บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์โปรตีนชนิดต่างๆ

จากการศึกษาโปรตีนจากข้าวทั้ง 9 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวสังข์หยด ข้าวหอมนิล ข้าวเหนียวดำ ข้าวหอมมะลิ 105 ข้าวหอมอุบล ข้าวสินเหล็ก ข้าวหอมมะลิแดง ข้าวเล้าแตก และข้าวหอมกัญญา โดยทำการศึกษาโปรตีนในข้าวเป็น 4 ส่วน ดังนี้

1 ศึกษาโปรตีนชนิดละลายในน้ำ

2 ศึกษาโปรตีนชนิดละลายในสารละลาย 0.1 M NaCl

3 ศึกษาโปรตีนชนิดละลายในตัวทำละลาย 0.1 M HCl

4 ศึกษาโปรตีนชนิดละลายในสารละลายกรดหรือสารละลาย 0.1 M NaOH

จากการศึกษาโปรตีนในข้าวโดยใช้สารสกัดต่างๆ 4 ชนิด คือ น้ำ 0.1 M NaCl 0.1 M HCl และ 0.1 M NaOH นำสารสกัดโปรตีนที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเร็ต พบว่าสารละลาย 0.1 M HCl สามารถละลายโปรตีนในข้าวทั้ง 9 สายพันธุ์ ได้มากที่สุด โดยเฉพาะข้าวหอมนิล ข้าวหอมกัญญา และข้าวหอมอุบล รองลงมาคือ น้ำ สารละลาย 0.1 NaCl และ 0.1 M NaOH ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลาย 0.1 M NaOH ละลายโปรตีนในข้าวเล้าแตก และข้าวหอมมะลิ 105 ได้น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ปริมาณโปรตีนในข้าว 9 สายพันธุ์ ที่สกัดโดยสารละลาย น้ำ 0.1 M NaCl 0.1 M HCl และ 0.1 M NaOH

ชนิดข้าว	ปริมาณโปรตีน(mg/ml)			
	H_2O	NaCl	HCl	NaOH
ข้าวเล้าแตก	15.72	21.27	34.82	5.56
ข้าวหอมมะลิแดง	32.25	37.67	46.07	20.73
ข้าวสังข์หยด	19.38	10.70	39.97	13.96
ข้าวสินเหล็ก	14.23	9.21	28.46	6.91
ข้าวหอมมะลิ 105	38.75	26.42	33.47	5.28
ข้าวเหนียวดำ	23.71	21.00	21.41	9.62
ข้าวหอมกัญญา	24.12	40.79	58.13	15.99
ข้าวหอมอุบล	14.50	12.60	58.13	4.61
ข้าวหอมนิล	3.14	1.82	5.96	2.15

เป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากข้าวหอมนิล มีปริมาณน้อยมาก ส่งผลให้เมื่อนำมาตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าแถบโปรตีนที่ได้มีปริมาณน้อยมาก ไม่ชัดเจนต้องทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้นจะเห็นแถบโปรตีนได้ชัดเจน

4.2 การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดในข้าว 9 สายพันธุ์ โดยวิธี AOAC, 2005

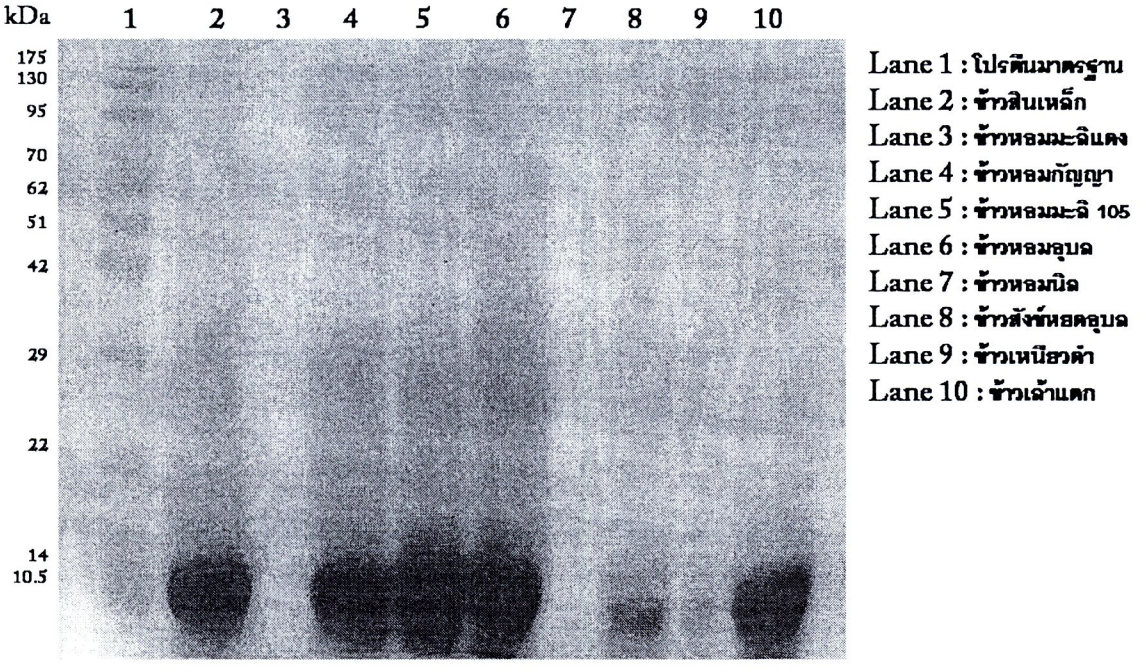
เมื่อนำข้าวทั้ง 9 สายพันธุ์มาวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี AOAC, 2005 พบว่าปริมาณโปรตีนที่พบอยู่ในช่วง 6.84-8.85 กรัมต่อ 100 กรัม โดยพบว่าข้าวหอมนิลปริมาณโปรตีนทั้งหมดมากที่สุดเท่ากับ 8.85 กรัมต่อ 100 กรัม และข้าวสังข์หยดอุบลมีปริมาณโปรตีนทั้งหมดน้อยที่สุดเท่ากับ 6.84 กรัมต่อ 100 กรัม (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในข้าว 9 สายพันธุ์ โดยวิธี AOAC, 2005

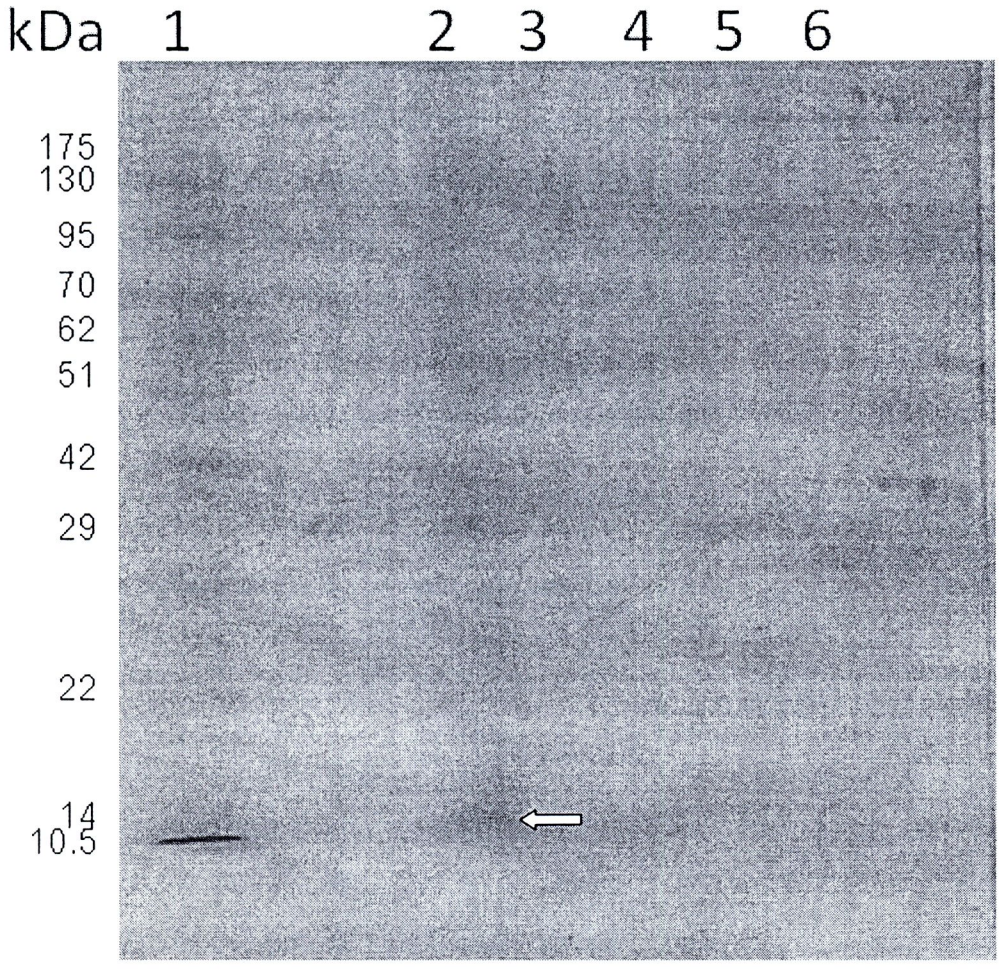
ชนิดข้าว	ปริมาณโปรตีน (g/100g)
1.ข้าวหอมกัญญา	7.69
2 ข้าวสินเหล็ก	7.54
3 ข้าวมะลิแดง	7.76
4 ข้าวหอมอุบล	7.03
5 ข้าวหอมมะลิ 105	8.22
6 ข้าวสังข์หยดอุบล	6.84
7 ข้าวหอมนิล	8.85
8 ข้าวเหนียวดำอุบล	7.84
9 ข้าวเล้าแตก	7.00

4.3 **การหาน้ำหนักโมเลกุลเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน โดยวิธี** SDS- PAGE

เมื่อนำสารสกัดโปรตีนจากข้าวทั้ง 9 สายพันธุ์ มาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย SDS ร้อยละ 10 เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่าโปรตีนในข้าวทั้ง 9 สายพันธุ์ จะให้แถบโปรตีนหลักที่ตำแหน่ง 10.5 kDa และยังพบแถบโปรตีนที่ตำแหน่ง 22-29 29-42 และ 95 kDa ในทุกสายพันธุ์ (รูปที่ 4.1) ยกเว้นข้าวหอมนิลและข้าวหอมมะลิแดงไม่พบแถบโปรตีนอาจจะเนื่องมาจากปริมาณโปรตีนที่พบในข้าวหอมนิลมีปริมาณน้อย และอาจจะมีการย่อยสลายไประหว่างการเก็บ จึงทำการสกัดโปรตีนจากข้าวหอมมะลิแดงและข้าวหอมนิล แล้วทำการวิเคราะห์ SDS-PAGE ทันที ข้าวหอมมะลิแดงพบแถบโปรตีนที่ตำแหน่ง 95 kDa และ 29-42 kDa ส่วนข้าวหอมนิลจะพบแถบโปรตีนหลักที่ตำแหน่ง 10.5 kDa ส่วนช่วงระหว่างน้ำหนักโมเลกุล 22-29 kDa และช่วงระหว่างน้ำหนักโมเลกุล 29-42 kDa ไม่พบ อาจจะเนื่องมาจากปริมาณโปรตีนที่สกัดได้มีปริมาณน้อย (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.1 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากข้าว 9 สายพันธุ์ โดยใช้วิธี SDS-PAGE



รูปที่ 4.2 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากข้าวหอมนิลและข้าวหอมมะลิแดงที่นำมาตรวจสอบโดยใช้วิธี SDS-PAGE ทันที : 1 หมายถึง โปรตีนมาตรฐาน 2 หมายถึง โปรตีนจากข้าวหอมมะลิแดง 3 หมายถึง โปรตีนจากข้าวหอมมะลิแดงเจือจาง 10 เท่า 4, 5 และ 6 หมายถึง โปรตีนจากข้าวหอมนิล

4.4 **การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโน** (amino acid profile)

เมื่อนำข้าวทั้ง 9 สายพันธุ์ ไปวิเคราะห์ชนิดของกรดอะมิโน โดยใช้เครื่อง HPLC พบว่า ในข้าวทั้ง 9 สายพันธุ์ พบกรดอะมิโนชนิดกลูตามิก แอซิด มากที่สุดโดยพบอยู่ในช่วง 1161.70-1608.45 มิลลิกรัม/100 กรัม โดยพบในข้าวหอมนิลมากที่สุดเท่ากับ 1608.45 มิลลิกรัม/100กรัม และพบในข้าวหอมอุบลน้อยที่สุด เท่ากับ 1161.70 มิลลิกรัม/100กรัม ส่วนกรดอะมิโนที่พบน้อยที่สุดคือเมทไทโอนีน โดยพบในช่วง 55.67-189.74 มิลลิกรัม/100กรัม และตรวจไม่พบเมทไธโอนีนในข้าวหอมอุบล เล้าแตก และสังข์หยดอุบล เมื่อแบ่งชนิดของกรดอะมิโนในข้าวเป็นกรดอะมิโนจำเป็นและไม่จำเป็น กรดอะมิโนจำเป็นในข้าวทั้ง 9 สายพันธุ์ เป็นชนิดไลซีน และลิวซีนมากที่สุด โดยเฉพาะในข้าวหอมนิลมีปริมาณไลซีน และลิวซีนมากที่สุด โดยพบว่ามีปริมาณไลซีนเท่ากับ 639.54 มิลลิกรัม/100กรัม และลิวซีนเท่ากับ 716.68 มิลลิกรัม/100กรัม ส่วน

ข้าวหอมอุบล มีปริมาณลิวซีนน้อยที่สุดเท่ากับ 530.85 มิลลิกรัม/100กรัม ข้าวสังข์หยดอุบลมีปริมาณไลซีนน้อยที่สุดเท่ากับ 450.80 มิลลิกรัม/100กรัม (ตารางที่ 4.3)

ส่วนกรดอะมิโนชนิดไม่จำเป็นพบว่า ข้าวหอมนิลมีกลูตามิกแอซิด มากที่สุดเท่ากับ 1608.45 มิลลิกรัม/100กรัม ข้าวหอมอุบลมีกลูตามิก แอซิด น้อยที่สุดเท่ากับ 1161.70 มิลลิกรัม/100กรัม ข้าวหอมนิลมีเมทไธโอนีนมากที่สุดเท่ากับ 189.74 มิลลิกรัม/100กรัม ข้าวหอมมะลิแดงมีเมทไธโอนีนน้อยที่สุดเท่ากับ 55.67 มิลลิกรัม/100กรัม (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.3 ปริมาณกรดอะมิโนชนิดจำเป็นในข้าว 9 สายพันธุ์

ชนิดกรดอะมิโน	ข้าวหอมนิล	ข้าวหอมมะลิ105	ข้าวหอมอุบล	ข้าวเล้าแตก	ข้าวสินเหล็ก	ข้าวหอมกัญญา	ข้าวหอมมะลิแดง	ข้าวสังข์หยดอุบล	ข้าวเหนียวอุบล
	มิลลิกรัม/100 กรัม								
Essential amino acid									
-Isoleucine	301.71	291.95	243.77	230.29	281.26	249.88	222.90	247.12	233.88
- leucine	716.68	681.87	530.85	578.62	606.70	640.16	591.94	567.36	585.04
- Lysine	639.54	583.20	476.57	464.21	516.60	535.02	468.03	450.80	491.08
-Methionine	189.74	97.55	-	-	95.28	100.62	55.67	-	82.17
-Phenylalanine	474.99	466.10	381.05	355.45	394.31	412.57	367.20	357.12	409.64
-Theronine	161.45	154.03	132.5	129.44	139.18	143.13	132.91	121.04	131.10
-Tryptoplan	114.57	143.66	94.54	94.29	101.38	104.06	102.87	88	111.05
-Valine	419.22	397.58	330.15	300.85	372.10	350.82	326.28	316.46	329.27

ตารางที่ 4.4 ปริมาณกรดอะมิโนชนิดไม่จำเป็นในข้าว 9 สายพันธุ์

ชนิดกรดอะมิโน	ข้าวหอมนิล	ข้าวหอมมะลิ105	ข้าวหอมอุบล	ข้าวเล้าแตก	ข้าวสินเหล็ก	ข้าวหอมกัญญา	ข้าวหอมมะลิแดง	ข้าวสังข์หยดอุบล	ข้าวเหนียวอุบล
	มิลลิกรัม/100 กรัม								
Non Essential amino acid									
- Alanine	591.60	556.88	462.22	487.84	510.45	539.83	516.50	497.04	514.63
- Arginine	743.51	771.85	631.08	655.50	679.35	690.05	668.13	626.60	656.15
- Aspartic acid	855.04	845.58	628.86	722.04	740.28	747.88	729.19	669.91	677.72
- Cysteine	114.57	148.96	120.83	122.80	101.38	104.06	102.87	142.09	179.87
- Glutamic acid	1608.45	1553.22	1161.70	1304.72	1352.02	1461.47	1373.30	1260.57	1351.14
- Glycine	261.13	254.46	226.20	207.80	226.66	220.77	220.71	194.89	213.34
- Histidine	281.38	272.38	226.72	218.81	249.96	231.20	212.50	204.89	226.16
- Proline	364.55	334.32	291.48	280.79	323.32	320.08	297.99	273.47	320.23
- Serline	241.17	238.39	201.29	198.88	192.02	202.26	210.24	166.51	176.00
- Tyrosine	305.13	288.40	251.56	223.94	239.76	261.02	225.95	216.10	251.51

4.5 การหาปริมาณสาร Gamma aminobutyric acid (GABA)

จากการวิเคราะห์สาร Gamma aminobutyric acid(GABA) โดยใช้เครื่อง GC/MS พบว่าในข้าว 9 สายพันธุ์ ข้าวหอมนิลมีปริมาณ GABA มากที่สุดเท่ากับ 150.64 มิลลิกรัม/กิโลกรัม รองลงคือ ข้าวหอมกัญญา ข้าวเล้าแตก ซึ่งมี GABA เท่ากับ 48.71 และ 38.27 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งมีมากกว่าส่วนข้าวหอมมะลิ 105 จะพบ GABA เท่ากับ 13.53 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จะเห็นว่ามีจำนวนน้อยกว่าข้าวหอมนิล 11 เท่า(ตารางที่ 4.5) เป็นที่น่าสังเกตว่าในข้าวหอมนิลซึ่งมีปริมาณกรดอะมิโน กลูตามิก แอซิดสูงที่สุดและพบสาร GABA สูงที่สุดด้วย อาจจะเนื่องมาจากกรดอะมิโนชนิดนี้จะเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สาร GABA โดยใช้เอนไซม์ L-glutamic acid decarboxylase และ pyridoxal phosphate เป็น cofactor ในกระบวนการที่เรียกว่า GABA shunt จึงทำให้พบว่าข้าวที่มีกลูตามิก แอซิด สูงจะพบสาร GABA สูงตามไปด้วย

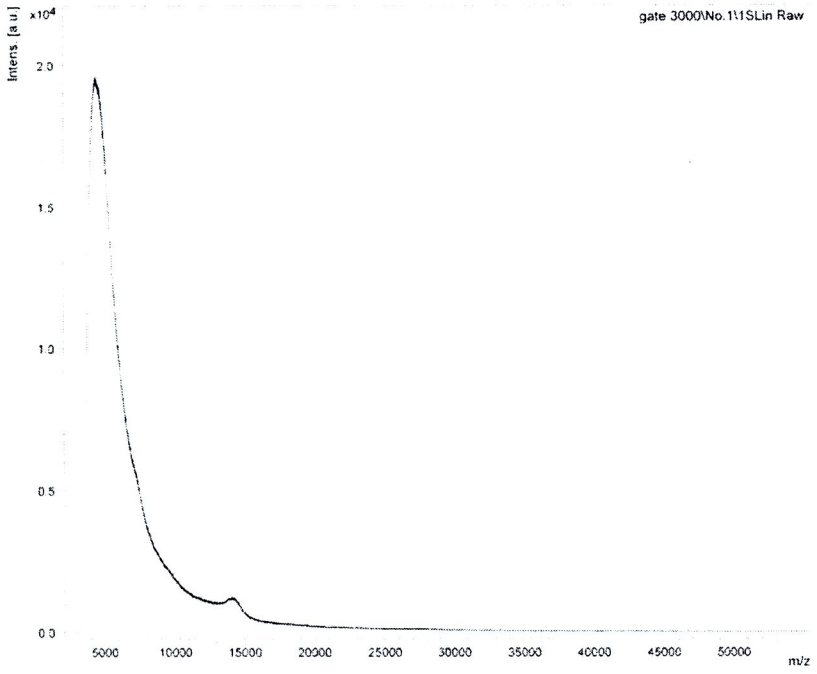
ประโยชน์ของสาร GABA มาใช้ในวงการแพทย์ เพื่อการรักษาโรคเกี่ยวกับระบบประสาทต่างๆ หลายโรค เช่น โรควิตกกังวล โรคนอนไม่หลับ โรคลมชัก เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีผลการวิจัยด้านสุขภาพกล่าวว่า ข้าวกล้องงอกที่ประกอบด้วย GABA มีผลช่วยลดความดันโลหิต ลดอาการอัลไซเมอร์ ลดน้ำหนัก ทำให้ผิวพรรณดี ตลอดจนใช้บำบัดโรคเกี่ยวกับระบบประสาทส่วนกลางได้

ตารางที่ 4.5 ปริมาณสาร Gamma aminobutyric acid (GABA)

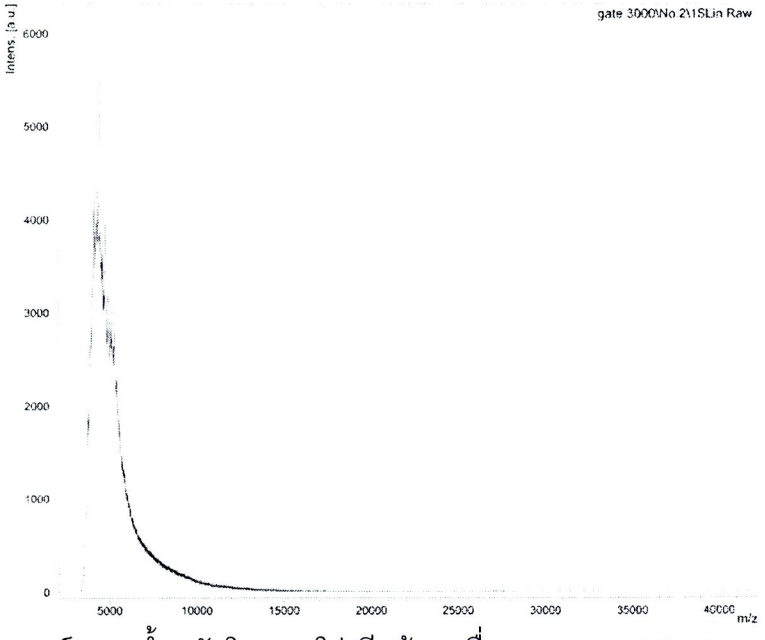
ชนิดข้าว	**ปริมาณ** GABA (mg/kg)
1.ข้าวหอมกัญญา	48.71
2 ข้าวสินเหล็ก	20.58
3 ข้าวมะลิแดง	25.03
4 ข้าวหอมอุบล	17.82
5 ข้าวหอมมะลิ 105	13.53
6 ข้าวสังข์หยดอุบล	20.04
7 ข้าวหอมนิล	150.64
8 ข้าวเหนียวดำอุบล	20.82
9 ข้าวเล้าแตก	38.27

4.6 การตรวจวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดย เครื่อง MALDI-TOF Mass Spectrometry

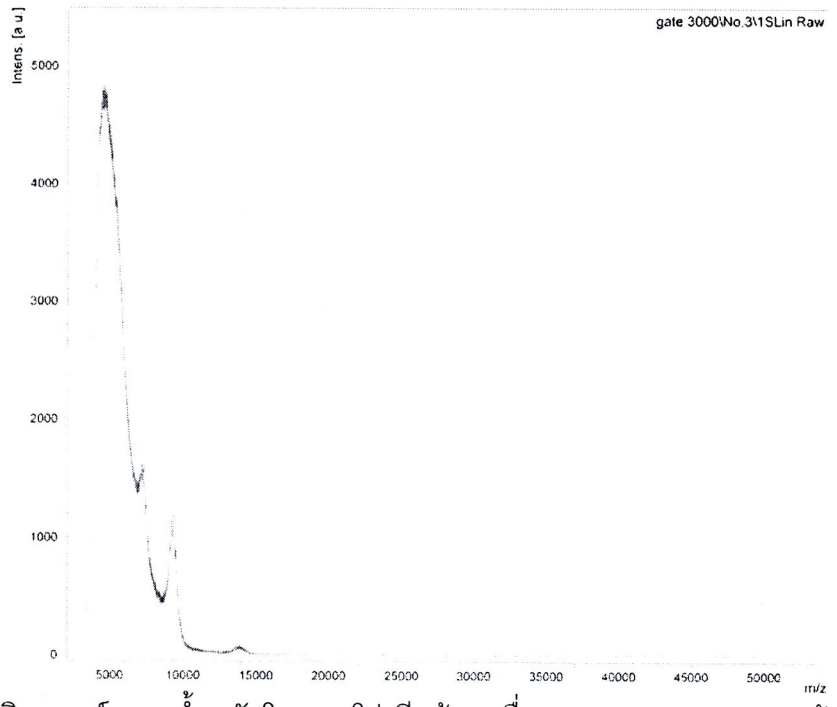
เมื่อนำสารสกัดโปรตีนที่สกัดโดยสารละลายต่างๆ ไปวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยเครื่อง MALDI-TOF Mass Spectrometry พบว่า โปรตีนในข้าวทั้ง 9 สายพันธุ์มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 5- 10 kDa ทุกตัวอย่างที่นำไปวิเคราะห์ให้น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 5-10 kDa ทุกตัวอย่าง (รูปที่ 4.3-4.14) ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ MALDI-TOF Mass Spectrometry มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุลที่วิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE ที่พบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 10.5 kDa เหมือนกันแสดงว่าให้เห็นว่าโปรตีนที่พบในข้าวมีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 10.5 kDa ข้าวสินเหล็ก(รูปที่ 4.3) ข้าวหอมมะลิแดง (รูปที่ 4.4) ข้าวหอมกัญญา (รูปที่ 4.5) ข้าวหอมมะลิ 105(รูปที่ 4.6) ข้าวหอมอุบล (รูปที่4.7) ข้าวหอมนิล สกัดด้วยน้ำ (รูปที่ 4.8) ข้าวสังข์หยดอุบล (รูปที่ 4.9)ข้าวเหนียวดำ สกัดด้วยน้ำ (รูปที่ 4.10) ข้าวเล้าแตก สกัดด้วยน้ำ (รูปที่ 4.11) ข้าวหอมมะลิแดง สกัดด้วย 0.1 M NaOH (รูปที่ 4.12) ข้าวหอมนิล สกัดด้วย 0.1 M NaOH (รูปที่ 4.13) ข้าวเหนียวดำ สกัดด้วย 0.1 M NaOH (รูปที่ 4.14)



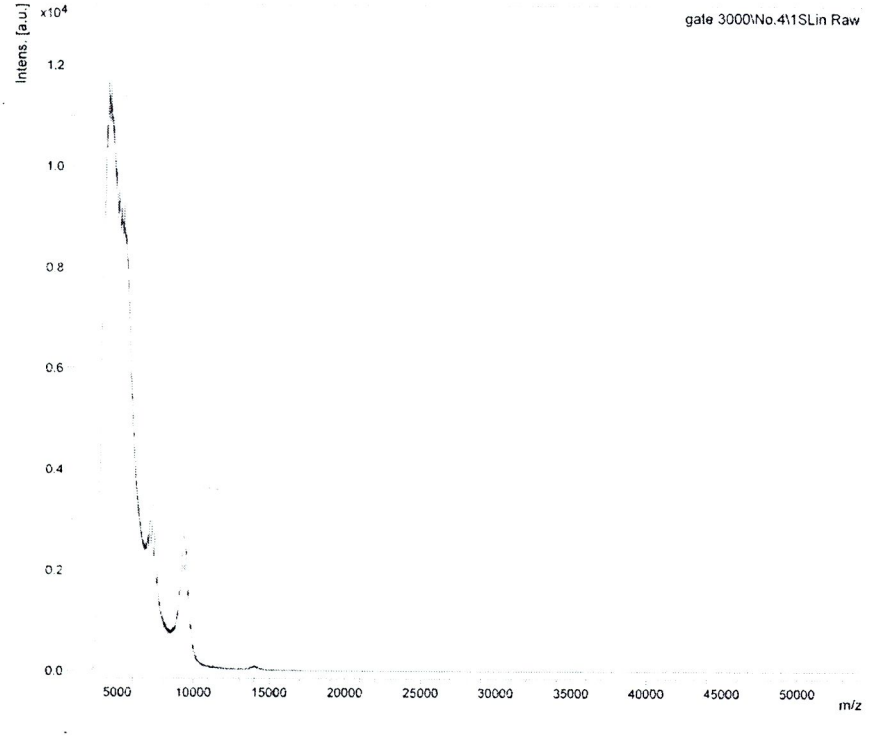
รูปที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ขนาดน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS จากข้าวสินเหล็กที่สกัดด้วยน้ำ



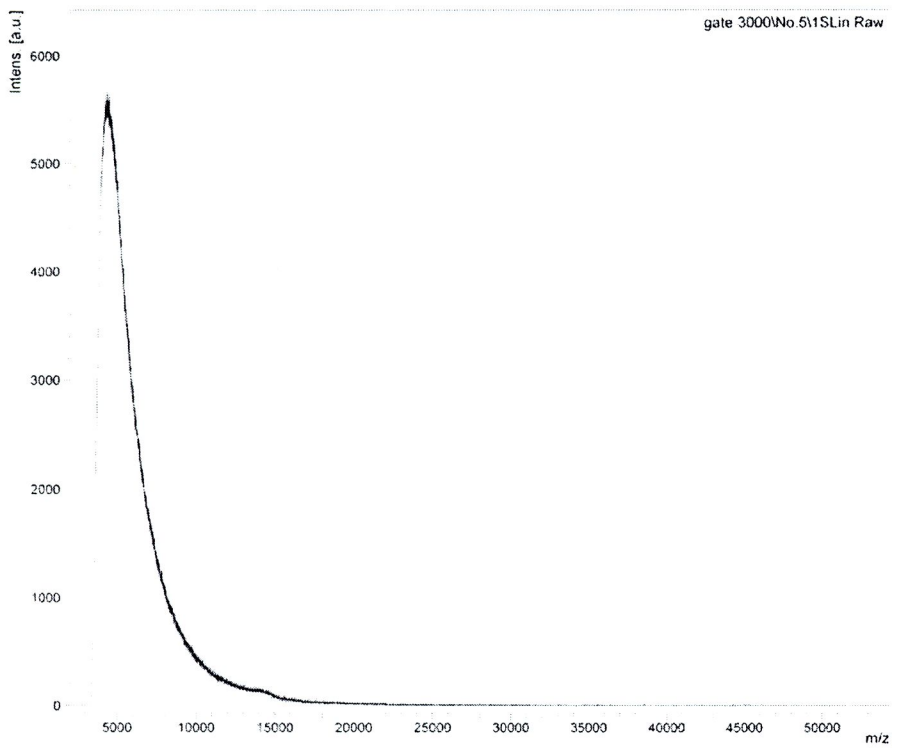
รูปที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ขนาดน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS จากข้าวหอมมะลิแดงสกัดด้วยน้ำ



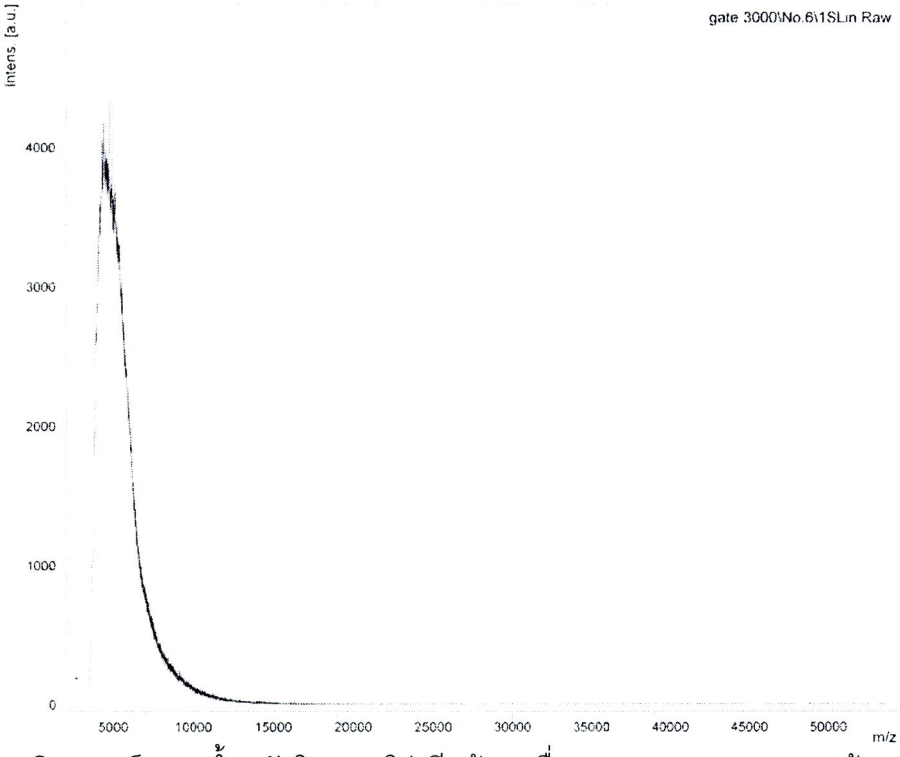
รูปที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ขนาดน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS จากข้าวหอมกัญญาสกัดด้วยน้ำ



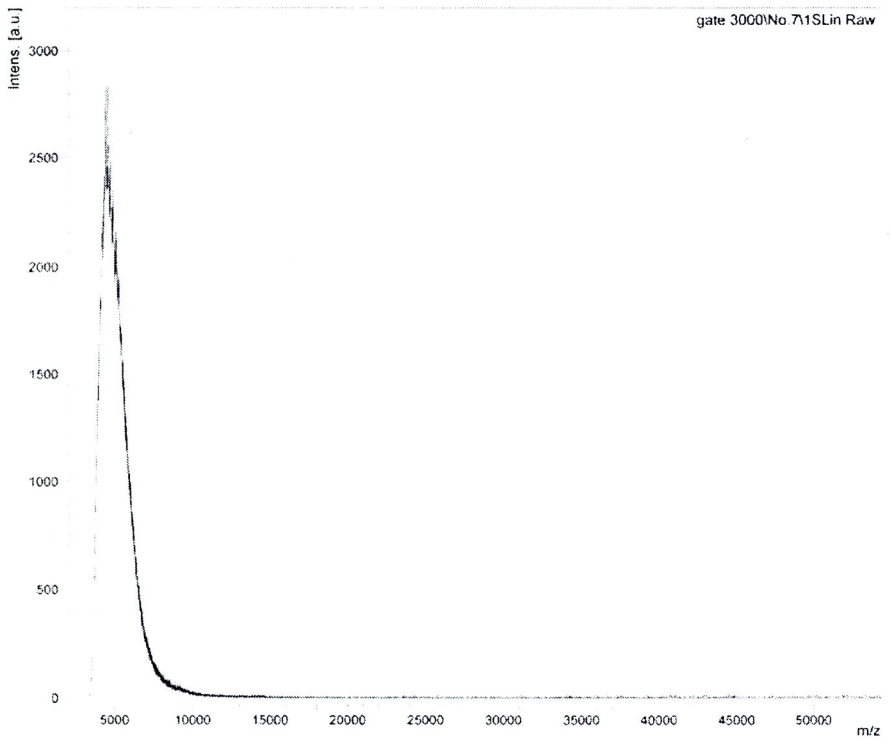
รูปที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ขนาดน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS จากข้าวหอมมะลิ 105 สกัดด้วยน้ำ



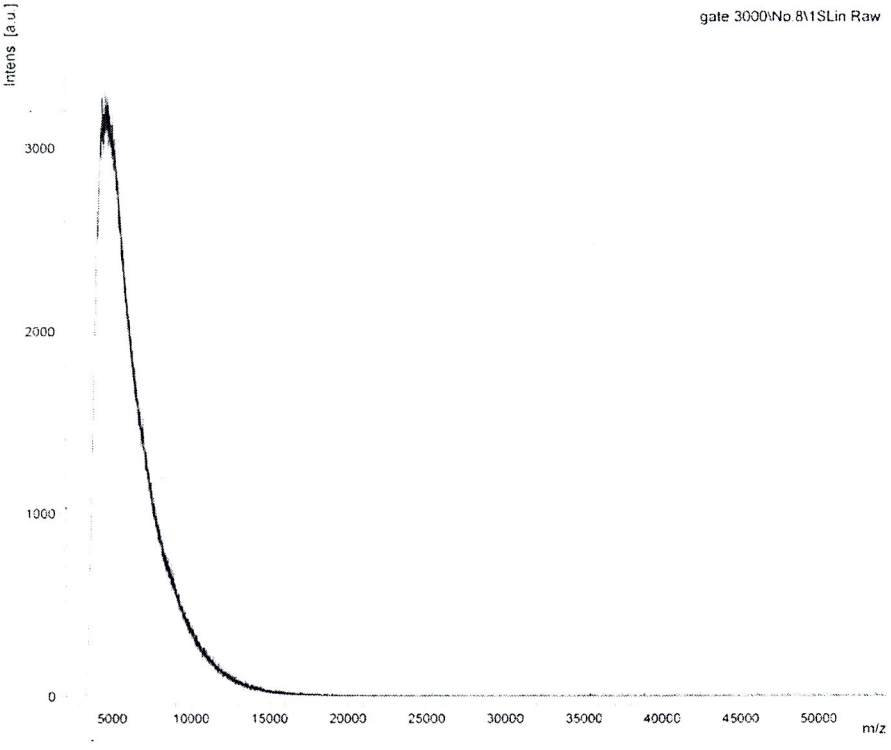
รูปที่4.7 ผลการวิเคราะห์ขนาดน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS จากข้าวหอมอุบล สกัดด้วยน้ำ



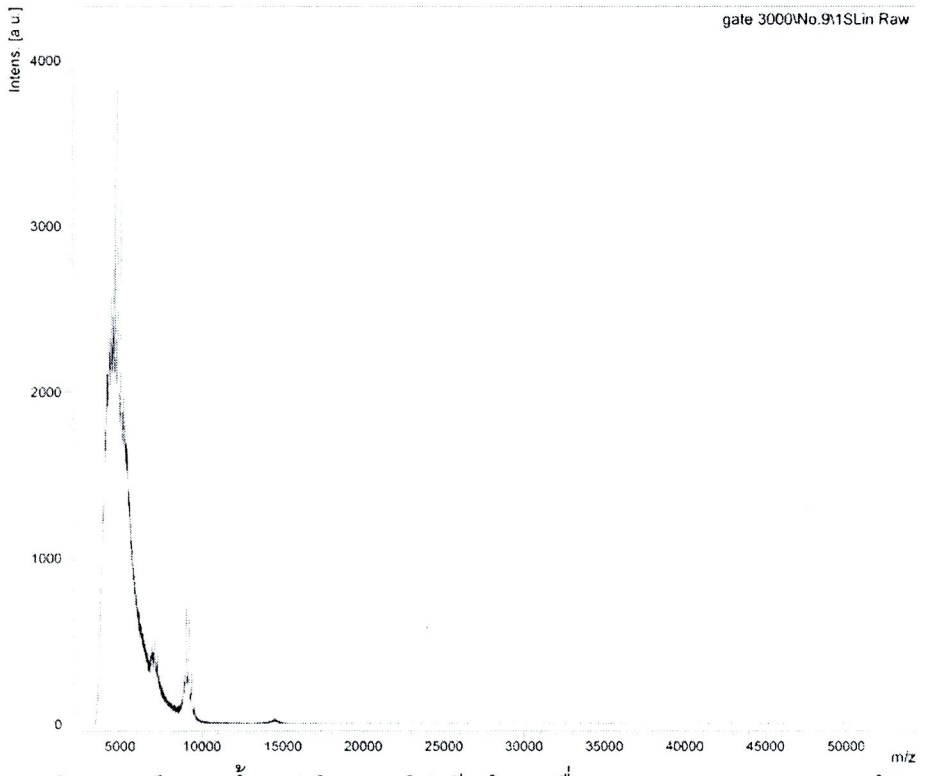
รูปที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ขนาดน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS จากข้าวหอมนิล สกัดด้วยน้ำ



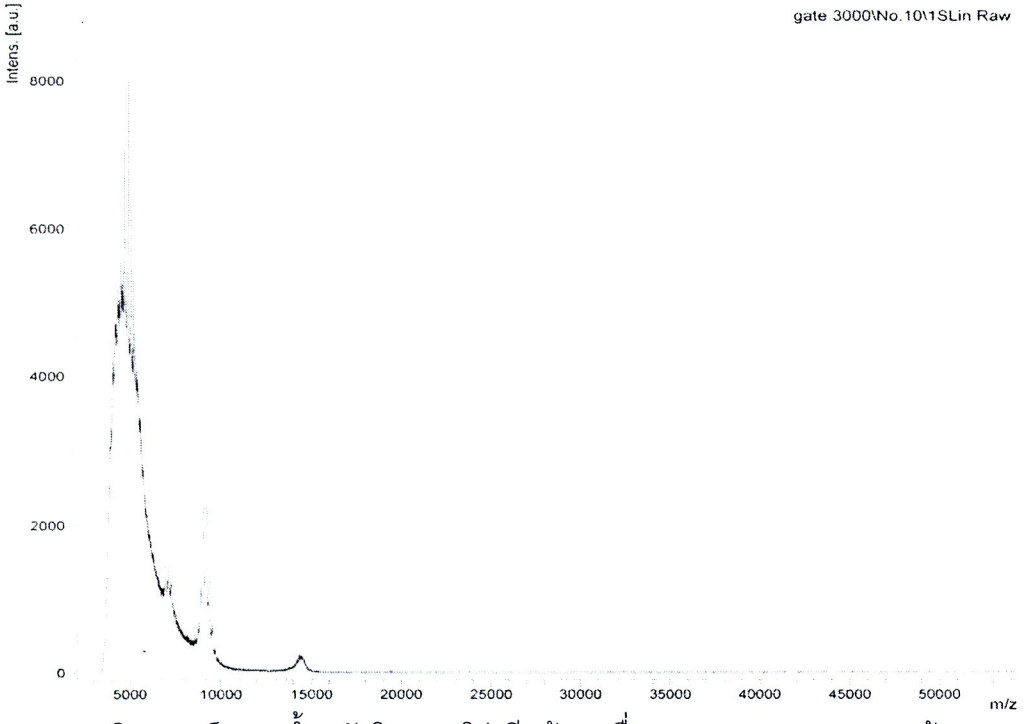
รูปที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์ขนาดน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS จากข้าวสังข์หยดอุบลสกัดด้วยน้ำ



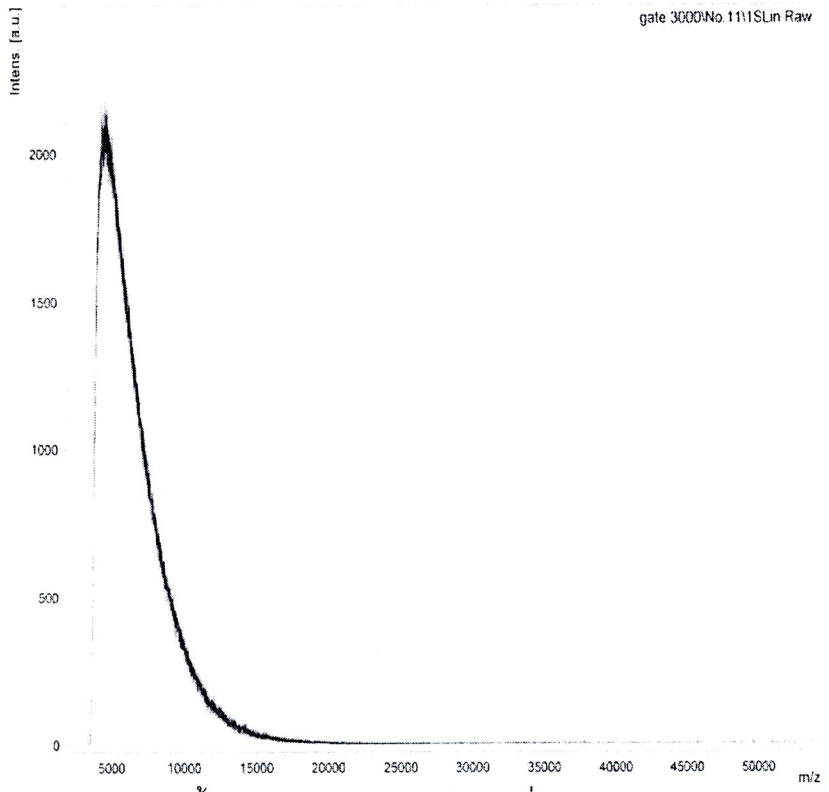
รูปที่ 4.10 ผลการวิเคราะห์ขนาดน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS จากข้าวเหนียวดำสกัดด้วยน้ำ



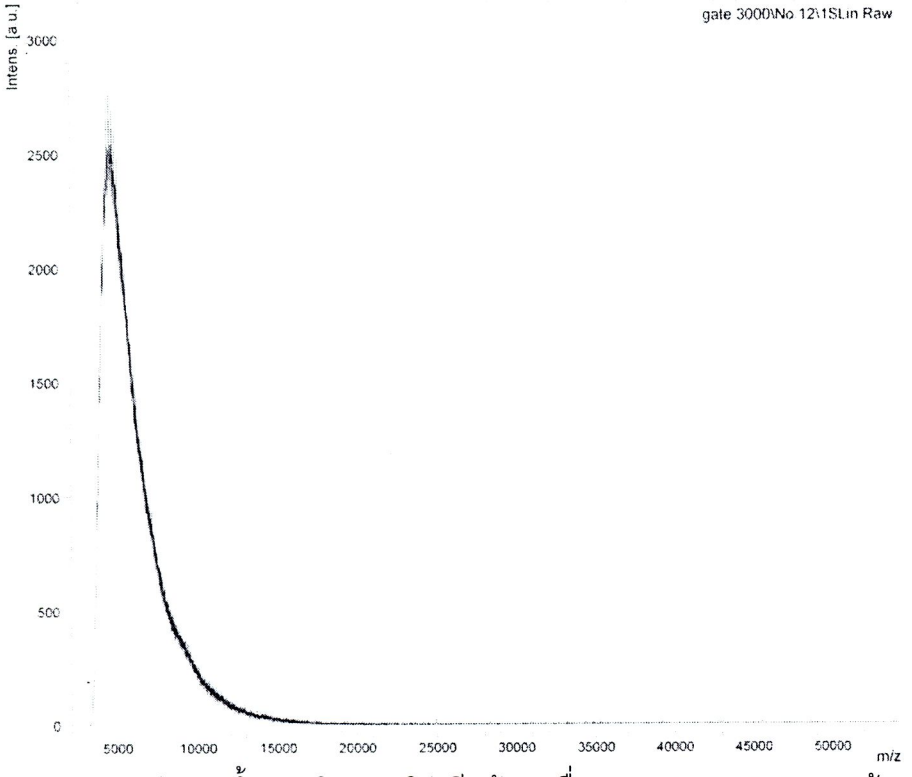
รูปที่ 4.11ผลการวิเคราะห์ขนาดน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS จาก ข้าวเล้าแตกสกัดด้วยน้ำ



รูปที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์ขนาดน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS จากข้าวหอมมะลิแดง สกัดด้วย 0.1 M NaOH



รูปที่ 4.13 ผลการวิเคราะห์ขนาดน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS จากข้าวหอมนิลสกัดด้วย 0.1 M NaOH



รูปที่ 4.14 ผลการวิเคราะห์ขนาดน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS จากข้าวเหนียวดำสกัดด้วย 0.1 M NaOH