัวอย่าง ภายหลังจากทราบความเข้มข้นของตัวอย่างโปรตีนที่ได้ในสารสกัดแล้วทำการคำนวณปริมาณสารสกัดที่จะใช้ฉีดตัวอย่าง ดังนี้.

4.2.1 ตัวอย่างการคำนวณ

เมื่อทราบโปรตีนที่สกัดได้มีความเข้มข้น 4.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หมายถึง มีโปรตีน 4.50 มิลลิกรัมละลายอยู่ในสารละลายต่าง (ตัวทำละลาย) 1 มิลลิลิตร แสดงว่ามีโปรตีน 4.50 ไมโครกรัม ละลายในสารสกัด 1 ไมโครลิตร ดังนั้นหากต้องการโปรตีนทั้งหมด 25 ไมโครกรัม จะต้องดูดสารละลายเท่ากับ $(25 \times 1)/4.5 = 5.55$ ไมโครลิตร

ปีเปตสารละลายโปรตีน ผสมกับทริตเมนต์บัฟเฟอร์เข้มข้น 2X ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โหลดตัวอย่างโดยใช้โปรตีนที่ผสมกับทริตเมนต์บัฟเฟอร์ปริมาณ 11.10 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ปริมาณ

โปรตีนเท่ากับ 25 ไมโครกรัมในทุกตัวอย่าง

4.3 อุปกรณ์และวิธีการเตรียมเจลเอสดีเอส

เตรียมชุดอุปกรณ์สำหรับเตรียมเจล (Biorad's Mini-protean II) 1 ชุดประกอบด้วยแผ่นยาง, glass plates with integrated spacers ขนาด 0.75 มิลลิเมตร, plastic combs, plastic plate, casting frame, casting stand, clamping frame, electrode assembly, tank, sample loading guides และ power supply

ทำความสะอาด glass plates และ integrated spacers ใช้กระดาษเช็ดเลนส์ชุบด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น ร้อยละ 70 ทำการประกบ glass plate และ integrated spacers เข้าด้วยกัน (glass plate sandwich) แล้วยึดแผ่นกระจกเข้าไว้ด้วยกัน (casting frame) นำไปประกอบเข้ากับ (casting stand) ซึ่งมีแผ่นยางวางไว้ที่ฐานของ casting stand แล้ว พร้อมสำหรับการเตรียมเจล

เตรียมส่วนผสมของรันนิ่งเจล (cocktail running gel) โดยผสมสารเคมีต่าง ๆ ตามลำดับให้ได้อัตราส่วนตามตารางที่ 3-7. ใช้ไมโครปิเปตขนาด 1000 ไมโครลิตร คัดสารละลายผสมที่เตรียมไว้ ใส่ลงระหว่าง glass plates ที่ถูกจัดเตรียมไว้ในข้อ 2 อย่างรวดเร็ว (ระวังเจลแข็งตัว) ระยะความสูงที่เหมาะสมของเจล (โดยเว้นส่วนบนไว้สำหรับเตรียมเจลสแต็กกิง โดยให้ขอบบนสุดของสารละลายรันนิ่งเจลห่างจากด้านบนของ short plate ประมาณ 2.5 เซนติเมตร) ใช้ปิเปตดูดน้ำกลั่นเติมทับลงไปให้เต็มแผ่น plate อย่างรวดเร็วจนกระทั่งแผ่นเจลแข็งตัว (สังเกตได้จากแนวเส้นรอยต่อระหว่างส่วนของเจลที่แข็งตัวแล้วกับน้ำกลั่นที่ปรากฏขึ้นอยู่ด้านบน ซึ่งใช้เวลาประมาณ 30-40 นาที)

ตารางที่ 3 ปริมาณสารเคมีสำหรับเตรียมเจลรันนิ่งเข้มข้นร้อยละ 12.5

Cocktail running gel	1 plate (ml)	2 plate (ml)	4 plate (x2) (ml)	6 plate (x3) (ml)
1.) Acrylamide	2.084	4.167	8.334	12.501
2.) 1.5 M Tris (pH 8.8)	1.25	2.5	5.0	7.5
3.) DI water	1.617	3.233	6.466	9.699
4.) 10% SDS	0.05	0.1	0.2	0.3
5.) Ammonium persulfate**	0.025	0.05	0.1	0.15
6.) TEMED**	0.001	0.01	0.02	0.03
Total volume	5.027	10.06	20.12	30.18

** ใส่เป็นลำดับสุดท้าย

ตารางที่ 4 ปริมาณสารเคมีสำหรับเตรียมเจลรันนิ่งเข้มข้นร้อยละ 10

Cocktail running gel	1 plate (ml)	2 plate (ml)	4 plate (x2) (ml)	6 plate (x3) (ml)
1.) Acrylamide	1.667	3.333	6.667	10.000
2.) 1.5 M Tris (pH 8.8)	1.25	2.5	5	7.5
3.) DI water	2.007	4.007	8.013	12.02
4.) 10% SDS	0.05	0.1	0.2	0.3
5.) Ammonium persulfate**	0.025	0.05	0.1	0.15
6.) TEMED**	0.001	0.01	0.02	0.03
Total volume	5	10	20	30

** ใส่เป็นลำดับสุดท้าย

ตารางที่ 5 ปริมาณสารเคมีสำหรับเตรียมเจลรันนิ่งเข้มข้นร้อยละ 15

Cocktail running gel	1 plate (ml)	2 plate (ml)	4 plate (x2) (ml)	6 plate (x3) (ml)
1.) Acrylamide	1.25	2.5	5	7.5
2.) 1.5 M Tris (pH 8.8)	1.25	2.5	5	7.5
3.) DI water	2.424	4.84	9.68	14.52
4.) 10% SDS	0.05	0.1	0.2	0.3
5.) Ammonium persulfate**	0.025	0.05	0.1	0.15
6.) TEMED**	0.001	0.01	0.02	0.03
Total volume	5	10	20	30

** ใส่เป็นลำดับสุดท้าย

ตารางที่ 6 ปริมาณสารเคมีสำหรับเตรียมเจลรันนิ่งเข้มข้นร้อยละ 7.5

Cocktail running gel	1 plate (ml)	2 plate (ml)	4 plate (x2) (ml)	6 plate (x3) (ml)
1.) Acrylamide	2.500	5	10	15
2.) 1.5 M Tris (pH 8.8)	1.25	2.5	5	7.5
3.) DI water	1.174	2.340	4.680	7.02
4.) 10% SDS	0.05	0.1	0.2	0.3
5.) Ammonium persulfate**	0.025	0.05	0.1	0.15
6.) TEMED**	0.001	0.01	0.02	0.03
Total volume	5	10	20	30

** ใส่เป็นลำดับสุดท้าย

ตารางที่ 7 ปริมาณสารเคมีใช้สำหรับเตรียมเจลเข้มข้นร้อยละ 4

Cocktail stacking gel	1 แผ่น (มล.)	4 แผ่น (x2) (มล.)	6 แผ่น (x3) (มล.)
1.) Acrylamide	0.625	1.25	1.875
2.) 1.5 M Tris (pH 8.8)	1.25	2.5	3.75
3.) DI water	3.05	6.0	9.15
4.) 10% SDS	0.05	0.1	0.15
5.) Ammonium persulfate**	0.025	0.05	0.075
6.) TEMED**	0.0025	0.005	0.0075
Total volume	5.0025	9.905	15.0075

** ใส่เป็นลำดับสุดท้าย

เทน้ำกลั่นที่อยู่ด้านบนออกให้หมด โดยวิธีการเอียงแผ่นเจลไปมาใช้กระดาษทิชชูชุบน้ำที่บริเวณด้านข้างออกให้หมด

เตรียมสารละลายผสมเจลสแต็กกิง (cocktail stacking gel) โดยผสมสารเคมีต่าง ๆ ตามลำดับให้ได้อัตราส่วนตามตาราง

ใช้ไมโครปิเปตขนาด 1000 ไมโครลิตร คูดสารละลายผสมของสแต็กกิ้งที่กวนผสมกันดี แล้วใส่ด้านบนเจลรันนิ่งที่แข็งตัวแล้วอย่างรวดเร็ว จากนั้นนำ plastic comb ประกอบเข้าด้านบน บริเวณจุดเดียวที่ใส่สแต็กกิ้งอย่างรวดเร็ว ให้ขอบของ plastic comb แนบสนิทพอดีกับ short plate เพื่อใช้เป็นช่องสำหรับโหลดโปรตีนตัวอย่าง โดยระวังอย่างให้เกิดฟองอากาศขณะที่ใส่ plastic comb เข้าไปโดยใช้เวลาประมาณ 40-120 นาทีให้เจลสแต็กกิ้งแข็งตัว

เมื่อสแต็กกิ้งแข็งตัวแล้วดึงแผ่น plastic comb ขึ้นช้า ๆ ในแนวตั้ง ระวังไม่ให้แผ่นเจล เกิดการโค้งงอหรือเสียรูปทรง

ถอดแผ่น plate ที่เจลแข็งตัวแล้วแล้วออกจาก casting stand และ casting frame นำไปประกอบเข้ากับอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์โทรด โดยเอา integrated spacer หันออกด้านนอกบริเวณ ให้ส่วน glass plate จะหันเข้าด้านในของ chamber) จัดให้เส้นขอบบนของ glass plate ชิดกับขอบยางสีเขียวของ ตัวอุปกรณ์เพื่อป้องกันการไม่ให้เกิดการรั่วไหลของแท็งก์ บัฟเฟอร์ แล้วล็อกให้แน่นดีกับ clamping frame

นำแผ่นเจลที่ประกอบเข้าชุดอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์โทรด และ clamping frame แล้ว ใสลงใน chamber เติมสารละลายแท็งก์บัฟเฟอร์ให้เต็มบริเวณช่องว่างด้านในของ chamber (ระดับความสูงของแท็งก์ บัฟเฟอร์ ต้องเสมอกับแผ่นเจลเสมอขณะที่โหลดตัวอย่างสารละลายโปรตีนเข้าไป เพื่อป้องกันการฟุ้งกระจายของโปรตีนข้ามเลนมา) ขณะที่ระดับน้ำแท็งก์ บัฟเฟอร์ บริเวณ chamber ด้านนอกจะต้องอยู่ในระดับที่สูงกว่าเส้นลวดนำไฟฟ้า เพื่อให้เกิดการไหลผ่านของกระแสไฟได้ ในระบบเตรียมวาง sample loading guide ลงด้านบนของแผ่นเจล จากนั้นทำการโหลด ตัวอย่างโปรตีนลงในช่องที่ทำไว้ปริมาณด้านบน โดยเริ่มโหลดสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (standard marker protein) ก่อนเท่ากับ 4 ไมโครลิตร เตรียมจากสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (standard board range) และสารละลายทรีตเมนต์บัฟเฟอร์ชนิดที่มีเบต้าเมอร์แคปโตเอทานอลปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซ็นทรีฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 20 ต่อ 1) ปั่นผสมให้เข้ากัน ถ่ายเก็บใส่ใน 1.5 มิลลิลิตร ไมโครเซ็นทรีฟิวซ์หลอดที่ -20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการใช้งานให้นำออกมาตั้งที่อุณหภูมิห้องจนละลายเป็นของเหลว นำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ตัวอย่างสารละลายโปรตีนที่ผสมกับทรีตเมนต์บัฟเฟอร์ที่มีเบต้าเมอร์แคปโตเอทานอลนำไปต้มให้ความร้อนเป็นเวลา 5 นาทีเช่นเดียวกัน เมื่อครบเวลานำออกตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้สารละลายเย็นตัวก่อน โหลดเข้าแผ่นเจล

เมื่อโหลดสารละลายโปรตีนมาตรฐานเสร็จแล้ว จึงโหลดสารละลายโปรตีนตัวอย่างควรใช้เวลาในขั้นตอนการโหลดโปรตีนให้น้อยที่สุด เพื่อป้องกันการแพร่เข้าหากันของสารละลายโปรตีนตัวอย่างที่อยู่ใกล้กัน

ปิดฝา chamber (ให้ขั้วสีแดงต่อเข้ากับขั้วสีแดงของ electrode ส่วนสายสีดำก็ต่อเข้ากับขั้วสีดำ) นำไปต่อเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟ (power supply) ให้ความต่างศักย์ 120 โวลต์ (โปรตีนจะเคลื่อนที่จากด้านบนลงมาด้านล่าง ประมาณ 155 นาที) โดยให้สังเกตฟองก๊าซเกิดขึ้นจากเส้นลวด แสดงถึงว่าเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าทำงานได้เป็นปกติ) และจะสังเกตแถบสีน้ำเงินของโปรตีนเริ่มเคลื่อนที่ลงจนมาใกล้กับขอบด้านล่างของแผ่นเจล ให้ทำการหยุดให้กระแสไฟฟ้า แกะแผ่นเจลออก เพื่อนำไปย้อมสีโปรตีนในขั้นตอนต่อไป

4.4 การย้อมสีโปรตีน

ถอดแผ่นเจลออกโดยค่อยๆ จัดให้ glass plate และ integrated spacer แยกออกจากกัน ด้วย plastic plate โดยกรีดที่จุดรอยต่อของเจลกับกระจกแยกออกจากแผ่น glass plate แล้วแกะเอาแผ่นเจลออกมาโดยเริ่มจัดจากขอบเจลด้านล่างด้านใดด้านหนึ่ง แล้วนำไปใส่ในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิดมิดชิด ซึ่งภายในบรรจุ staining solution ไว้แล้ว

นำกล่องพลาสติกที่มีแผ่นเจลตัวอย่างมาแช่ ตั้งความเร็วรอบของการเขย่าที่ 80 รอบต่อนาทีเพื่อให้สีย้อมติดกับโปรตีน ใช้เวลา 1 ชั่วโมง

เทสีย้อมทิ้งในขวดทิ้งสาร จากนั้นเท destaining solution ลงไปแทนที่ แช่ตลอดเวลาเป็นเวลา 1 ชั่วโมงครึ่ง (ทำการเปลี่ยน destaining solution ใหม่ทุก ๆ 15 นาที) จนปรากฏลักษณะของแถบสีน้ำเงินที่ชัดเจนในบริเวณที่มีโปรตีน และบริเวณแผ่นเจลที่ไม่มีโปรตีนจะเป็นลักษณะเจลใสไม่มีสี

เท destaining solution ทิ้งไปแล้วเติมน้ำกลั่นแทน แช่ ๆ ต่อเป็นเวลา 15-20 นาที เพื่อให้ destaining solution ละลายออกมาจนหมด แล้วเทน้ำล้างทิ้ง เติมน้ำกลั่นเข้าไปอีกครั้งตั้งทิ้งไว้เพื่อรอการทำแห้งเจลต่อไป โดยสามารถเก็บไว้ในลักษณะนี้ได้นานประมาณ 12 ชั่วโมง

4.5 การทำแห้งตัวอย่าง

เทแผ่นเจลที่ destain เรียบร้อยแล้วในอ่างพลาสติกขนาดเล็กที่ใส่น้ำกลั่นเตรียมไว้ปริมาณหนึ่ง ใช้กระดาษแข็งขนาด กว้าง x ยาว เท่ากับ 10 x 12 เซนติเมตร ซ้อนแผ่นเจลขึ้นไว้ด้านบน แล้วจัดเรียงให้ได้ตำแหน่งสวยงามแล้วใช้มือทั้งสอง (สวมถุงมือทุกครั้ง) ข้างกดเบา ๆ เพื่อไม่ให้แผ่นเจลเคลื่อนออกจากแผ่นกระดาษแข็ง ยกแผ่นกระดาษแข็งนี้ที่มีแผ่นเจลประกบด้านบนขึ้นช้า ๆ โดยยกด้านที่ติดกับส่วนล่างของแผ่นเจลขึ้นก่อนในลักษณะเอียงไปด้านหน้าให้น้ำไหลออก แล้วนำไปวางบนเครื่องทำแห้งของเจล (Gel dryer) นำแผ่นเจล ไปทำแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.40 ชั่วโมง สังเกตได้ว่าแผ่นเจลที่แห้งจะสามารถถอดออกจากแผ่นพลาสติกได้โดยง่าย

5. สารเคมีสำหรับเตรียมการวิเคราะห์ค่าปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิก

5.1 การเตรียมสารละลาย ANS เข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0

เตรียมได้ซังโซเดียมฟอสเฟต 0.3480 กรัม ของ NaH_2PO_4 ใส่ในบีกเกอร์เกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตรที่หุ้มด้วยแผ่นอะลูมิเนียมฟลอย์ไว้โดยรอบเพื่อป้องกันแสง เติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร จากนั้นปรับพีเอช เท่ากับ 7.0 จากนั้นเติม ANS 56.86 มิลลิกรัม ลงไปผสมปรับพีเอช สารละลายให้ได้เท่ากับ 7.0 อีกครั้ง โดยกวนสารละลายตลอดเวลา เมื่อละลายหมดแล้วเทสารละลายใส่ในขวด วัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เทใส่ขวดสีชาที่หุ้มด้วยกระดาษอะลูมิเนียมฟลอย้อย่างมิดชิด แห่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เมื่อเก็บไว้ ANS จะตกตะกอน ดังนั้นจึงควรเขย่าหรือกวนสารละลายทุกครั้งก่อนใช้งาน)

5.2 การเตรียมสารละลายโซเดียม คาร์บอเนต/ โซเดียมไบคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 10.0

ตามวิธีการของ Stoll และ Blanchard (1990) เตรียมสารละลายเอ (เตรียมโดยซังแอนไฮดรัส โซเดียมคาร์บอเนต 21.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตรเป็น 1 ลิตร) และสารละลายบี (เตรียมโดยซังโซเดียมไบคาร์บอเนต 16.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตรเป็น 1 ลิตร) ผสมสารละลายเอ กับ สารละลายบี ในอัตราส่วนของ เอ ต่อ บี เท่ากับ 137.5 ต่อ 112.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ค่าพีเอชสุดท้ายที่วัดได้เท่ากับ 10.0

6. สารเคมีสำหรับเตรียมการวิเคราะห์หมู่ซัลไฮดริล และไดซัลไฟด์

6.1 บัฟเฟอร์สำหรับวิเคราะห์หมู่ซัลไฮดริล (Total SH)

6.1.1 Tris-HCl บัฟเฟอร์

เตรียมสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ประกอบด้วย EDTA เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และยูเรียเข้มข้น 8 โมลาร์ (มีพีเอชเท่ากับ 8.0) เตรียมได้โดยซัง Tris-HCl (น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 121.14 กรัม ต่อ โมล) 30.285 กรัม EDTA 1.46 กรัม (น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 292.25 กรัม ต่อ โมล) และยูเรีย 240.24 กรัม (น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 60.06 กรัม ต่อ โมล) เทสารทั้งหมดในบีกเกอร์เกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร กวนผสมให้ละลาย แล้วปรับค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้ได้เท่ากับ 8.0 ถ่ายสารละลายที่ปรับค่าพีเอชแล้วใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร เก็บสารละลายบัฟเฟอร์ไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

6.1.2 2-nitrobenzoic acid (DTNB)

DTNB เข้มข้นร้อยละ 0.1 (พีเอชเท่ากับ 7.0) ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟต (NaH_2PO_4) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เตรียมได้โดยชั่ง DTNB 0.1 กรัม และ NaH_2PO_4 0.690 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร กวนผสมให้ละลาย แล้วปรับค่าพีเอช ให้ได้เท่ากับ 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ถ่ายสารละลายที่ปรับค่าพีเอช แล้วใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายลงในขวดสีชานำไปเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.2 การเตรียมบัฟเฟอร์สำหรับวิเคราะห์หมู่ซัลไฮดริล และหมู่ไธอไซลไฟด์ (Total SH + SS)

6.2.1 Tris-HCl บัฟเฟอร์

สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 9.5 ประกอบด้วย EDTA เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ยูเรีย เข้มข้น 8 โมลาร์ และ โซเดียมซัลไฟต์ เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยการชั่ง Tris-HCl 30.285 กรัม (น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 121.14 กรัม ต่อโมล) EDTA 1.46 กรัม (น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 292.25 กรัม ต่อ โมล) ยูเรีย 240.24 กรัม (น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 60.06 กรัม ต่อโมล) และโซเดียมซัลไฟต์ 6.302 g (น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 126.04 กรัม ต่อ โมล) ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร กวนผสมให้ละลาย แล้วปรับพีเอช ของสารละลายให้ได้ 9.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ถ่ายสารละลายบัฟเฟอร์ที่ปรับพีเอช แล้วใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายบัฟเฟอร์ลงในขวดสีชานำไปเก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้อง

6.3 การสังเคราะห์ 2-nitro-5-thiosulfobenzoate (NTSB)

ชั่ง DTNB 100 มิลลิกรัม และ โซเดียมซัลไฟต์ 0.126 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร กวนผสมให้ละลาย จากนั้นปรับค่าพีเอช ของสารละลายให้ได้เท่ากับ 7.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอโมล (จะสังเกตเห็นสีของสารละลาย เป็นสีแดง (bright red color)) ถ่ายสารละลายใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 38 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่บดแสง ฟ่นอากาศเข้าไปยังสารละลายให้เกิดลักษณะเป็นฟองตลอดเวลาเพื่อให้เกิดการออกซิไดซ์ของหมู่ซัลไฟด์ โดยติดตั้งปั๊มอากาศขนาดเล็ก (ใช้เวลาอย่างน้อยประมาณ 12 ชั่วโมง) โดยระวังอย่าให้สารละลายระเหยไปหมดในระหว่างที่ฟ่นออกการรักษาระดับของสารละลายให้มีความสูงที่จุดเดิมเสมอ การสังเคราะห์ NTSB ที่เสร็จสมบูรณ์ นั้นสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีแดงไปเป็นสีเหลืองซีด (pale yellow) แสดงถึง

การออกซิไดซ์ที่สมบูรณ์ ถ่ายสารละลายที่ได้ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิดด้วยพาราฟิล์มและปิดทับอีกครั้งด้วยแผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์ เก็บสารละลาย NTSB ที่สังเคราะห์ได้ที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน โดยสารละลายจะมีอายุการใช้งานประมาณ 6 เดือน

6.4 วิธีการคำนวณปริมาณหมู่ซัลไฮดริล (total SH) และหมู่ไดซัลไฟด์ (total SS)

จากกฎของ Beer ที่ว่า $A = \epsilon bC$

โดยที่ C คือ ความเข้มข้นของตัวอย่าง (ในที่นี้คือ Total SH หรือ Total SH+SS)

ϵ คือ ค่า extinction coefficient ($M^{-1}cm^{-1}$)

b คือ ความยาวหรือระยะทางของเซลล์ (cuvette) ที่ใช้วัดตัวอย่างเท่ากับ 1 เซนติเมตร

A คือ ค่าการดูดกลืนแสง

ดังนั้นจะได้ว่า

$$C = \frac{A}{\epsilon b}$$

การคำนวณหาปริมาณ Total SH , Total SH + SS และ SS ได้จากสมการดังต่อไปนี้

$$\mu mol SH/g = 73.57 \times A_{412} \times (D/C)$$

โดยที่ D คือ ค่า Dilution factor

C คือ ความเข้มข้นของตัวอย่าง (มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร)

A_{412} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 412 นาโนเมตร

ส่วนตัวเลข 73.53 ได้จาก $10^6/1.36 \times 10^4$ ซึ่ง 1.36×10^4 คือค่า extinction coefficient ($13,600 M^{-1}cm^{-1}$) (Ellman, 1959) และ 10^6 มาจากการเปลี่ยนหน่วยจากโมลาร์ ให้เป็น ไมโครโมล ต่อ มิลลิลิตร และจากหน่วยมิลลิกรัมของโปรตีนให้อยู่ในหน่วย กรัม ซึ่งอธิบายการคำนวณโดยละเอียดดังสมการข้างล่างนี้

$$C = \frac{A_{412}}{(1.36 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}) \times 1 cm}$$

$$C = 0.7353 \times M \times 10^{-4} A_{412}$$

$$C = 0.7353 \times 10^{-4} \times (mol / L) \times \left(\frac{D}{C(mg / ml)} \right) \times A_{412}$$

$$C = 73.53 \times 10^{-6} \times (10^3 \mu mol / ml) \times \left(\frac{D \times 10^3}{C(g / ml)} \right) \times A_{412}$$

$$C = 73.53 \times \frac{D}{C} (\mu mol / g) \times A_{412}$$

7. การเตรียมสารละลายรีดิวซิงซ์

7.1 สารละลายโซเดียมซัลไฟท์ (Na_2O_3S)

การเตรียมสารละลายโซเดียมซัลไฟท์ (Na_2O_3S) 3 ระดับความเข้มข้น คือ 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร โดยชั่ง Na_2O_3S เท่ากับ 0.063, 0.126 และ 0.189 กรัม (Na_2O_3S น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 126.04 กรัมต่อโมล) เทใส่บีกเกอร์ทั้ง 3 ที่เตรียมไว้ละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำทดลอง)

7.2 สารละลายกรดแอสคอบิก

การเตรียมสารละลายกรดแอสคอบิก 3 ระดับความเข้มข้น คือ 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร โดยชั่งกรดแอสคอบิก 0.088, 0.176 และ 0.264 กรัม (น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 176.13 กรัมต่อโมล) เทใส่บีกเกอร์ ที่เตรียมไว้ ละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำทดลอง)

7.3. สารละลายซีสทีน

การเตรียมสารละลายซีสทีน 3 ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร โดยซีสทีน 0.061, 0.121 และ 0.186 กรัม (น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 121.16 กรัมต่อโมล) เทใส่บีกเกอร์ทั้ง 3 ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ ละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำทดลอง)

8. การปรับค่าพีเอชของน้ำกลั่นเลียนแบบพีเอชของสารรีดิวิงซ์

สารละลายรีดิวิงซ์ 3 ชนิด คือ โซเดียมซัลไฟท์ แอสคอร์บิกแอซิด และ ซีสทีน ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น คือ 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ มีค่าพีเอชที่แตกต่างกัน โดยโซเดียมซัลไฟท์มีค่าพีเอชที่ 9.51-9.63 แอสคอร์บิกแอซิด มีค่าพีเอชที่ 3.07-3.30 และ ซีสทีน มีค่าพีเอชที่ 5.34-5.59 ทำการปรับพีเอชน้ำกลั่นให้เท่ากับพีเอชของสารละลายรีดิวิงซ์ โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับค่าพีเอชของน้ำกลั่นให้เท่ากับพีเอชของสารละลาย โซเดียมซัลไฟท์ และซีสทีน ที่ระดับความเข้มข้น 5-15 มิลลิโมลาร์ ในกรณีของกรดแอสคอร์บิก ให้ใช้สารละลายกรดซิตริกในการปรับค่าพีเอชของน้ำกลั่น จากนั้นนำน้ำกลั่นที่ทำการปรับค่าพีเอช แล้ว ไปใช้แทนสารรีดิวิงซ์ทั้ง 3 ชนิด เพื่อศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อค่าความหนืดของแป้ง และเนื้อสัมผัสของข้าวสุกจากตัวอย่างข้าวเก่าต่อไป

9. การเตรียมสารละลายรีดิวิงซ์ในสารละลายบัฟเฟอร์

หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี ความสามารถในการควบคุมค่าพีเอชของสารรีดิวิงซ์ ให้ใกล้เคียงกับค่าพีเอชของน้ำปกติ (6.0-7.0) จากการทดลองพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะใช้ในการควบคุมค่าพีเอชของสารรีดิวิงซ์ เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่พีเอชเท่ากับ 7.0 ตามวิธีการของ Gomori(1995) ซึ่งเป็นการผสมระหว่างส่วนของสารละลายเอ (ไดโซเดียมฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) เข้มข้น 0.05 โมลาร์) ปริมาตร 30.50 มิลลิลิตร (เตรียมได้โดยชั่งไดโซเดียมฟอสเฟต 7.80 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร) กับ สารละลายบี (โมโนโซเดียมฟอสเฟต ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 19.50 มิลลิลิตร (เตรียมโดยชั่งโมโนโซเดียมฟอสเฟต 8.9 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร) ใช้ละลายสารรีดิวิงซ์แทนน้ำกลั่นปกติ ในการเตรียมตัวอย่างข้าวสุก หรือผสมกับแป้งข้าวแล้วนำไปวัดความหนืดต่อไป

ตารางที่ 8 คุณสมบัติการเกิดเพสท์ของฟลาร์วที่แช่สารละลายโซเดียมซัลไฟฟ์ที่อุณหภูมิและเวลาการแช่ต่างกัน

Sample	Solution	Soaking solution	Peak (RVU)	Breakdown (RVU)	Final Viscosity (RVU)	Setback (RVU)	Pasting Temp (°C)
Fresh	-	-	101.31±1.63 d	40.58±1.10c	125.50±2.96c	64.78±1.54c	89.43±0.46a
Aged	0SS	50°C, 30 min	64.67±3.75a	16.61±0.99a	100.22 ± 3.64a	52.17 ± 0.87a	89.43 ± 0.46a
		50°C, 120 min	73.50±1.54b	17.78±0.27a	114.11±1.39b	58.39±0.17b	90.55±0.85a
		37°C, 360 min	89.28±0.09c	26.83±0.55b	115.53±0.81b	53.08±0.25a	89.95±0.48a
Fresh	-	-	101.31±1.63c	40.58±1.10d	125.50±2.96c	64.78±1.54d	89.43±0.46a
Aged	5SS	50°C, 30 min	73.05±2.28a	20.05±2.42a	108.06±4.53b	55.05±0.54c	89.95±0.95a
		50°C, 120 min	74.44±0.60a	24.72±2.31b	101.76±3.67a	51.92±1.08b	89.42±0.45a
		37°C, 360 min	95.50±0.66b	34.11±0.26c	110.30±1.04b	48.92±0.75a	87.77±1.25a
Fresh	-	-	101.31±1.63d	40.58±1.10c	125.50±2.96d	64.78±1.54d	89.43±0.46b
Aged	10SS	50°C, 30 min	68.50±1.96a	24.03±1.86a	93.86±1.75a	49.39±0.80b	88.38±0.38ab
		50°C, 120 min	75.03±2.29b	23.22±2.30a	106.83±2.83b	55.03±1.21c	89.42 ± 0.89b
		37°C, 360 min	83.47±2.21c	28.95±0.41b	97.81±1.57a	43.95±0.29a	87.28±1.37a

ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันตามแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), Fresh หมายถึงฟลาร์วข้าวใหม่, Aged หมายถึง ฟลาร์วข้าวเก่า, SS หมายถึง สารละลายโซเดียมซัลไฟฟ์ที่ 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Sample	Solution	Soaking solution	Peak (RVU)	Breakdown (RVU)	Final Viscosity (RVU)	Setback (RVU)	Pasting Temp (°C)
Fresh	-	-	101.31±1.63c	40.58±1.10c	125.50±2.96c	64.78±1.54c	89.43±0.46b
Aged	15SS	50°C, 30 min	66.36±1.39a	23.50±2.14a	90.19±2.91a	47.33±0.36b	89.40±1.24b
		50°C, 120 min	68.70 ± 1.53a	23.89 ± 2.68a	93.61 ± 1.98a	48.81 ± 0.47b	89.95 ± 0.48b
		37°C, 360 min	90.42±1.34b	33.75±1.98b	100.70±3.89b	44.03±0.65a	86.67±1.30a

ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันตามแนวดิ่งหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), Fresh หมายถึงฟลาร์วข้าวใหม่, Aged หมายถึง ฟลาร์วข้าวเก่า, SS หมายถึง สารละลายโซเดียมซัลไฟท์ที่ 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์

ประวัติผู้เขียน

นางสาวทานตะวัน ถนอมพลกรัง เกิดเมื่อวันที่ 2 กันยายน 2527 มีภูมิลำเนาอยู่ที่จังหวัด นครราชสีมา สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษาที่โรงเรียนประชารัฐสามัคคี ตำบลสูงเนิน อำเภอ สูงเนิน จังหวัดนครราชสีมา ในปี พ.ศ. 2539 จากนั้นได้เข้าศึกษาในมัธยมต้น และมัธยมปลายที่ โรงเรียนสูงเนิน ตำบลสูงเนิน อำเภอสูงเนิน จังหวัดนครราชสีมา จนสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2546 ได้เข้าต่อศึกษาในหลักสูตรระดับปริญญาตรีสาขาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2549 และในปี พ.ศ. 2550 ได้เข้า ศึกษาต่อในระดับปริญญาโท หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยในระหว่างศึกษาต่อได้ทำหน้าที่ผู้ช่วยสอนในรายวิชา ปฏิบัติการแปรรูปอาหาร 1 วิชาปฏิบัติการแปรรูปอาหาร 2 และ วิชาปฏิบัติแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อ และสัตว์ปีก

ทุน/ รางวัลที่เคยได้รับ

- ปี 2546 นักศึกษาทุนหลวงพ่อกุณ ปริสุทโธ
- ปี 2547-2549 เป็นนักศึกษาทุนไทยบริดจสโตน

ประสบการณ์การทำงาน

- นักศึกษาฝึกงานที่แผนกพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่บริษัทเฟรชมิท ฟู้ด โปรดัก จำกัด จ.นครปฐม (กันยายน-ธันวาคม พ.ศ. 2549)