การประชุมวิชาการสมาคมวิศวกรรมเกษตรแห่งประเทศไทย
ระดับชาติ ครั้งที่ 20 วันที่ 14-15 มีนาคม 2562
ณ โรงแรมฮาร์ดร็อค พัทยา จังหวัดชลบุรี
Available online at www.tsae.asia

ความเป็นไปได้ในการตรวดวัดโปรตีนรวมในถั่วเหลืองโดยใช้เทคนิคการเรืองแสง

Possibility to detect crude protein in soybean using fluorescence technique.

ปกรณ์ สุวรรณโสภณ[1], วิบูลย์ ช่างเรือ[2]*, เยาวลักษณ์ จันทร์บาง[1], ธนะชัย พันธ์เกษมสุข[1]
Pakorn Suwannasopon[1], Viboon Changrue[2]*, Yaowaluk Chanbang[1], Tanachai Pankasemsuk[1]

[1]คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่, 50200
[1] Faculty of Agriculture Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200
[2] คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่, 50200
[2] Faculty of Engineering Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200
*Corresponding author: Tel: +66-8-1594-1946, E-mail: viboon@eng.cmu.ac.th

บทคัดย่อ

การตรวจวัดปริมาณโปรตีนรวมในถั่วเหลืองด้วยเทคนิคการเรืองแสงเป็นการตรวจที่ประยุกต์วิธีการแบรดฟอร์ดโดยการใช้สารละลายแมสซี่บริลเลี่ยนบลูจี-250 ในการจับกับโมเลกุลของโปรตีนเปลี่ยนเป็นโครงสร้างสารประกอบเชิงซ้อนแบบวงแหวนเพื่อให้เหมาะสมต่อการเกิดการเรืองแสง ทั้งนี้การทดลองเริ่มจาก 2 ส่วนคือ การทดสอบการเรืองแสงของการนำสารละลายระหว่างโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายแบรดฟอร์ดและการหาความยาวคลื่นที่เกิดพีคของการเรืองแสงที่เกิดขึ้น จากนั้นเตรียมสารละลายโปรตีนในความเข้มข้นต่างกัน (0.25:0.75, 0.125:0.875, 0.062:0.938 และ 0.0153:0.985 โดยปริมาตร) และตรวจดูค่าการเกิดการเรืองแสงในสารละลายระหว่างโปรตีนกับสารละลายแบรดฟอร์ด ผลการทดลองพบว่า โครงสร้างดังกล่าวเกิดพีคที่ความยาวคลื่น 702.95 nm และค่าการเรืองแสงที่เกิดขึ้นมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$ ตามปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในสารละลาย นั่นแสดงว่ามีความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เทคนิคการเรืองแสงที่ประยุกต์จากวิธีการแบรดฟอร์ดในการตรวจสอบปริมาณโปรตีนรวมได้

คำสำคัญ: ถั่วเหลือง, โปรตีน, ฟลูออเรสเซนต์

Abstract

The measurement of total protein content in soybeans by fluorescence technique was applied to Bradford method. Massey Brilliant Blue-250 solution was used to bind protein molecules to be a ring complex structure. This structure is suitable for the fluorescence occurance. The experiment began with 2 parts; the fluorescence testing of a solution between proteins that reacted with the Bradford solution and finding the wavelength that caused the peak of the incident. Then protein solution was dissolved in different concentrations (0.25:0.75, 0.125:0.875, 0.062:0.938 and 0.015:0.985 by volume). Those protein solution ratios were examined the fluorescence value for test the difference of the fluorescence. The results showed that the structure produces peak at a wavelength of 702.95 nm. According to dissolving proteins in various proportions, it was found that the fluorescence values were statistically significant different at the confidence level $p<0.05$ according to the amount of protein contained in the solution. So the application of fluorescence techniques modified from the Bradford method was possible to determine the total protein content.

Keywords: soybean, protein, fluorescence

1 บทนำ

เมล็ดถั่วเหลืองเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ ดังจะเห็นได้จากในอุตสาหกรรมอาหาร ถั่วเหลืองถูกนำมาเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมภายอาหารในประเทศหลายชนิด เช่น น้ำมันถั่วเหลือง ซีอิ๊ว เต้าหู้ โปรตีนเกษตรและอื่นๆ ซึ่งในอดีตที่ผ่านมารัฐบาลมีนโยบายเร่งรัดการผลิตเมล็ดถั่วเหลืองให้เพียงพอใช้ในประเทศ โดยดำเนินการเร่งรัดการผลิตควบคู่กับการกำหนดมาตรการควบคุมการนำเข้าเมล็ดถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์เพื่อให้ความคุ้มครองเกษตรกรผู้ผลิตเมล็ดถั่วเหลือง ส่งผลให้ปริมาณ ผลผลิตเมล็ดถั่วเหลืองในประเทศเพิ่มขึ้นมาโดยตลอด แต่ยังไม่เพียงพอกับความต้องการใช้ภายในประเทศ

TSAE 2019 Conference

(Phaouplack, 2015). ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าตั้งแต่ปี ค.ศ. 2011 ถึงปี ค.ศ. 2016 ประเทศไทยได้นำเข้าเมล็ดถั่วเหลือง เพิ่มขึ้น 48% (Office of Agricultural Economics, 2018)

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางด้านโภชนาการในเมล็ดถั่วเหลืองพบว่า เมล็ดถั่วเหลืองมีคุณค่าทางโภชนาการมากมายไม่ว่าจะเป็น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน รวมถึงแร่ธาตุ โดยในเมล็ดถั่วเหลืองพบโปรตีนสูงถึง 36-45 % (Liu, 1997) ดังนั้นการวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบปริมาณของโปรตีนจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นที่จะบ่งชี้ถึงคุณภาพของเมล็ดถั่วเหลืองก่อนผ่านกระบวนการแปรรูป

การวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบปริมาณโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลืองโดยมากนิยมวิเคราะห์โดยใช้วิธีคเจลดาห์ล (Kjeldahl method) โดยใช้หลักว่าไนโตรเจนที่มีอยู่ในสารอินทรีย์ส่วนมากมาจากโปรตีน ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างสามารถนำมาคำนวณเป็นปริมาณโปรตีนได้ (Apenten, 2002) แต่ข้อเสียคือการใช้เวลานานในการวิเคราะห์ในขั้นตอนย่อยตัวอย่าง (Nielseh, 2010) จากความสำคัญดังกล่าว การศึกษาการประยุกต์ใช้วิธีการใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนที่ดัดแปลงจากวิธี Bradford method ในการวิเคราะห์โปรตีนโดยรวมในถั่วเหลืองจะช่วยให้บริษัทหรือหน่วยงานตรวจสอบคุณภาพสามารถลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ ค่าใช้จ่ายในการซื้อสารเคมีลดลงอีกทางหนึ่ง

1.1 ถั่วเหลือง

ถั่วเหลือง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max* (L.) Merrill อยู่ใน Kingdom planta, Divition Spermatophyta, Class Dicotyledoneae, Order Polypetalae, Family Leguminosae, Genus Glycine, Species max (Apiprun, 2003)

คุณประโยชน์ในถั่วเหลือง ถั่วเหลืองประกอบไปด้วยโปรตีน ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพดี สามารถทดแทนเนื้อสัตว์ได้เพราะมีกรดแอมิโนที่จำเป็น (essential amino acid) ทั้งชนิดและปริมาณที่สมดุลมากกว่าถั่วชนิดอื่น นอกจากนี้ยัง มีน้ำมันร้อยละ 12-20 น้ำมันจากถั่วเหลือง มีส่วนประกอบของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวซึ่งเป็นกรดไขมันที่จำเป็น (essential fatty acid) ต่อร่างกาย ได้แก่ กรดลิโนเลอิก (linoleic acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันโอเมกา-3 (omega-3 fatty acid) และกรดลิโนเลนิก (linolenic acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันโอเมกา-6 (omega-6 fatty acid) ในปริมาณสูงอีกด้วย (Pukpatdee, 2003)

1.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด

หลักการของวิธีการแบรดฟอร์ดเริ่มจาก โปรตีนในสารละลายจะจับกับสาร Coomassie Brilliant blue G-250 ด้วยแรงยึดเหนี่ยวไฮโดรโฟบิกและแรงเหนี่ยวไอออนิกร่วมกันประจุบวกที่แขนงข้างของกรดอะมิโนโดยเฉพาะส่วนที่เหลือของอาร์จีนีนมีบทบาทสำคัญในการจับกับโมเลกุลของสีซึ่งมีประจุลบ โมเลกุลของสีในสภาพที่มีประจุลบให้สีน้ำเงิน แต่เมื่อรับโปรตอนแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีแดงส้มอ่อนๆ การจับของสีกับโปรตีนในสภาวะที่เป็นกรดจึงช่วยคงสภาพโครงสร้างประจุลบของสีไว้และให้สีน้ำเงินที่ เข้มขึ้นตามปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ นอกจากนี้ยัง เปลี่ยนสมบัติการดูดแสงของสีจากเดิมที่มีค่า λmax เป็น 465 นาโนเมตร ไปเป็น 595 นาโนเมตร (Bradford, 1976)

1.3 ทฤษฎีการเรืองแสง

ฟลูออเรสเซนต์สเปคโตรสโคมิเตอร์ (fluorescence spectrophotometer) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์คุณสมบัติของสารโดยการอาศัยการดูดกลืนรังสียูวีที่ส่งผลให้โมเลกุลถูกกระตุ้นและมีการสั่นภายในโมเลกุลจากระดับชั้นพลังงานสถานะพื้น (ground state) ไปสู่ระดับชั้นพลังงานที่สูงขึ้น (excited state) เรียกว่าการดูดพลังงาน (excite energy) โมเลกุลที่มีการเคลื่อนที่ไปอยู่ในระดับของชั้นพลังงานที่สูงจะไม่มีความเสถียร จึงมีการปลดปล่อยพลังงานและตกลงมาในชั้นระดับพลังงานที่ต่ำกว่า พลังงานที่โมเลกุลปลดปล่อยจากระดับชั้นพลังงานกระตุ้นชั้นที่หนึ่งสู่ระดับชั้นพลังงานสถานะพื้นจะทำให้เกิดการคายโฟตอน (emission of photon) ทำให้เกิดสเปกตรัมในช่วงฟลูออเรสเซนต์ ณ ค่าพลังงานที่กระตุ้นที่จำเพาะของสารแต่ละชนิด (Lakowicz, 2006).

ในงานวิจัยทางด้านการใช้พลังงานความร้อนในการสกัดโปรตีนในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบก่อนกระบวนการสกัด ขั้นตอนระหว่างกระบวนการสกัด และขั้นตอนในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบก่อนกระบวนการวัด โดยในขั้นตอนแรก Badrawy. et. al (2016) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนโดยใช้เทคนิคการให้ความร้อนในกระบวนการคั่วในเมล็ดถั่วลิสง พบว่าการใช้เทคนิคการให้ความร้อนในการคั่วสามารถที่จะสกัดโปรตีนได้มากกว่าการคั่วแบบทั่วไปและแบบที่ไม่ผ่านกระบวนการคั่ว ทั้งนี้ยังพบว่าระยะเวลาในการคั่วเพิ่มขึ้นมีผลทำให้สามารถสกัดโปรตีนได้เพิ่มขึ้นอีกด้วย Rizki. et. al., 2015 การใช้พลังงานความร้อนในขั้นตอนระหว่างการสกัด โดยทั่วไปแล้วการสกัดโปรตีนที่นิยมกันมักใช้วิธีสกัดด้วย sodium hydroxide โดยมีการปรับความเป็นกรดด่างรวมถึงอุณหภูมิเพื่อให้เกิดสภาวะเหมาะสมในการสกัด (Boukroufa *et. al.*, 2017) โดย Osman และ Sarkadi (1990) ได้ศึกษาการสกัดโปรตีนจากเมล็ด lupine พบว่าการใช้ sodium hydroxide ความเข้มข้น 0.1 N ในสัดส่วนเมล็ดต่อสารละลายเท่ากับ 1:100 ระยะเวลาสกัด 30 นาที สามารถสกัดโปรตีนออกมาได้ 79% ซึ่งมากกว่าการใช้เกลือและน้ำเปล่าในการสกัด ในขั้นตอนการวิเคราะห์ Previte *et al.*, (2006) ได้เพิ่มประสิทธิภาพวิธีการวิเคราะห์โปรตีน ด้วยวิธี BSA โดยใช้ silver nanostructures ซึ่งเป็นสารเคมีเพิ่มประสิทธิภาพ (chemiluminescent species) โดยสารตัวนี้ทำให้เกิด photon flux มากกว่า 50 fold ร่วมกับการใช้ความร้อนในการเร่งปฏิกิริยาการจับตัวของสาร ซึ่งผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี BSA แบบเดิม พบว่า วิธี

TSAE 2019 Conference

BSA ที่ใช้ silver nanostructures ร่วมกับการให้ความร้อนทำให้ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเพียง 2 นาที ซึ่งวิธี BSA เดิมใช้เวลาในการวิเคราะห์ถึง 80 นาที ทั้งนี้ยังพบว่าค่าปริมาณของโปรตีนที่วิเคราะห์ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ($P \geq 0.05$) อีกด้วย

ในทางอุตสาหกรรมอาหารได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคนี้โดย Karoui *et. al.*, (2006) ได้ทำการตรวจสอบความสดของไข่ด้วยวิธี fluorescence โดยวิเคราะห์จากปริมาณของ tryptophan ซึ่งกรดอะมิโนชนิดหนึ่งในโปรตีน albumens พบว่าเมื่อมีระยะเวลาในการเก็บนานขึ้นมีผลทำให้ค่า fluorescence intensity ลดลง ทั้งนี้การใช้เทคนิคการเรืองแสงมีข้อดีคือ วิธีการเรืองแสงมีความไวและความจำเพาะมากกว่าวิธี ความดูดกลืน (absorbance) แต่อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวมีกระบวนการทางเคมี ชนิดของสารที่ทำให้เกิดการ fluorescence จำกัด

2 อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่าง โดยขั้นตอนทั้งหมดเริ่มจากถั่วเหลืองที่นำมาวิเคราะห์เป็นถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 นำมาจากสหกรณ์อำเภอแม่แตง จำนวน 90 กิโลกรัม แล้วนำมาร่อนผ่านตะแกรงขนาด 27 mesh จากนั้นแบ่งใส่ถุง polyethylene ที่มีความหนา 0.5 มิลลิเมตรแล้วจัดเก็บในที่ทึบแสง

2.2 การสกัดโปรตีน

จากนั้นสกัดโปรตีนโดยชั่งตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองที่บดแล้วปริมาณ 10 กรัมแล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.4 N ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (Osman and Sarkadi, 1990)แล้วปรับความเป็นกรดด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.5 M ให้ได้ pH เท่ากับ 12.5 จากนั้นทำการสกัดเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้เครื่องกวนความเร็วใบพัด 80 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการแยกสารละลายโดนการหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 นาที ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ pH 7.5 แล้วกรองด้วยกระกาษกรองเบอร์ 1 (Valenzuela *et. al.*, 2013)

2.3 การทดสอบการวัดด้วยวิธีการเรืองแสง

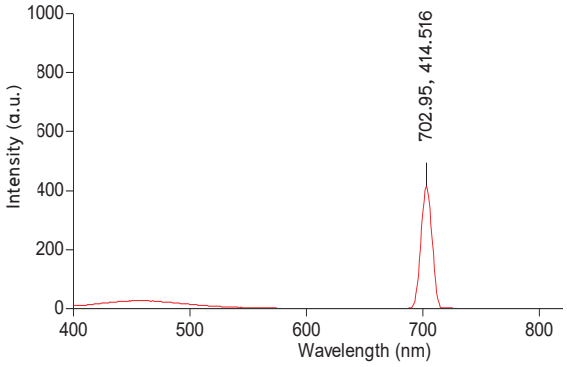
ในการทดสอบสมบัติการเกิดการเรืองแสงของสารละลายโปรตีนหลังทำปฏิกิริยากับสารละลายแบรดฟอร์ดด้วยวิธีการสแกนพีคของ fluorescent ทำโดยละลายสารละลายโปรตีน pH 7.5 กับน้ำกลั่น pH 7.5 ในสัดส่วน 0.062:0.938 (V/V) จากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 0.1 ml แล้วเติมสารละลายแบรดฟอร์ดลงไปปริมาตร 5 ml ทิ้งไว้ 15 นาทีเพื่อรอปฏิกริยาสมมูล ทำการดูดสารละลายลงในควอร์ตคิวเวท (Quartz Cuvette) ปริมาตร 3.5 ml ทำการควบคุมอุณหภูมิของสารละลายให้ได้ 4°C แล้วนำไปสแกนด้วยเครื่อง fluorescence spectrophotometer โดยใช้โหมดสแกนพีค fluorescent เพื่อพิสูจน์ว่าโครงสร้างการจับตัวดังกล่าวสามารถเกิด fluorescent ได้หรือไม่ จากนั้นทำการละลายสัดส่วยระหว่างสาระลายและน้ำกลั่น pH 7.5 เป็น 0.25:0.75, 0.125:0.875, 0.062:0.938 และ 0.015:0.985 (V/V) แล้วนำไปสแกนหาค่าความยาวคลื่นของ fluorescent จากนั้นทำการเปรียบเทียบค่าความเข้ม (intensity) ของ fluorescent เพื่อตรวจสอบว่าค่า fluorescent ที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันหรือไม่

2.4 การวิเคราะห์ผล

ค่าความเข้ม (intensity) ของการเรืองแสงในแต่ละปัจจัยจะถูกเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธีการทางสถิติแบบ Completely Randomized Design (CRD) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 23 ประเทศสหรัฐอเมริกา

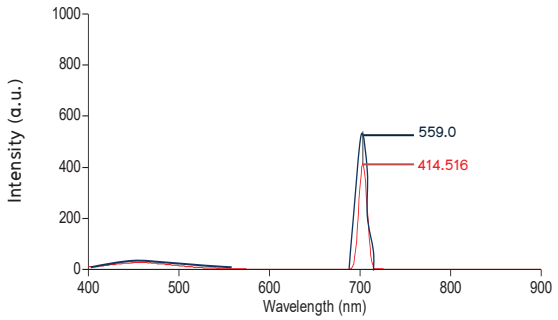
3 ผลและวิจารณ์

ผลจากการใช้เครื่อง fluorescence Spectrophotometer ในการสแกนเพื่อนทดสอบว่าโครงสร้างการจับตัวของสารละลายโปรตีนและสารละลายแบรดฟอร์ดมีความสามารถในการเกิด การเรืองแสงได้หรือไม่ ซึ่งผลการทดสอบพบว่าโครงสร้างโมเลกุลดังกล่าวเกิดค่าการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 702.95 นาโนเมตร ดังภาพที่ 3.1 ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างดังกล่าวเป็นโครงสร้างที่จับตัวเป็นแบบวงแหวน (benzene rings) (Lakowicz, 2006) ซึ่งคุณสมบัติของสารดังกล่าวอาศัยการดูดกลืนรังสียูวีที่ส่งผลให้โมเลกุลถูกกระตุ้นและมีการสั่นภายในโมเลกุลจากระดับชั้นพลังงานสถานะพื้น (ground state) ไปสู่ระดับชั้นพลังงานที่สูงขึ้น (excited state) เรียกว่าการดูดพลังงาน (energy absorption) ทั้งนี้โมเลกุลที่มีการเคลื่อนที่ไปอยู่ในระดับของชั้นพลังงานที่สูงจะไม่มีความเสถียรจึงมีการปลดปล่อยพลังงานและตกลงมาในชั้นระดับพลังงานที่ต่ำกว่า พลังงานที่โมเลกุลปลดปล่อยจากระดับชั้นพลังงานกระตุ้นชั้นที่หนึ่งสู่ระดับชั้นพลังงานสถานะพื้นจะทำให้เกิดการคายโฟตอน (emission of photon) ทำให้เกิดสเปกตรัมในช่วงฟลูออเรสเซนต์ ณ ค่าพลังงานที่กระตุ้นที่จำเพาะของสารแต่ละชนิดทั้งนี้โครงสร้างการจับตัวดังกล่าวเป็นโครงสร้างที่เหมาะสมต่อการเกิดการเรืองแสง (Jameson, 2014)



ภาพที่ 3.1 กราฟสแกนด้วยเครื่อง Fluorescence Spectrophotometer ของโมเลกุลกรดอะมิโนกับสารละลายแบรดฟอร์ด

TSAE 2019 Conference



ภาพที่ 3.2 กราฟแสดงความแตกต่างของปริมาณโปรตีนกับค่า fluorescence ที่เกิดขึ้น

การทดลองโดยการเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนผลของการสแกนด้วยเครื่อง fluorescence spectrophotometer พบว่าพีคของกราฟเกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น702.95 นาโนเมตร ดังภาพที่ 3.1 และเมื่อสารละลายมีความเข้มข้นของโปรตีนต่างกันพบว่า ค่าความเข้มของ fluorescence ที่ได้แตกต่างกัน ดังกราฟที่ 3.2

จากผลการเตรียมสารละลายโปรตีนหลังจากการเติมสารละลายแบรดฟอร์ดในสัดส่วนต่างๆ มีผลทำให้แขนงของกรดอะมิโนชนิด arginine tyrosine tryptophan histidine และ phenylalanine จับกับสารละลายคูแมสซี่บริลเลี่ยนบลูจี-250 ด้วยแรงยึดเหนี่ยวไฮโดรโฟบิกและแรงยึดเหนี่ยวไอออนนิกรวมกันเกิดเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนที่เรียกว่า blue complex ทำให้สีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน (Bradford, 1976) โดยภาพที่ 3.3 เป็นการแสดงระดับความเข้มสีตามสัดส่วนของปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้น

0.25:0.75 0.125:0.875 0.062:0.938 0.015:0.985

ภาพที่ 3.3 ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนหลังจากจับตัวกับโมเลกุลของสารละลายแบรดฟอร์ด

ทั้งนี้พบว่า ปริมาณโปรตีนแปรผันตรงกับสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นโดยใน treatment ที่มีส่วนของสารละลายโปรตีนต่อน้ำสูง ค่าสีของสารละลายจะมีสีน้ำเงินเข้มกว่า treatment ในสัดส่วนของสารละลายโปรตีนต่อน้ำต่ำ

การทดลองโดยการเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนและตรวจสอบผลของค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง fluorescence spectrophotometer พบว่าสัดส่วนปริมาณโปรตีนในสารละลายมีผลต่อค่าความเข้มของการเรืองแสงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$ โดยปริมาณโปรตีนในสารละลายมีผลต่อค่าความเข้มของ การเรืองแสงที่เกิดขึ้นในลักษณะความสัมพันธ์ดังภาพที่ 3.4 และใน treatment ที่มีสารละลายโปรตีนมาก ค่าการเรืองแสงมากและค่าการเรืองแสงจะลดลงเรื่อยๆ เมื่อระดับโปรตีนในสารละลายต่ำลงดังตารางที่ 3.1 และภาพที่ 3.4

ตารางที่ 3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนกับค่าความเข้มของ fluorescence

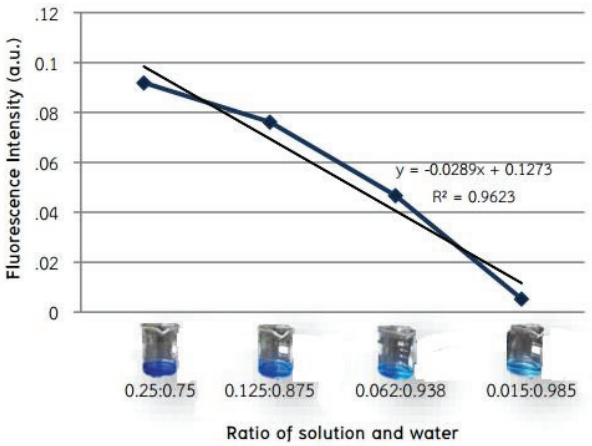
Ratio	Fluorescence Intensity (a.u.)
0.25:0.75	0.0919^{f}
0.125:0.875	0.0761^{e}
0.062:0.938	0.0467^{c}
0.015:0.985	0.0053^{b}

หมายเหตุ: อักษร a–f ระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$

ทั้งนี้ผลดังกล่าวมาเกิดจากสัดส่วนปริมาณโปรตีนในสารละลายเพิ่มขึ้นมีผลทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนเกิดการดูดซับพลังงานจากคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่ผลิตจากเครื่อง fluorescence spectrophotometer ทำให้อิเล็กตรอนอยู่ในสถานะกระตุ้น (excitation state) ทั้งนี้สภาวะดังกล่าวมีผลทำให้อิเล็กตรอนมีพลังงานสูงและพุ่งขึ้นไปใน state อื่นๆ จากนั้นอินเล็กตรอนจะกลับลงสู่สถานะพื้น (ground state) ซึ่งในระหว่างที่อิเล็กตรอนเคลื่อนที่กลับลงมานั้นจะเกิดการคายพลังงานต่างๆออกมาทั้งความร้อนและแสง โดยพลังแสงจะเกิดในช่วงเวลา 10^{-9}–10^{-7} วินาที ทั้งนี้ถ้าปริมาณของอิเล็กตรอนในสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนถูกกระตุ้นในปริมาณมากขึ้นเป็นผลทำให้ปริมาณแสงที่เกิดขึ้นเพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน (Lakowicz, 2006) แต่ทั้งนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการเรืองแสงยังประกอบไปด้วย 2 ปัจจัย คือสารเตรียมละลายโปรตีนในระดับความข้มข้นสูงมีผลทำให้โมเลกุลสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนเกิดการชนกันและสูญเสียพลังงาน มีผลทำให้ค่าการเรืองแสงน้อยลง อีกปัจจัยหนึ่งคือข้อจำกัดของเครื่อง fluorescence spectrophotometer โดยเกิดจากโมเลกุลโปรตีนมีในปริมาณสูงเกินไปทำให้แสงตกกระทบสองผานไมทั่วถึงทำให้เกิดขึ้นน้อยกว่าความเปนจริง (inner filter effect) ทำให้ปริมาณแสง fluorescence ที่แปล่งออกมาน้อยกว่าปกติ (Areechiranusorn, 2001) ดังนั้นกราฟที่

TSAE2019 Conference

สามารถนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนได้ลักษณะมีลักษณะเป็นเส้นตรงดังภาพที่ 3.4



ภาพที่ 3.4 ความแตกต่างของสัดส่วนของสารละลายโปรตีนต่อค่า fluorescence intensity ของสารละลาย

4 สรุป

จากผลการวิจัยข้างต้น สามารถกล่าวได้ว่ามีความเป็นไปได้ที่จะวิเคราะห์โปรตีนในถั่วเหลืองด้วยเทคนิค Fluorescence โดยการประยุกต์เข้ากับการใช้วิธีการแบรดฟอร์ดด้วยการใช้สารละลายคูแมสซี่บริลเลี่ยนบลูจี-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250) เพื่อให้เกิดการจับและสร้างพันธะระหว่างโปรตีนกับสารละลายคูแมสซี่บริลเลี่ยนบลูจี-250 เป็นโครงสร้างแบบแบบวงแหวนเชิงซ้อน โดยวิธีการนี้สามารถที่จะบอกระดับปริมาณโปรตีนรวมในถั่วเหลืองได้ ทั้งนี้ในอนาคตจะมีการพัฒนาเพื่อที่จะสามารถบอกได้ว่าโปรตีนในถั่วเหลืองดังกล่าวมีปริมาณร้อยละเท่าไรและยังเป็นการลดระยะเวลาในการวิเคราะห์โปรตีนจากในปัจจุบัน

5 กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.ธนะชัย พันธ์เกษมสุข และห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์และขอขอบคุณ ดร.วิบูลย์ ช่างเรือ จากศูนย์วิศวกรรมกระบวนการทางการเกษตรและอาหารในการใช้ห้องปฏิบัติการเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

6 เอกสารอ้างอิง

Apenten, O. R. K. 2002. Food Protein Analysis., (1st ed). New York. Marcel Dekker.

Apiprun, P. 2003. Soybean Commercial Crop in Thailand., (1st ed). Bangkok. Kasetsart University.

Areechiranusorn, C. 2001. Scientific Instruments. Khon Kaen. Interdisciplinary Printing Co., Ltd.

Boukroufa, M., Sicaire, A.G., Fine, F., Larre, C., Goff, A.L., Jamault, V.S., Rakotomanomana, N., and F. Chemat. 2017. Green sonoextraction of protein from oleaginous press rapeseed cake. Journal of molecules 22:80.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Journal of Analytical Biochemistry. 72:248-254.

Jameson, D. M. 2014. Introduction to Fluorescence. (1st ed). New York: CRC Press.

Liu K.S. 1997. Chemistry and nutritional value of soybean components: soybean chemistry, Technology and Utilization. New York, Chapman & Hall.

Office of Agricultural Economics. The soybean quantity is imports and exports of thailand Available at: http://www.oae.go.th/oae_report_export/import_result.php. Accessed on 7 July 2018. (in thai)

Nielseh, S. S. 2010. Food analysis. (4th ed.). New York. Springer Science and Business Media, LLC.

Phaouplack, S. 2015. Research and development on soybean. Research project report. Department of agriculture. Ministry of agriculture and cooperatives of thailand. (in thai)

Previte, M. J. R., K. Asian., S. N. Malyn. and C. D. Geddes. 2006. Microwave triggered metal enhanced chemiluminescence: quantitative protein determination. Journal of Analytical Chemistry 78:8020-8027.

Pukpatdee, A. 2003. Soybean commercial crop in Thailand. 1st ed., Bangkok. Kasetsart University. (in thai)

Karoui, R. B. Kemps., F. Bamelis., B. D. Ketelaere., K. Merten., R. Schoonheydt., E. Decuypere. and J. D. Baerdemaeker. 2006. Development of a rapid method based on front face fluorescence spectroscopy for the monitoring of egg freshness: 1-evolution of thick and

TSAE 2019 Conference

thin egg albumens. Journal of European Food Research and Technology 223:303–312.

Lakowicz, J. R. 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy. (3rd ed.). Maryland. Springer USA.

Badrawy, E.E.Y., Zainy, A.R.M., Shalaby, A.O. and N. Y. Sayed., no drate. Effect of microwave roasting on chemical composition of peanut seeds and comparing it with the ordinary roasting process Available at: http://www1.mans.edu.eg/facse/arabic/moktamar/second/45.pdf Accessed on 28 April 2016.

Rizki, H., Kzaibber, F., Nablousi, A., Elharfi, M., Ennahli, M. and H. Hanine. 2015. Effect of microwave roasting on the oxidative stability and physicochemical properties of sesame seeds (Sesamum indicum). International journal of advanced research in science, engineering and technology 2(2):392–396.

Osman, M. K. and Sarkadi, L. S. 1990. Extraction and isolation of protein from lupine (Lupinus termis L.) seeds. Journal of Periodica Polytechnica Chemical Engineering 35:1–2.

Valenzuela, C., L. E. Abugoch. and C. Tapia. 2013. Effect of alkaline extraction on the structure of the protein of quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) and its influence on film formation. Journal of International Food Science and Technology 48:843–849.

TSAE 2019 Conference