บทที่ 2

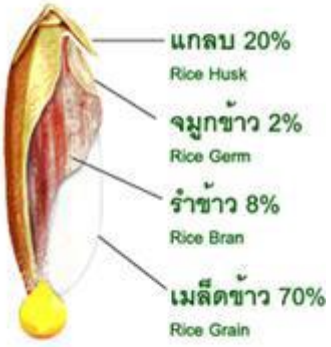
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าว

ข้าว (Rice) เป็นพืชในวงศ์หญ้า (Gramineae) มี 2 ชนิด คือ *Oryza glaberrina* และ *Oryza sativa* โดย *Oryza sativa* มีถิ่นกำเนิดและปลูกเป็นอาหารในทวีปเอเชีย มี 3 สายพันธุ์ คือ Indicia, Japonica และ Javanica (ประภาส วีระแพทย์, 2531) ข้าวถือเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย มีการเพาะปลูกทั่วไปทุกภูมิภาค เนื่องจากเป็นอาหารหลักของคนไทย และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง (กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2545)

เอเชียมีข้าวข้าวเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่สำคัญ เพราะข้าวเป็นอาหารที่สำคัญที่สุดของคนในเอเชีย ผลิตภัณฑ์หลักจากการสีข้าวคือเมล็ดข้าว (Endosperm) ซึ่งมีประมาณร้อยละ 70 และผลพลอยได้จากการสีข้าวประกอบด้วย แกลบข้าว (rice husk) ร้อยละ 20 ซึ่งเป็นเปลือกของข้าวสาร รำข้าว (rice bran) ร้อยละ 8 และจมูกข้าว (rice germ) ร้อยละ 2 รำข้าวเป็นแหล่งผลิตน้ำมันรำข้าวหรือนำไปขายเป็นอาหารสัตว์ (Hoed *et al.*, 2006)

ข้าว เป็นคำทั่วไปที่ใช้เรียก เมล็ดข้าว (rice fruit, rice grain, หรือ rice seed) ซึ่งทางพฤกษศาสตร์จะหมายถึง ผล (fruit) ที่มีลักษณะเป็นผลเดี่ยว (single fruit) เกิดจากรังไข่อันเดียวชนิดลอย (superior ovary) ของดอกเดี่ยวในแต่ละดอกย่อย ที่เกิดรวมกันอยู่เป็นช่อดอก ผลเดี่ยวนี้จะติดแน่นอยู่กับผนังของรังไข่ หรือเยื่อหุ้มผล (pericarp) ซึ่งเมื่อผลสุกหรือแก่จะเป็นผลแห้ง (dry fruit) ที่ไม่แตก (indehiscent fruit) เรียกว่า เมล็ดที่มีเยื่อหุ้มผล (caryopsis grain) และเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat หรือ testa) เชื่อมรวมกันอย่างแนบแน่น โดยตลอดผลหรือเมล็ดข้าวจะมีลักษณะแตกต่างตามสายพันธุ์ในด้านขนาด รูปร่าง สี การมีหาง (awn) และขน (pubescence) หรือไม่มีขนบนเปลือกแข็ง (hull หรือ husk) (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2547)



ภาพ 2.1 องค์ประกอบของเมล็ดข้าว
ที่มา : อรอนงค์ นัยวิกุล (2547)

2.1.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2547)

จากภาพ 2.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าวประกอบด้วย

2.1.1.1 เปลือกข้าว (Hull หรือ Husk) เปลือกข้าวประกอบด้วยเปลือกใหญ่ (Lemma) เปลือกเล็ก (Palea) หางเมล็ด (Awn) กลีบเลี้ยง (Steriallemma) และขั้วเมล็ด (Rachilla) โดยเปลือกข้าวมีน้ำหนักประมาณร้อยละ 20 ของน้ำหนักเมล็ดข้าวเปลือก

2.1.1.2 ส่วนของเมล็ดข้าวหรือเมล็ดข้าวกล้อง (Caryopsis, Brown rice or Cargo rice) คือส่วนที่เอาเปลือกออกแล้ว เป็นส่วนที่รับประทานได้ ประกอบด้วย

- เยื่อหุ้มผล (Pericarp) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น คือ เยื่อหุ้มชั้นนอก (Epicarp), เยื่อหุ้มชั้นกลาง (Mesocarp) และเยื่อหุ้มชั้นใน (Endocarp) มีลักษณะเป็นเส้นใย ผนังเซลล์ประกอบด้วยโปรตีน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส

- เยื่อหุ้มเมล็ด (Seed coat หรือ Teata) อยู่ถัดจากเยื่อหุ้มผลเข้าไป ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 2 ชั้น เรียงกันเป็นแถวเป็นที่อยู่ของไขมัน

- ชั้นรำละเอียด (Aleurone layer) อยู่ต่อจากเยื่อหุ้มเมล็ดเข้าไป ชั้นรำละเอียดจะห่อหุ้มเอนโดสเปิร์ม และคัพภะ องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นโปรตีน นอกจากนี้ยังประกอบด้วยไขมัน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส

- เนื้อเมล็ด (Endosperm) อยู่ชั้นในสุดของเมล็ด ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน และเส้นใย ประมาณร้อยละ 7.8, 0.5 และ 0.4 ตามลำดับ

- ต้นอ่อน หรือ คัพภะ (Embryo) อยู่ติดกับเนื้อเมล็ดทางด้านเปลือกใหญ่ที่หุ้มเมล็ด เป็นส่วนที่จะเจริญเป็นต้นต่อไป โดยส่วนต้นอ่อนนี้จะมีโปรตีนและไขมันสูง (ศิริมา วานิชชัง, 2547)

ข้าวพันธุ์ กข 6 เป็นพันธุ์ข้าวเหนียวหอม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Oryza sativa* L. เป็นพันธุ์ข้าวเหนียวที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเจ้าพันธุ์จากขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้รังสีแกมมาที่ 20 กิโลเกรย์ ที่สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติแห่งประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2508 ปลูกและคัดเลือกข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ฉายรังสีชั่วที่ 2 ที่สถานีทดลองข้าวบางเขน ปลูกชั่วที่ 3 ที่สถานีทดลองข้าวพิมาย จังหวัดนครราชสีมา เป็นสายพันธุ์ข้าวเหนียวที่มีความนุ่ม มีกลิ่นหอม ทนแล้ง และมีคุณภาพการหุงต้มรับประทานดี อีกทั้งให้ผลผลิตเฉลี่ยสูงสุดเป็นอันดับหนึ่ง ลักษณะของเมล็ดข้าวกล้องจะมีรูปร่างเรียว ยาว 7.2 มิลลิเมตร กว้าง 2.3 มิลลิเมตร หนา 1.8 มิลลิเมตร ข้าวสุกนิ่งนุ่มหอม ผลผลิตเฉลี่ย 670 กิโลกรัม/ไร่ น้ำหนัก 1,000 เมล็ด เฉลี่ย 26.11 กรัม ต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาล และโรคไหม้ แต่ไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้ง เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและแมลงบั่ว (สกฤษพงศ์ ปักสังคะเณย์ และคณะ, 2555)

ภาพ 2.2 ข้าว กข 6

ที่มา : สำนักวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าว (2557)

ข้าวก่ำมีลักษณะที่สังเกตภายนอกได้ชัดเจนคือลักษณะของลำต้น เมล็ดเปลือกข้าว และเมล็ดข้าวกล้อง มีลักษณะสีแดงก่ำของแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ซึ่งเป็นสีของธรรมชาติที่เกิดขึ้น ข้าวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ดเป็นข้าวเหนียวดำที่มีประวัติการปรับปรุงพันธุ์ ดังนี้ ในปีพ.ศ. 2538 อาจารย์ดำเนิน กาละดี ได้รวบรวมพันธุ์ข้าวจำนวน 2 พันธุ□ ได้□แก่□ พันธุ□เหนียวสันป่าตองและอีกพันธุ□หนึ่งไม่มีชื่อพันธุ□เป็นข้าวเหนียวดำเรียกว่า “ข้าวก่ำ” ลำต้นเป็นสีม่วง มีปล้องสีม่วง ใบ รูปร่างของ

ใบเป็นแบบใบแคบ มีสีม่วงทั้งกาบใบและตัวใบมีเส้นกลางใบเป็นสีม่วง ลักษณะของเมล็ดมีเปลือกสีม่วง เยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงเมล็ดเรียวยาว ขนาดเมล็ดกว้าง 0.33 เซนติเมตร ยาว 0.97 เซนติเมตร ส่วนจำนวนเมล็ดเต็มรวงเฉลี่ย 120 เมล็ด อายุการออกดอก 86 วันมีระยะเวลาการบานดอกจากกอแรกถึงการบานร้อยละ 90 นาน 15 วัน ผลผลิตเฉลี่ย 480 กิโลกรัมต่อไร่ (พันทิพา พงศ์เพรียจันทร์ และดำเนิน กาละดี, 2543)

ภาพ 2.3 ข้าวก่ำดอยสะเก็ด

ที่มา : เดลินิวส์ (2555)

2.2 รำข้าว (Rice Bran)

รำ หมายถึง ส่วนเยื่อหุ้มผล เยื่อหุ้มเมล็ด นิวเซลลัส ชั้นแอลิวโรน และชั้นซับแอลิวโรน และมักจะรวมส่วนของคัพภะเข้าเอาไว้ด้วย ในกระบวนการขัดสีข้าวกล้องให้เป็นข้าวสาร ส่วนใหญ่ต้องการข้าวสารที่มีสีขาวจึงขัดผิวข้าวกล้องจนถึงชั้นซับแอลิวโรน ทำให้คัพภะหลุดจากเนื้อเมล็ดรวมอยู่ด้วย ดังนั้นปริมาณชนิดของโครงสร้าง และองค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวที่ได้จากกระบวนการสีข้าว นับจากการกะเทาะเปลือกหุ้มแข็ง (แกลบ) แล้ว จะขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว และสภาพแวดล้อมที่ปลูกจนถึงกรรมวิธีในการขัดผิวเมล็ดข้าวกล้อง การขัดขาว และการขัดมันเพื่อให้ข้าวสารขาว และมันวาว ทำให้องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว ขึ้นอยู่กับส่วนของรำที่ได้จากกระบวนการสีข้าว (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2547)

รำข้าวได้จากการสีข้าว ซึ่งจะได้ประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักข้าวเปลือกทั้งหมด (นัยนา บุญทวียุวัฒน์ และเรวดี จงสุวัฒน์, 2545) องค์ประกอบของรำข้าวขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของข้าว เทคนิคการสีข้าว และวิธีการทำให้เกิดความเสถียร (stabilization) ของข้าว รำข้าวเป็นแหล่งของสารต้าน

อนุมูลอิสระธรรมชาติ (natural antioxidant) ที่สำคัญ ได้แก่ โทโคเฟอรอล (Tocopherol) โทโคไตรอีนอล (Tocotrienol) และแกมมา-ออริซานอล (γ-oryzanols) รำข้าวสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้โดยเฉพาะในส่วนของ low-density lipoprotein (LDL) ทำให้ลดความเสี่ยงของโรคหัวใจ นอกจากนี้ ยังสามารถลดการเกิดของนิ่วในร่างกายได้ (Iqbal *et al*., 2005) ประเทศไทยสามารถผลิตน้ำมันรำข้าวได้เฉลี่ยร้อยละ 15 ของน้ำหนักรำข้าวทั้งหมด ซึ่งจะได้น้ำมันรำข้าวมากถึง 0.3 ล้านตัน/ปี (นัยนา บุญทวียุวัฒน์ และเรวดี จงสุวัฒน์, 2545) การผลิตน้ำมันรำข้าว จะมุ่งผลิตเพื่อเป็นน้ำมันบริโภคเป็นหลัก ส่วนผลพลอยได้จากการแปรรูปน้ำมัน ได้แก่ สเตียริน (stearin) กรดไขมันอิสระ (free fatty acid) กัม (gum) และดิสทิลเลต (distillate) ได้ถูกนำไปทำเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าไม่มากนัก เช่น สเตียรินนา ไปผลิตเนยขาว และจาระบี กรดไขมันอิสระนำไปผลิตอาหารสัตว์ และสบู่ดิสทิลเลตนำไปขายเป็นอาหารสัตว์ เป็นต้น

จากตาราง 2.1 แสดงปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของข้าวเปลือกและส่วนที่ได้จากการแปรรูปข้าวซึ่งพบว่าในรำข้าวมีปริมาณของโปรตีน ไขมัน และเส้นใยอาหารมากกว่าในข้าวเปลือกข้าวกล้อง และข้าวสาร แต่ในรำข้าวมีปริมาณของคาร์โบไฮเดรตต่ำกว่าข้าวเปลือก ข้าวกล้อง และข้าวสารมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเยอะที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่ารำข้าวประกอบด้วยสารอาหารที่มีคุณค่าต่างๆ ในปริมาณสูงกว่าข้าวเปลือก ข้าวกล้อง และข้าวสาร และมีสารอาหารที่ทรงคุณค่าต่อร่างกายมากกว่าข้าวซึ่งเป็นอาหารหลักในการบริโภค นอกจากนี้ข้าวยังมีองค์ประกอบที่เป็นวิตามิน ได้แก่ ไทอะมิน (วิตามินบี 1) และไรโบเฟลวิน (วิตามินบี 2) (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2547)

ตาราง 2.1 องค์ประกอบทางเคมีและวิตามินในส่วนประกอบของข้าว (กรัม/100กรัม)

ส่วนของข้าว	โปรตีน	ไขมัน	คาร์โบไฮเดรต	เส้นใยอาหาร	วิตามินบี 1	วิตามินบี 2
ข้าวเปลือก	5.8-7.7	1.5-2.3	64-73	16.4-19.2	0.26-0.33	0.06-0.11
ข้าวกล้อง	7.1-8.3	1.6-2.8	73-87	2.9-3.9	0.29-0.61	0.04-0.14
ข้าวสาร	6.3-7.1	0.3-0.5	77-89	0.7-2.3	0.02-0.11	0.02-0.06
รำข้าว	11.3-14.9	15.0-19.7	34-62	24-29	1.20-2.40	0.18-0.43
แกลบ	2.0-2.8	0.3-0.8	22-34	66-74	0.09-0.21	0.05-0.07

ที่มา: อรอนงค์ นัยวิกุล (2547)

โปรตีนในรำข้าวส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโนจำเป็น เช่น ลูซีน ฟีนิลลานีน วาลีน ทรีโอนีน ไอโซลูซีน และฮิสทิดีน (Faccin *et al.,* 2009) นอกจากกรดอะมิโนจำเป็นดังที่กล่าวมาแล้วยังพบกรดอะมิโนอีกหลายชนิดดังแสดงในตาราง 2.2 สารประกอบในรำข้าวส่วนใหญ่เป็นเส้นใยจึงมีความสามารถในการละลายน้ำได้ต่ำ (Parrado *et al.,* 2006) หากสามารถเพิ่มมูลค่าของโปรตีนจากรำข้าวโดยการนำมาแปรรูปจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการแปรรูปข้าว เช่น การย่อยอาหารประเภทโปรตีนด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) เป็นกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีองค์ประกอบของเปปไทด์ที่แสดงกิจกรรมทางชีวภาพต่าง ๆ ได้ เรียกเปปไทด์เหล่านี้ว่า “ไบโอแอคทีฟเปปไทด์” (bioloactive peptides) (กนิฐพร พ่วงสมบัติ, 2547)

2.2.1 การเสื่อมคุณภาพของรำข้าวในระหว่างการเก็บรักษา

การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวในระหว่างการเก็บรักษา เนื่องจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสระหว่างเอนไซม์ไลเปสและไขมันภายในรำข้าวทำให้ไตรกลีเซอไรด์ถูกไฮโดรไลซิสเป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล ซึ่งกรดไขมันอิสระเหล่านี้ จะไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เป็นสาเหตุของการเสื่อมคุณภาพของรำข้าวในระหว่างการเก็บรักษา โดยจะส่งผลต่อการเกิดกลิ่นหืนซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค (Zhou *et al*., 2002) ปริมาณของไตรกลีเซอไรด์ขึ้นอยู่กับปริมาณของการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ที่เกิดขึ้นก่อนการคงสภาพ (stabilization) รำข้าว ซึ่งองค์ประกอบของน้ำมันรำข้าวดิบ (Nicolosi *et al*., 1994) แสดงดังตาราง 2.3

การเหม็นหืนของอาหารที่มีไขมันหรือน้ำมันเกิดจากปฏิกิริยา 2 ชนิดคือ ชนิดแรกเกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสหรือที่เรียกว่า Hydrolytic rancidity ซึ่งเกิดจากการแตกสลายของไตรกลีเซอไรด์เมื่อมีความชื้นซึ่งอาจเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ไลเปส หรือความร้อนสูงที่ได้รับ ชนิดที่สองคือการเหม็นหืนจากปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งอาจเป็นแบบออโตออกซิเดชันหรือการออกซิเดชันภายใต้ความร้อนสูง

ตาราง 2.2 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในรำข้าว

กรดอะมิโน	กรัมกรดอะมิโน/กรัมโปรตีน			
	Houston *et al*., 1969	Juliano *et al*., 1985	Wang *et al*., 1999	Tang *et al*., 2003
ไลซีน	4.81	5.5	4.7	5.4
ฮิสทิดีน	2.71	3.0	2.9	3.3
อาร์จินีน	8.28	9.0	8.9	10.2
กรดแอสพาติก	9.09	10.5	8.0	11.2
ทรีโอนีน	3.78	4.4	3.7	3.7
เซอรีน	4.68	5.3	4.1	4.5
กรดกลูตามิก	13.58	15.3	12.5	18.1
โปรลีน	4.23	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ
ไกลซีน	5.47	6.1	5.4	6.2
อะลานีน	6.15	6.8	6.1	7.3
ซิสทรีอีน	2.32	2.6	1.6	ตรวจไม่พบ
วาลีน	6.00	5.7	6.3	7.0
เมไธโอนีน	2.32	2.0	2.2	ตรวจไม่พบ
ไอโซลูซีน	3.94	3.0	3.9	4.5
ลูซีน	6.91	8.0	7.4	8.0
ไทโรซีน	3.13	3.7	3.3	3.7
ฟีนิลอะลานีน	4.43	5.1	4.6	5.1
ทริปโธแฟน	ตรวจไม่พบ	0.7	1.2	ตรวจไม่พบ
แอสพาราจีน	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ
กลูตามีน	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Fabian and Ju (2011)

ตาราง 2.3 องค์ประกอบของน้ำมันรำข้าวดิบ

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ร้อยละ)
ไตรกลีเซอไรด์	80
ฟอสโฟลิพิด	2
ไกลโคลิพิด	1
สเตอรอล	5
แวกซ์	2-5

ที่มา: Nicolosi *et al*. (1994)

2.2.2 การเกิดไฮโดรไลซิสของไขมันในรำข้าวจากเอนไซม์ไลเปส

การเกิดไฮโดรไลซิสของไขมันในรำข้าว มักเกิดภายหลังการสีข้าว เนื่องจากการขัดสีไปทำลายโครงสร้างชั้นต่างๆของรำข้าว มีผลทำให้เอนไซม์ไลเปสซึ่งอยู่ในเยื่อหุ้มเมล็ดมีโอกาสสัมผัสกับไขมันที่อยู่ในชั้นแอริวโลน คัพภะ และเนื้อเมล็ดได้ จึงทำให้เกิดการไฮโดรไลซิส ไขมันในรำข้าวพบอยู่ในรูปหยดกลม มีเยื่อหุ้มเป็นสารประเภทไขมันจำพวกฟอสโฟลิพิด ส่วนภายในเป็นพวกสารไตรกลีเซอร์ไรด์ การเกิดไฮโดรไลซิสเริ่มจากเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส-ดี (Phospholipase-D) ย่อยสลายฟอสโฟลิพิดที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้แตกออก และเอนไซม์ไลเปสเข้าไปย่อยสลายไตรกลีเซอร์ไรด์ที่อยู่ภายในเกิดเป็นกรดไขมันอิสระขึ้น กรดไขมันอิสระเหล่านี้มีผลต่อการเกิดกลิ่นหืนในรำข้าวได้ เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ปริมาณกรดไขมันอิสระจะเพิ่มมากขึ้นด้วย เอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะต่อการไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลของกลีเซอร์ไรด์ซึ่งเอนไซม์ไลเปสในเมล็ดข้าวมาจาก 2 แหล่ง คือ เอนไซม์ที่มีอยู่ในเมล็ดข้าวตามธรรมชาติ โดยพบมากที่สุดในชั้นเยื่อหุ้มเมล็ด รองลงมาคือส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดชั้นกลาง และแหล่งที่สอง คือ เอนไซม์ที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมา (ศิริมา วานิชชัง, 2547)

2.2.3 การเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันอิสระในรำข้าว

การเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันชนิดที่ไม่อิ่มตัว ในกระบวนการออกซิเดชันทำให้เกิดสารประกอบคาร์บอนิลหลายชนิดมากขึ้น เช่น แอซีตัลดีไฮด์ โพรพานอล 2-บิวาโนน เพนทานอล

และเฮกซานอล (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2550) เมล็ดข้าวสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ไลพอกซิจีเนสและเกิดการออโตออกซิเดชัน ดังนี้

เอนไซม์ไลพอกซิจีเนส เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีความจำเพาะต่อการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยเฉพาะกรดไขมันที่มีพันธะคู่ 2 ตำแหน่งที่เป็นคอนจูเกตไดอีน ซึ่งได้จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสและไฮโดรไลซ์ในการสลายโมเลกุลของไขมัน ทำให้เกิดกรดไขมันอิสระ เช่น กรดลิโนเลอิก กรดลิโนเลนิก ซึ่งเป็นกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว เป็นสารตั้งต้นที่ดีของเอนไซม์ไลพอกซิจีเนส โดยสารตั้งต้นนี้ไม่ละลายในตัวทำละลายอิมัลชันที่ค่าพีเอชที่ต่ำกว่า 7.0 กรดไขมันอิสระสามารถเกิดออกซิเดชันได้โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลพอกซีจิเนสได้สารประกอบที่ไม่เสถียรสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้ สารประกอบจำพวก อัลดีไฮด์ คีโตน และแอลกอฮอล์ ซึ่งก่อให้เกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์ (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2550)

การเกิดออกซิเดชันของข้าวในระหว่างการเก็บรักษาจึงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของไขมันในข้าว เอนไซม์ไลพอกซิจีเนสในเมล็ดข้าวมีการสะสมอยู่มากในส่วนของคัพภะและเยื่อหุ้มเมล็ด โดยมีค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมแตกต่างกัน ในรำข้าวมีน้ำหนักโมเลกุล 95,000 สารตั้งต้นหลัก คือ กรดลิโนเลอิก สารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการออกซิเดชันกรดลิโนเลอิก คือ 9-ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (9-hydroperoxide) ร้อยละ 65 และ13-ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (13-hydroperoxide) ร้อยละ 35 เมื่อได้รับความร้อนลิโนเลท-ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (linolate-hydroperoxide) เกิดการแตกตัวได้สารประกอบเฮกซานอล (hexanal) และ 2-โนอินอล (2-nonenal) (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2550)

2.2.4 การเกิดออโตออกซิเดชันในรำข้าว (Autoxidation)

การเกิดออโตออกซิเดชันของไขมันเกิดโดยมีโลหะและแสง เป็นตัวเร่งให้เกิดการสลายตัวของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวได้ อธิบายขั้นตอนการเกิดออโตออกซิเดชัน แบ่งได้ 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นต้น (Initiation) ในขั้นนี้โมเลกุลของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวเสียไฮโดรเจนไป เกิดเป็นอนุมูลอิสระ และออกซิเจนจะเข้าไปทำปฏิกิริยา เกิดเป็นสารประกอบของอนุมูลอิสระ เช่น peroxy radical ($RO_2^{\bullet}$) alkoxy radical ($RO^{\bullet}$) และalkyl radical ($R^{\bullet}$)

$$RH\ \text{-------------------}> R^{\bullet} + H^{\bullet} \qquad (2.1)$$

ขั้นต่อเนื่อง (Chain propagation) เป็นขั้นตอนที่ออกซิเจนเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระเกิดเป็นอนุมูลตัวใหม่ และเกิดปฏิกิริยาต่อไปเรื่อยๆ ดังนี้

$$R^{\cdot} + O_2 \text{ ----------- > } RO_2^{\cdot} \qquad (2.2)$$

$$RO^{\cdot} + RH \text{ ----------- > } ROH + R^{\cdot} \qquad (2.3)$$

$$RO_2^{\cdot} + RH \text{ ----------- > } ROOH + R^{\cdot} \qquad (2.4)$$

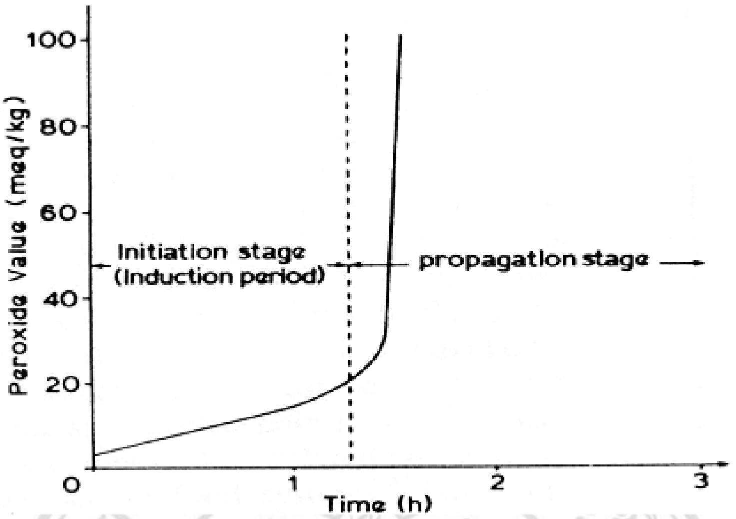
ขั้นสุดท้าย (Chain termination) ขั้นตอนนี้อนุมูลจะรวมตัวกันเอง เกิดเป็นสารประกอบที่เป็นกลางและมีเสถียรภาพไม่ทำปฏิกิริยาต่อไป

$$2R^{\cdot} \text{ ----------- > } RR \qquad (2.5)$$

$$R^{\cdot} + RO_2^{\cdot} \text{ ----------- > } ROOR \qquad (2.6)$$

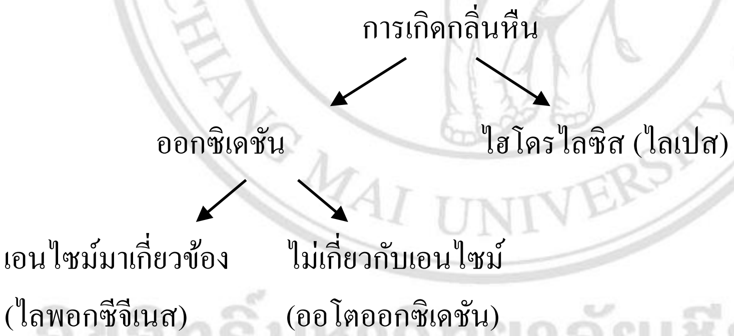
$$2RO_2^{\cdot} \text{ ------------ > } ROOR + O_2 \qquad (2.7)$$

การเกิดออโตออกซิเดชันในช่วงแรกปฏิกิริยาจะดำเนินไปอย่างช้าๆ ด้วยอัตราเร็วที่สม่ำเสมอ ซึ่งเป็นระยะเหนี่ยวนำ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ช่วงแรกเป็นสารประกอบเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆ จนถึงจุดที่เกิดออกซิเดชันอย่างรวดเร็ว ความสัมพันธ์ของค่าเปอร์ออกไซด์และระยะเวลา ภาพ 2.4 จะเห็นได้ว่าในช่วงแรก ค่าเปอร์ออกไซด์มีปริมาณต่ำและเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ แต่ในช่วงนี้จะยังไม่มีกลิ่นหืน จนกระทั่งปริมาณเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเข้าสู่ช่วงที่สอง กลิ่นหืนจะเกิดขึ้นที่จุดเริ่มของช่วงที่สอง นอกจากนี้การเกิดออโตออกซิเดชันของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวทำให้เกิดสารประกอบคาร์บอนิลหลายชนิด โดยพบว่าเมื่อใช้กรดโอเลอิค กรดลิโนเลอิก และกรดลิโนเลนิกเป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสารประกอบคาร์บอนิลที่มีปริมาณมากที่สุดได้แก่ nonenal, hexanal และ hepta-*trans*-2 *cis*-4-dienal ตามลำดับ (Allen and Hamilton, 1994)



ภาพ 2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์ออกไซด์ของไขมันกับเวลา ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส
ที่มา : Allen and Hamilton (1994)

การเกิดกลิ่นหืนในข้าวแบ่งออกเป็นชนิดต่าง ๆ ได้ดังนี้ (Barnes and Galliard, 1991)


การเกิดกลิ่นหืน
ออกซิเดชัน
ไฮโดรไลซิส (ไลเปส)
เอนไซม์มาเกี่ยวข้อง
(ไลพอกซีจีเนส)
ไม่เกี่ยวกับเอนไซม์
(ออโตออกซิเดชัน)

2.2.4.1 การตรวจสอบการเหม็นหืนจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน

เปอร์ออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ดังนั้นการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาออกซิเดชันขั้นต้น จึงเป็นการตรวจหาปริมาณคอนจูเกตไดอีน และคอนจูเกตไตรอีน และตรวจหาค่าเปอร์ออกไซด์ (Peroxide value, PV) (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2544)

การหาค่าเปอร์ออกไซด์ วิธีการการหาค่าเปอร์ออกไซด์ที่ใช้โดยทั่วไปคือไตเตรทกับไอโอดีน เป็นวิธีการวัดปริมาณไอโอดีนที่เกิดจากการออกซิไดซ์ของโพแทสเซียมไอโอไดด์ โดยเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่เป็นกรด ดังสมการ 2.8

$$ROOH + 2I^- + 2H^+ \longrightarrow ROH + I_2 + H_2O \qquad (2.8)$$

ปริมาณไอโอดีนที่เกิดขึ้นจะถูกไตเตรทโดยโซเดียมไทโอซัลเฟตโดยมีน้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์ ดังสมการที่ 2.9

$$I_2 + 2Na_2S_2O_3 \longrightarrow Na_2S_4O_6 + 2NaI \qquad (2.9)$$

ค่าเปอร์ออกไซด์จะรายงานเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูล/ตัวอย่าง 1 กิโลกรัม อย่างไรก็ตามการหาค่าเปอร์ออกไซด์□อาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้ เนื่องจากการทำปฏิกิริยาของไอโอดีนกับคาร์□บอนตำแหน่งอื่นที่ไม่□เกิดเปอร์□ออกไซด์□จึงต้องให้□ปฏิกิริยาเกิดในที่ไม่□มีแสงสว่าง หรือความคลาดเคลื่อนเป็นเพราะการเกิดของไอโอดีนจากออกซิเจนที่มีในสารละลายที่ทดสอบ ซึ่งจะทำให้ได้□ค่าเปอร์□ออกไซด์□ที่สูงกว่าความจริง นอกจากนี้ เกิดจากความคลาดเคลื่อนของการตรวจสอบสี ณ จุดยุติของปฏิกิริยาซึ่งขึ้นอยู่กับสายตาของผู้ทดลองดังนั้นจึงมีการใช้เครื่องไตเตรทแบบอัตโนมัติซึ่งจะวัดกระแสไฟฟ้ามาประยุกต์ใช้□แทนวิธีดั้งเดิมแต่ใช้หลักการเดียวกัน และอุปกรณ์แบบนี้สามารถกระทำได้□ในภาชนะปิดสามารถทำให้บรรยากาศของการตรวจวัดปราศจากออกซิเจนโดยการเติมแก๊สไนโตรเจนไปแทนที่อากาศ ทำให้ตรวจวัดได้ละเอียดจนถึงช่วงค่าเปอร์□ออกไซด์□ 0.06 ถึง 20 มิลลิกรัมสมมูลย์ต่อตัวอย่าง 1 กิโกกรัม อีกวิธีเป็นการตรวจสอบโดยวิธีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เป็นการตรวจหาปริมาณไอออนของเฟอร์ริก (Fe^{3+}) ที่ได้□จากการออกซิไดซ์□ของไอออนฟอรัส (Fe^{2+}) โดยเปอร์□ออกไซด์□ซึ่งมี xylinol orange ซึ่งจะรวมตัวกับไอออนของเฟอร์ริกเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีชมพูจนถึงสีม่วงเมื่อมีปริมาณเปอร์□ออกไซด์เพิ่มขึ้น ดังนั้นการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรจึงลดลงเมื่อมีสีเปลี่ยนเป็นสีม่วงจึงควรเตรียมสารละลายตัวอย่างและสารมาตรฐานให้มีความเข้มข้นของไอออนของเฟอร์ริกในช่วง 5 ถึง 20 ไมโครกรัม เพื่อลดความคลาดเคลื่อน วิธีนี้สามารถวัดได้□ละเอียดกว่าวิธีเดิม คือสามารถตรวจสอบปริมาณเปอร์□ออกไซด์□ได□ถึงระดับ 0.1 มิลลิกรัมสมมูลย์/ตัวอย่าง 1 กิโลกรัม เพราะเปอร์□ออกไซด์□เป็นสารที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาจึงมีปริมาณเปอร์□ออกไซด์□ที่เกิดขึ้นในช่วงเริ่มต้นที่ค่อยๆ เพิ่มขึ้น แต่เมื่อมีปริมาณและที่เวลานานขึ้นเปอร์□ออกไซด์□จะเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องได้สารต่างๆ เกิดขึ้นหลายชนิดดังได้กล่าวมาแล้วในกลไกการเกิดออกซิเดชัน จึงมีปริมาณ

เปอร์□ออกไซด์□ลดลง ดังนั้นการตรวจหาปริมาณเปอร์□ออกไซด์□เพียงชนิดเดียวจึงไม่สามารถนำมาใช้ในการสรุประดับการเกิดออกซิเดชันของลิปิดได้ การตรวจหาปริมาณแอลดีไฮด์ซึ่งได้จากปฏิกิริยาต่อเนื่องจากค่าเปอร์ออกไซด์ ส่วนใหญ่จะหาโดยวิธีหาค่าแอนนิซิดีน (anisidine value) หรือหาค่า thiobabituric acid reactive substances (TBARS) หรืออาจหาปริมาณสารคาร์บอนิลซึ่งเป็นปริมาณโดยรวมของทั้งแอลดี-ไฮด์ □คีโทน และกรดอินทรีย์ □เป็นต้น หรืออาจใช้□วิธีโครมาโตกราฟฟี□ในการหาปริมาณแอลดีไฮด์ (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2544)

2.3 อนุมูลอิสระ (Free Radical)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็คตรอนไม่เป็นคู่ อยู่ในวงอิเล็คตรอนวงนอกสุด (outer orbital) เนื่องจากการมีอิเล็กตรอนที่โดดเดี่ยว (unpaired electron) อยู่ในวงโคจรของโมเลกุลทำให้ไม่เสถียร ทำให้อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดมาใหม่นี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ต่อกันไปเรื่อยๆ โดยที่อนุมูลอิสระก็มีสมบัติเหมือนสารทั่วๆไป ตรงที่ความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่นสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามอุณหภูมิ พีเอช และความชื้น เป็นต้น (Halliwell *et al*., 1991)

มลพิษในอากาศฝุ่น โอโซน ไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ ควันบุหรี่ อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว แสงแดด ความร้อน รังสีแกมมา เป็นอนุมูลอิสระที่มาจากแหล่งภายนอก ส่วนอนุมูลอิสระที่ร่างการสร้างขึ้น อนุมูลอิสระเหล่านั้นจะเข้าไปทำลายเซลล์ เป็นอนุมูลอิสระที่มาจากแหล่งภายใน เมื่อร่างกายไม่สามารถผลิตหรือได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเพียงพอที่จะไปยับยั้งหรือไปจับอนุมูลอิสระภายในเซลล์ของร่างกายได้ ผลคือทำให้เซลล์เกิดความเสียหายและนำไปสู่การเกิดโรค เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ และหลอดเลือด การแก่ก่อนวัย ต้อกระจก และโรคอื่นๆ เช่นอนุมูลอิสระไปทำลายผนังหลอดเลือดแดง และเมื่อมีไขมันสะสมอยู่ในบริเวณหลอดเลือดแดงที่ถูกทำลาย จะทำให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดในที่สุด แต่ถ้าเราได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเพียงพอ สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้าไปป้องกันหรือแย่งจับกับอนุมูลอิสระและนำอนุมูลอิสระเหล่านั้นไป

สารต้านอนุมูลอิสระคือสารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ได้□ (Halliwell *et al*., 1995) สารเหล่านี้มีกลไกการทำงาน

ต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับ (scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (chelate) กับเหล็ก (Fe^{2+}) ป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ เป็นต้น ร่างกายคนเราปกติจะมีสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติหลากหลายชนิดทั้งที่เป็นเอนไซม์ เช่น superoxide dismutase, catalase และ glutathione peroxidase เป็นต้น และสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น urate, bilirubin และ transferrin เป็นต้น แต่สารเหล่านี้มีปริมาณจำกัด ดังนั้นหากมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นเกินกว่าจะกำจัดได้หมด อาจก่อให้□เกิดอันตรายต่อร่างกายได้□ ดังที่กล่าวมาแล้□ว นอกจากนี้พวกวิตามินบางชนิด เช่น บีตาแคโรทีน (β-carotene) วิตามินซี (vitamin C) วิตามินอี (vitamin E) รวมทั้งสารประกอบกลุ่มพอลิฟีนอลต่างๆ ซึ่งมีรายงานพบมากในพืช ผัก ผลไม้□ ทั่วไปยังจัดเป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งธรรมชาติที่ดีอีกกลุ่มหนึ่ง (Sies *et al*., 2005)

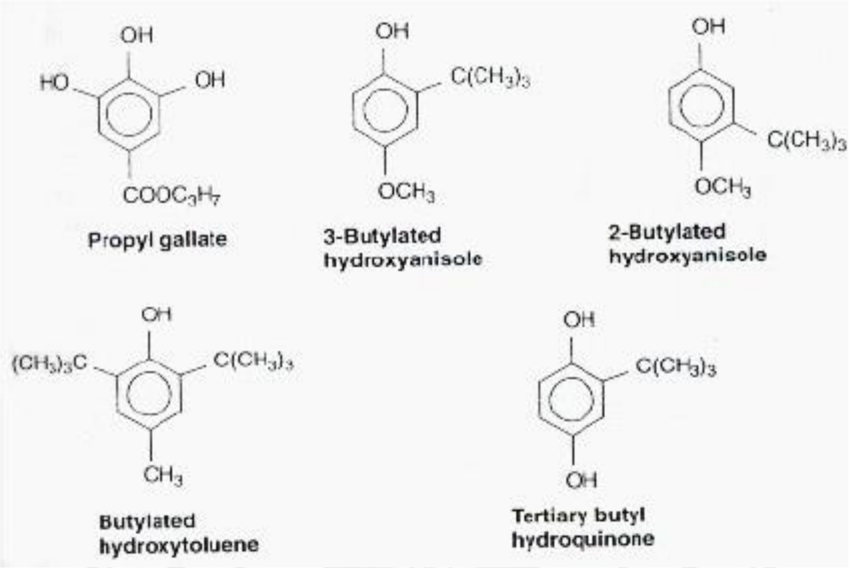
สารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทตามลักษณะการออกฤทธิ์ คือ

1. สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ เป็นสารที่หยุดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระโดยการให้□อนุมูลไฮโดรเจน ($H^{\cdot}$) หรืออิเล็กตรอนแก□อนุมูลอิสระโดยตรงเป็นผลให้□อนุมูลนั้นกลายเป็นสารที่มีความเสถียรขึ้นสารออกฤทธิ์ในลักษณะดังกล่าว ได้แก่□ สารประกอบกลุ่มฟีนอลิก เช่น flavonoids, eugenol และ vanillin เป็นต้น มีรายงานว่าสารต้านอนุมูลอิสระชนิดนี้จะทำหน้าที่ได้□ดีที่ความเข้มข้นต่ำๆ แต่เมื่อมีความความเข้มข้นสูงขึ้นอาจกลายเป็นสารเสริมฤทธิ์ออกซิเดชันได้□ (Rajalakshni and Narasimhan, 1996)

2. สารต้านอนุมูลอิสระทุติยภูมิสารต้านอนุมูลอิสระประเภทนี้ไม่□ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุมูลอิสระแต่จะช่วยลดการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิในลักษณะต่างๆ เช่น จับกับ Fe^{2+} ดักจับออกซิเจน ดูดซับรังสียูวีไว เป็นต้น (Rajalakshni and Narasimhan, 1996)

แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามแหล่งที่มาได้□ 2 ชนิด ได□แก่

1. สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกสังเคราะห์□ 5 ชนิดได้แก่□ propyl gallate, 2 -butylated hydroxyanisole, 3-butylate hydrxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinone ซึ่งมีสูตรโครงสร้างภาพ 2.5 เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้□ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันอันเป็นสาเหตุให้□อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติที่เปลี่ยนแปลง สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติทั่วไปแต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Yang *et al*., 2000)


Propyl gallate
3-Butylated hydroxyanisole
2-Butylated hydroxyanisole
Butylated hydroxytoluene
Tertiary butyl hydroquinone

ภาพ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

ที่มา : Howell (1996)

2. สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidant) สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการพัฒนาค้นคว้ากันอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากแนวคิดเรื่องการกลับคืนสู่ธรรมชาติประกอบกับความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภค สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ พบได้ทั้งในจุลชีพสัตว์ และพืชซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามิน อย่างเช่น วิตามินซี วิตามินอี บีตาแคโรทีน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลลิก โดยเฉพาะโพลีฟีนอล เช่น แซนโธน และฟลาโวนอยด์ ซึ่งประกอบด้วยหมู่อะโรมาติกไฮดรอกซิล ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป หมู่ฟังก์ชัน (functional group) เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระต่างๆ ไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยการให้อนุมูล $H^{\cdot}$ แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น (Vanacker *et al.,* 2000) นอกจากนี้สารประกอบพอลิฟีนอลที่มีโครงสร้างของ ortho-dihydroxyl phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล $OH^{\cdot}$ ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชัน คือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำโดยการเข้าจับกับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex) ได้อีกด้วย (Sanchez-Moreno *et al*., 2000)

รำข้าวเป็นแหล่งที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินอี โทโคฟรอล และแกมมา-ออริซานอล คุณสมบัติเด่นของรำข้าวคือสามารถสกัดน้ำมันที่มีสารต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่งน้ำมันที่ได้จากรำข้าวแตกต่างน้ำมันพืชอื่นๆ คือ ส่วนประกอบเป็นสาระสำคัญ คือ แกมมา-ออริซานอล และโทโคไตร-อินอล ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระในรำข้าวมีดังนี้

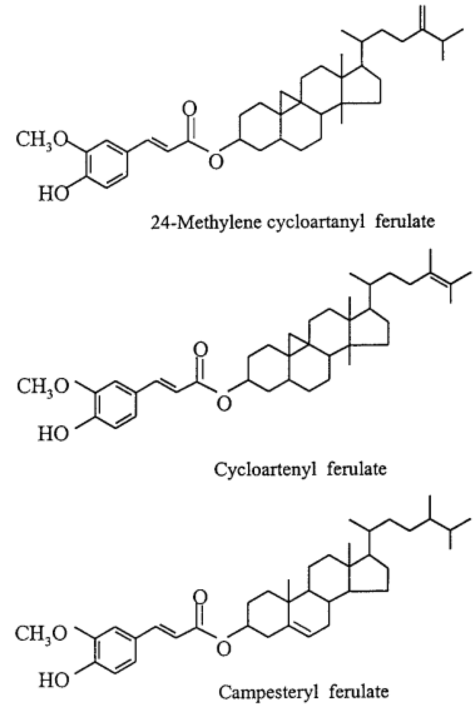
2.3.1 แกมมา-ออริซานอล (γ-oryzanol)

แกมมา-ออริซานอล พบในน้ำมันรำข้าว จึงมีชื่อเรียกตามชื่อทางวิทยาศาสตร์ของข้าว (*Orysae sativa* L.) ว่าออริซานอล (Oryzanol) เป็นสารผสมระหว่าง ferulic acid ester ของ sterol และ triterpene alcohol มีหลายอนุพันธุ์ ทั้งแอลฟา (□α) เบตา (β□) และแกมมา (□γ) ซึ่งแกมมา-ออริซานอลเป็นอนุพันธ์ที่พบมากที่สุด (Huang *et al*., 2003) แกมมา-ออริซานอลเป็นสารประกอบ sterol ester ของกรดเฟอรูลิค (Ferulic acid) มีทั้งหมด 10 ชนิดได้แก่ Δ□ -7-stigmastenyl ferulate, stigmasteryl ferulate, cycloartenyl ferulate, 24-methylene cycloartanyl ferulate, Δ -7-campestenyl ferulate, campesteryl ferulate, Δ-7-sitostenyl ferulate, sitosteryl ferulate, compestanyl ferulate และ sitostanyl ferulate โดยชนิดที่พบมากคือ cycloartanyl ferulate, 24-methylene cycloartanyl ferulate และ campesteryl ferulate (Xu *et al.,* 2001) ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม รองลงมาเป็นอีเทอร์ ละลายได้เล็กน้อยในเฮปเทน แต่ไม่ละลายในน้ำ มีจุดหลอมเหลวสูงประมาณ 161.2 องศาเซลเซียส ในรำข้าวมีปริมาณของแกมมา-ออริซานอลสูงประมาณ 2200-3000 พีพีเอ็ม (Qureshi *et al.*, 2002) ซึ่งปัจจุบันมีการนำแกมมา-ออริซานอลไปใช้เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและเครื่องสำอาง ซึ่งเป็นสารที่มีสรรพคุณที่สามารถปกป้องผิวหนังจากแสงแดดป้องกันการเกิดริ้วรอยเหี่ยวย่นของผิวหนัง และป้องกันโรคเรื้อรังที่เกิดจากการมีระดับคอเลสเตอรอลสูง รำข้าวมีแกมมา-ออริซานอลสูงกว่าวิตามินอีถึง 6 เท่า และมีสมบัติยับยั้งการเหม็นหืนของรำข้าวได้ดี (พันทิพา พงศ์เพรียจันทร์ และ ดำเนิน กาละดี, 2543) ลดคอเลสเตอรอลชนิดเลว (LDL) และลดระดับไตรกลีเซอไรด์ โดยแกมมา-ออริซานอลช่วยในการขับน้ำดีเข้าไปในลำไส้ จากนั้นจะป้องกันไม่ให้มีการดูดซึมกลับเข้ามาใหม่ มีรายงานว่า แกมมา-ออริซานอลช่วยเพิ่มระดับการสร้างฮอร์โมนเทสโตสเตอโรน (Testosterone) ในผู้ชายและช่วยกระตุ้นสมองให้หลั่งฮอร์โมนเอนโดฟิน (Endorphin) เพิ่มขึ้นด้วย มีหลายการศึกษายังพบว่าแกมมา-ออริซานอลช่วยเพิ่มระดับคอเลสเตอรอลชนิดดี (HDL) และช่วยลดอัตราเสี่ยงของโรคเกิดจากหลอดเลือดแข็งตัว (Cheruvanky *et al*., 2003)

ปณิตา บุญสิทธิ์ และคณะ (2549) ได้ศึกษาปริมาณแกมมา-ออริซานอลในข้าวเหนียวพันธุ์พื้นเมืองของไทย พบว่า ข้าวก่ำดอยสะเก็ดมีปริมาณแกมมา-ออริซานอล 72.95 มิลลิกรัม/100 กรัม ซึ่งสูงกว่าข้าวขาวดอกมะลิ 105 และ กข 6 ซึ่งมี 30.89 และ 30.44 มิลลิกรัม/100กรัม ตามลำดับ

การเสริมแกมมา-ออริซานอลในอาหารจะช่วยลดระดับคอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในซีรัมและในตับได้ โดยการสะสม cycloartenol (CA) ที่ตับจะทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cholesterol esterase นอกจากนี้ยังพบว่าหนูแฮมเตอร์ที่ใช้แกมมา-ออริซานอลร้อยละ 1 เป็น

เวลา 7 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เสริม พบว่า กลุ่มที่ได้รับแกมมา-ออริซานอลมีคอเลสเตอรอลทั้งหมดลดลงร้อยละ 28 ผลรวมของคอเลสเตอรอลชนิดความหนาแน่นปานกลาง (Intermediate Density Lipoprotein; IDL), คอเลสเตอรอลชนิดความหนาแน่นต่ำ (Low Density Lipoprotein; LDL) และคอเลสเตอรอลชนิดความหนาแน่นต่ำมาก (Very Low Density Lipoprotein; VLDL) ลดลงร้อยละ 34 และพบว่ากลุ่มที่ได้รับแกมมา-ออริซานอลมีการดูดซึมคอเลสเตอรอลลดลงร้อยละ 25 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Rong *et al.,* 1997)


CH3O
HO
O
O
24-Methylene cycloartanyl ferulate
CH3O
HO
O
O
Cycloartenyl ferulate
CH3O
HO
O
O
Campesteryl ferulate

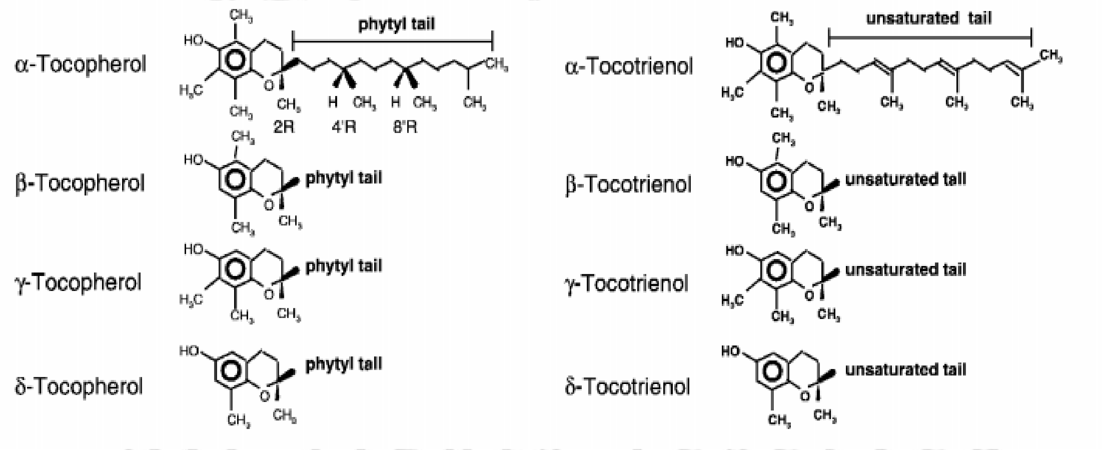
ภาพ 2.6โครงสร้างของอนุพันธ์แกมมา-ออริซานอล
ที่มา: Xu *et al*. (2001)

2.3.2 วิตามินอี

วิตามินอี มีลักษณะเป็นน้ำมันข้นหนืดสีเหลืองละลายได้ดีในน้ำมันมีสูตรโมเลกุล $C_{29}H_{50}O_2$ มวลโมเลกุล 430 กรัม/โมล ในธรรมชาติประกอบด้วย 8 อนุพันธ์คือ แอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคฟีรอล (α-, β-, γ-และ δ-tocopherol) และแอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคไตรอีนอล (α-, β-, γ- และ δ-tocotrienol) มีโครงสร้างดังภาพ 2.7 ซึ่งในโครงสร้างของวงแหวน 6-chromanol ของกลุ่มโทโคฟีรอลจะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล (methyl group) ที่ตำแหน่ง 5, 7 และ 8 โดยที่ตำแหน่งที่ 2 เป็น C16 saturated side chain ส่วนกลุ่มโทโคไตรอีนอลนั้นจะมีพันธะคู่ที่

ตำแหน่ง 3’, 7’ และ 11’ของ side chain ซึ่งโทโคฟีรอลและโทโคไตรอีนอลในรูปแบบเฉพาะต่างๆนั้นจะแตกต่างกันที่จำนวนและตำแหน่งของหมู่เมทิลบนวงแหวน 6-chromanol โดยแอลฟา-โทโคฟีรอลและแอลฟา-โทโคไตรอีนอลนั้นจะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล 3 หมู่ เบตา-โทโคฟีรอล เบตา-โทโคไตร-อีนอล แกมมา-โทโคฟีรอล และแกมมา-โทโคไตรอีนอลจะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล 2 หมู่ และเดลตา-โทโคฟีรอล และเดลตา-โทโคไตรอีนอลจะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล 1 หมู่ (Eitenmiller and Lee, 2004)

คุณสมบัติของวิตามินอีคือ ทนต่อกรดและความร้อนสูง แต่ไม่ทนต่อด่าง แสงแดด และออกซิเจน โดยจะถูกออกซิไดซ์อย่างช้าๆ ถ้าสัมผัสกับอากาศ และจะถูกออกซิไดซ์อย่างรวดเร็วถ้าละลายในไขมันที่เหม็นหืน หรือมีเกลือของเหล็กอยู่ด้วยแหล่งอาหารที่พบมากคือในน้ำมันพืชต่างๆ เช่น น้ำมัน เมล็ดฝ้าย น้ำ มันถั่วเหลือง น้ำมัน เมล็ด ทานตะวันและน้ำมัน สกัดจากจมูกข้าวสาลีหน้าที่ที่สำคัญของวิตามินอีคือเป็นสารต้านออกซิเดชันป้องกันไม่ให้เปอร์ออกไซด์ทำปฏิกิริยากับกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว ที่อยู่ในโมเลกุลของลิพิดที่ผนังเมมเบรนของเซลล์ และวิตามินอียังทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ เป็นการกำจัดอนุมูลอิสระให้น้อยลง ปัจจุบันมีผู้ใช้วิตามินอีจำนวนมาก ในการรักษาโรคหัวใจและโรคหลอดเลือดบางชนิด ทำลายสารก่อมะเร็ง ใช้เติมในผลิตภัณฑ์รักษาฝ้า และผลิตภัณฑ์ชะลอความแก่ (ปราณี วราสวัสดิ์, 2550)


α-Tocopherol
phytyl tail
HO
CH_3
H_3C
2R
4'R
8'R
H
β-Tocopherol
γ-Tocopherol
δ-Tocopherol
α-Tocotrienol
unsaturated tail
β-Tocotrienol
γ-Tocotrienol
δ-Tocotrienol
O

ภาพ 2.7 โครงสร้างของวิตามินอี

ที่มา: Trable (1999)

โทโคฟีรอล และโทโคไตรอีนอล เป็นสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติที่มีบทบาทสำคัญในการเก็บรักษาอาหาร และการป้องกันโรค ซึ่งโทโคฟีรอลและโทโคไตรอีนอลสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอซิลกลีเซอรอล (acylglycerol peroxidation) โดยการจับกับอนุมูลอิสระ สามารถยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในตับ มีฤทธิ์เป็นสารต้านมะเร็ง เพิ่มระบบภูมิคุ้มกันของ

ร่างกาย และลดการเสื่อมสภาพของเซลล์ นอกจากนี้โทโคฟีรอลและโทโคไตรอีนอล ยังทำหน้าที่เป็นสารต่อต้านการจับตัวแข็งของเลือด มีประสิทธิภาพในการฟื้นฟูสภาพผิวหนัง และสามารถป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ในผู้สูงอายุได้ (Chu *et al*., 2003) นอกจากนี้แอลฟา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคฟีรอล สามารถลดการอักเสบเนื่องมาจากกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ๆ ของก้อนมะเร็ง (inflammatory angiogenesis) ใน microvascular endothelial cells ของมนุษย์ (Wells *et al*., 2010)

วิตามินอีจะทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นทำให้สารพลังงานสูงชนิดนี้หมดความว่องไวในการทำอันตรายกับสารชีวโมเลกุลอื่นๆ หลังจากนั้นตัววิตามินอีเองจะเกิดเป็นวิตามินอีเรดิเคิล (Vitamin E radical) ที่เสถียรมากกว่า การที่โมเลกุลวิตามินอีเรดิเคิลมีความเสถียรทั้งนี้เนื่องจากอิทธิพลของปรากฏการณ์เรโซแนนท์ (resonance effect) อิเล็กตรอนอิสระที่เกิดขึ้นที่หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) สามารถเคลื่อนที่ (localization) เข้าไปในวงแหวนเบนซินได้ รูปแบบของวิตามินอีเรดิเคิลที่เป็นเรโซแนนท์กันทั้งหมด 4 รูปแบบซึ่งเปลี่ยนรูปแบบกลับไปกลับมาตลอดเวลา ทำให้พลังงานของโมเลกุลลดลงวิตามินอีเรดิเคิล จึงมีความเสถียร (วราพร พงศ์ธรกุล-พานิช, 2543)

จากรายงานของ วรนุช ศรีเจษฎารักษ์ และคณะ (2544) พบว่า ข้าว กข 6 มี แอลฟา-โทโคฟีรอล, แอลฟา-โทโคไตรอีนอล, เบตา-โทโคฟีรอล และเบตา-โทโคไตรอีนอล ปริมาณเฉลี่ย 30.76, 30.24, 19.01 และ 68.72 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ในขณะที่พันธุ์ขาวดอกมะลิ 150 แอลฟา-โทโคฟีรอล, แอลฟา-โทโคไตรอีนอล, เบตา-โทโคฟีรอล และ เบตา-โทโคไตรอีนอล ปริมาณเฉลี่ย 16.98, 7.66, 3.40 และ 9.06 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

2.3.3 สารประกอบฟีนอล (Phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลเป็นสารประกอบที่มี aromatic ring อย่างน้อยหนึ่ง hydroxyl group และอนุพันธุ์ของสารประกอบฟีนอลซึ่งมีการแทนที่ด้วยหมู่เคมีต่างๆ และผลผลิตจากเมแทบอลิซึมอีกหลายชนิด พบในพืชมากที่สุด สารประกอบฟีนอลในพืชโดยทั่วไปแสดงคุณสมบัติเป็นกรด ซึ่งจะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลอื่น มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยทำหน้าที่ในการหน่วงเหนี่ยวหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงช่วยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลเป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในกระบวนการเติบโต และการเจริญพันธุ์ของพืชแต่ละชนิด ดังนั้น รูปแบบของสารประกอบฟีนอลในพืชแต่ละชนิด จึงมีความแตกต่างกันไป ในปัจจุบันพบว่ามีสารประกอบ ฟีนอลที่ทราบโครงสร้างแน่นอนแล้วมากกว่า 8,000 ชนิด ในธรรมชาติ

ตั้งแต่กลุ่มที่มีโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก (phenolic acids) ฟีนิลโพรพานอล (phenylpropanol) และฟลาโวนอยด์ ไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน (lignins) เมลานิน (melanins) และแทนนิน (tannins) เป็นต้น (Qureshi *et al.*, 1997)

คุณสมบัติที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันของสารประกอบฟีนอล คือ การเป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชัน สารต้านการกลายพันธุ์ (antimutagens) ซึ่งเกิดจากอนุมูลอิสระ และการใช้สารประกอบฟีนอลในการป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือด และโรคมะเร็งต่างๆ โดยสารประกอบฟีนอลจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ และไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่นๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

$$\mathrm{ROO^{\cdot}} + \mathrm{PPH} \longrightarrow \mathrm{ROOH} + \mathrm{PP^{\cdot}} \qquad (2.10)$$

$$\mathrm{RO^{\cdot}} + \mathrm{PPH} \longrightarrow \mathrm{ROH} + \mathrm{PP^{\cdot}} \qquad (2.11)$$

เมื่อ $\mathrm{ROO^{\cdot}}$ และ $\mathrm{RO^{\cdot}}$ คือ free radicals, PPH คือ polyphenolic compound

เมื่อสารประกอบฟีนอลห้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลจะค่อนข้างมีความเสถียร ดังนั้นจึงไม่ทำปฏิกิริยาอื่นต่อไป ยิ่งไปกว่านั้นอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลบางชนิดยังคงสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้อีกด้วย จึงทำให้สารประกอบฟีนอลเหล่านั้นลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้ถึง 2 เท่า ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

$$\mathrm{ROO^{\cdot}} + \mathrm{PP^{\cdot}} \longrightarrow \mathrm{ROOPP} \qquad (2.12)$$

$$\mathrm{RO^{\cdot}} + \mathrm{PP^{\cdot}} \longrightarrow \mathrm{ROPP} \qquad (2.13)$$

สารประกอบฟีนอลที่ถูกพบว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชันนั้น สามารถพบได้ในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น เมล็ด ผล ใบ และส่วนอื่นๆ และหนึ่งในสารประกอบฟีนอลที่เป็นที่รู้จัก คือ ฟลาโวนอยด์ โดยสามารถพบได้ในเกือบทุกส่วนของพืช แต่จะมีความแตกต่างกันออกไปในด้านของชนิดและปริมาณ

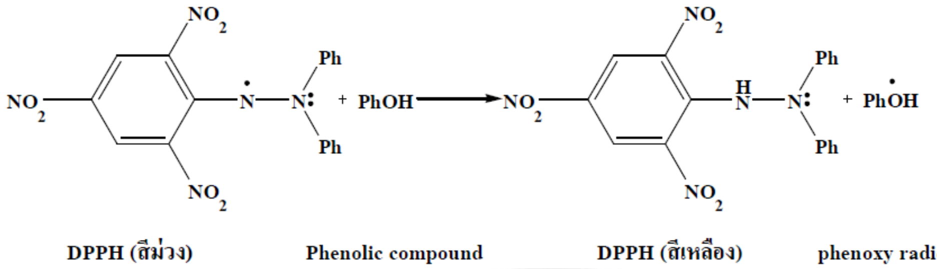
2.3.3.1 วิธีการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบคุณสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระของสารมีหลายวิธี แตกต่างกันไปตามคุณสมบัติที่ต้องการทดสอบ เช่น คุณสมบัติในการจับกับอนุมูลอิสระ การตกตะกอนของโลหะซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน เป็นต้น วิธีที่นิยมทดสอบ มีดังนี้

2.3.3.1.1 การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity

ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่ศึกษานี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรในสารละลาย โดยในการทดสอบนี้จะใช้ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระในระยะเวลาที่กำหนด ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จะแปรผันกับความเข้มข้นของ DPPH ดังนั้น การลดลงของความเข้มข้นของ DPPH บ่งบอกถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ (โอภา วัชระคุปต์, 2549) สำหรับกลไกการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารประกอบฟีนอลิก แสดงดังภาพ 2.8 เกิดจากการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH ของสารประกอบฟีนอลิก โดยที่อนุมูลอิสระ DPPH ในสารละลายจะมีสีม่วง เมื่อสารประกอบฟีนอลให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH จะได้เป็นสาร DPPH ที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระต่อไป ซึ่งจะเห็นมีสีเหลืองนวล (ขั้นที่ 1) ส่วน phenoxy radical ที่เกิดขึ้นจะจับกันทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระหมดไป (ขั้นที่ 2) (Amic *et al*., 2003)

ขั้นที่ 1



(2.14)

ขั้นที่ 2

$$\underset{\text{Phenoxy radical}}{\mathrm{Ph^{\bullet}OH}} + \underset{\text{Phenoxy radical}}{\mathrm{Ph^{\bullet}OH}} \longrightarrow \underset{\text{Phenolic}}{\mathrm{PhO\text{-}OPh}} \qquad (2.15)$$

ภาพ 2.8 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารประกอบฟีนอล

ที่มา : Amic *et al.* (2003)

EC_{50} (50% effective concentration) คือ ค่าความเข้มข้นที่ทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระ DPPH ลดลงร้อยละ 50 โดยสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับค่าการดูดกลืนแสง แล้วหาค่า EC_{50} จากกราฟแสดงค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลงร้อยละ 50 แล้วใช้ค่า EC_{50} ในการเปรียบเทียบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างตัวอย่างที่ทดสอบกับสารมาตรฐาน BHT คำนวณร้อยละRadical Scavenging (ร้อยละการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) (Choavanalikit *et al.*, 2004) ข้อดีของวิธีนี้ คือ สามารถทำได้ง่ายใช้เครื่องมือทั่วไป นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเดียวกัน ข้อด้อยของวิธีนี้ คือ อนุมูลอิสระของ DPPH มีความคงตัว ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย นอกจากนี้โครงสร้างทางเคมีของ DPPH ที่แสดงจะเห็นว่าอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตรทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่ฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากำจัดอนุมูลอิสระ หรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริงทั้งๆ ที่สารต้านอนุมูลอิสระนั้นมีฤทธิ์ดีในการขจัดอนุมูลเปอร์ออกซี นอกจากนี้สารรีดิวซ์สามารถทำให้สี DPPH จางลงได้อีกด้วย (โอภา วัชระคุปต์, 2549)

2.3.3.1.2 Metal chelating

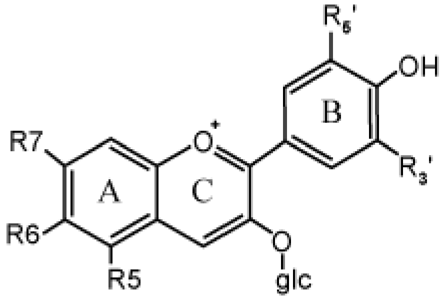
เป็นวิธีวัดความสามารถของการจับกับโลหะของสารทดสอบเนื่องจากโลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันให้เกิดอย่างรวดเร็ว วิธีนี้อาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างสารทดสอบกับเฟอรัสไอออน (Ferrous ion, Fe^{2+}) แล้ววัดความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร นิยมใช้ EDTA เป็นตัวอย่างอ้างอิง (Chang *et al.,* 2002)

2.3.3.1.3 Inhibition of lipid peroxidation

วิธีนี้จะทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารทดสอบในระบบที่ประกอบด้วยไขมันในสารละลายบัฟเฟอร์ โดยทั่วไปนิยมใช้กรดลิโนเลอิก (Linoleic acid) และสารละลายบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) พีเอช 7.0 วิธีนี้อาศัยหลักการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ conjugated diene ที่เกิดขึ้นในระหว่างปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร (Tananuwong *et al*., 2010)

2.3.4 แอนโทไซยานิน (anthocyanins)

แอนโทไซยานิน (anthocyanins) มีชื่อย่อมาจากรากศัพท์□เดิมของกรีกคือ anthos แปลว่า ดอกไม้ และ kyanos แปลว่า สีน้ำเงิน แอนโทไซยานิน จึงหมายถึง ดอกไม้สีน้ำเงิน แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ (water-soluble pigments) จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์□ (flavonoids) สีของแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนแปลงไปตามค่าพีเอช โดยมีสีน้ำเงินเข้มในสภาวะที่เป็นด่าง มีสีม่วงเมื่อเป็นกลาง และจะเปลี่ยนเป็นสีแดงส้มในสภาวะที่เป็นกรด สามารถพบแอนโทไซยานินได้ทั่วไปใน แวคิวโอลและเซลล์□เนื้อเยื่อชั้นนอกของดอก ผล และใบของพืชดอก ยกเว้นในพืชพวกตะบองเพชร ผักกาดหัว ผักโขม และพืชพวกสาหร่าย บางครั้งปรากฏในส่วนเนื้อเยื่อพืช ได้□แก่□รากหัวใต้□ดินของพืช (tuber) ลำต้น หน่อย่อย (bulbil) และพืชเมล็ดเปลือย (gymnosperms) ต่างๆ เช่น เฟิร์น และไบโอไฟต์ (bryophytes) นอกจากแอนโทไซยานินจะทำให้□ดอกไม้□มีสีสันสวยงามแล้วยังช่วยป้องกันพืชไม่ให้ได้รับอันตรายจากสิ่งแวดล้อมและแมลงต่างๆ



ภาพ 2.9 แอนโทไซยานิน

ที่มา: Anderson *et al*. (2006)

2.4 การคงสภาพรำข้าว (Rice bran stabilization)

หลังจากแยกชั้นของรำข้าวออกมาระหว่างกระบวนการขัดสีใหม่ๆ คุณภาพของรำจะลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากไขมันในรำข้าวเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสจากเอนไซม์ไลเปส ส่งผลทำให้เกิดเป็นกรดไขมันอิสระปริมาณมาก จึงไม่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตภัณฑ์อาหาร (Malekian *et al*., 2000) จึงจำเป็นต้องยับยั้งหรือทำลายให้เอนไซม์ดังกล่าวให้เร็วที่สุดเพื่อรักษาคุณภาพและปริมาณสารอาหารสำคัญของรำข้าว ดังนั้นวิธีคงสภาพรำข้าวส่วนใหญ่จึงมุ่งเน้นการทำลายเอนไซม์ในรำข้าวที่ขัดสีเสร็จใหม่ๆ เพื่อรักษาองค์ประกอบกรดไขมันและปริมาณสาระสำคัญ ซึ่งการคงสภาพรำข้าวจากอดีตจนถึงปัจจุบันมีหลายวิธี ดังนี้

2.4.1 การใช้วิธีทางเคมี

การใช้วิธีทางเคมีในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยสามารถใช้ได้กับพืชทุกชนิดที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส สำหรับสารเคมีบางชนิดให้ประสิทธิภาพดี แต่มีบางชนิดให้ผลไม่ดี ซึ่งสารเคมีส่วนใหญ่ที่นิยมใช้ ได้แก่ กรดไฮโดรคลอลิก กรดแลกติก ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ไอออนของโลหะ เช่น Fe^{3+} และ Ni^{2+} เป็นต้น Munshi และคณะ (1993) ได้ศึกษาการใช้ไอออนของโลหะในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยใช้ไอออน Fe^{3+} และ Ni^{2+} ที่ความเข้มข้น 5×10^{-3} โมลาร์ ซึ่งพบว่า สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้อย่างสมบูรณ์ แต่จะมี Fe^{3+} และ Ni^{2+} ผสมอยู่ในรำข้าว จึงเหมาะในการนำไปใช้ผลิตเป็นอาหารสัตว์มากกว่าอาหารมนุษย์ แต่การใช้สารเคมีในการคงสภาพมักจะมีสารตกค้างซึ่งหากนำไปใช้อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ปัจจุบันวิธีนี้จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยม

2.4.2 การใช้ความร้อน

2.4.2.1 การใช้□ความร้อนแห้งหรือลมร้อน (dry heat)

เป็นวิธีการคงสภาพรำข้าวโดยอาศัยลมร้อนที่มีอุณหภูมิระหว่าง 100-110 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20-30 นาที เพื่อยับยั้งหรือทำลายเอนไซม์ไลเปสและไลพอกซีจีเนส วิธีการใช้ลมร้อน ที่นิยมใช้ ได้แก่ ฟลูอิไดเซชัน (Fluiddization) การอบลมร้อน (hot air oven) การอบภายใต้สุญญากาศ (vacuum drying) รำข้าวที่ผ่านการคงสภาพโดยวิธีอบลมร้อนในสภาพสุญญากาศที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง มีผลยับยั้งเอนไซม์ไลเปสและชะลอการเพิ่มของกรดไขมันอิสระหลังเก็บได้นาน 1 สัปดาห์ (Zullaikah *et al*., 2005) จากรายงานของ Amarasinghe และ Gangodavilage (2004) ในการอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ด้วยตู้อบลมร้อนเพื่อคงสภาพเอนไซม์ในรำข้าวพันธุ์ Bw 355 (ศรีลังกา) พบว่า รำข้าวมีปริมาณกรดไขมันเพิ่มขึ้นร้อยละ 10.98 หลังเก็บได้นาน 70 วัน แต่ข้อเสียของการใช้ลมร้อนในการคงสภาพรำข้าว คือ ใช้เวลานาน เนื่องจากค่าการนำความร้อนของรำข้าวต่ำ ทำให้ความร้อนทำลายเอ็นไซม์ไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเหลืออยู่ (Juliano *et al*., 1985)

2.4.2.2 การให้ความร้อนโดยใช้ความร้อนชื้น (wet heat)

เป็นการใช้ความร้อนชื้นช่วงอุณหภูมิระหว่าง 100-120 องศาเซลเซียส นาน 5-15 นาที สำหรับการคงสภาพรำข้าว การให้ความร้อนแบบนี้มีหลายวิธี เช่น การใช้ลูกกลิ้ง (rolling mill) การนึ่งด้วยไอน้ำ (steaming) การใช้แรงอัดที่อุณหภูมิสูง (extrusion) (Sayre *et al*., 1982) จากรายงานของ Poovarodom และคณะ (1982) พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการใช้ไอน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที หรืออุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที มีประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในรำข้าวได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Amarasinghe และ Gangodavilage (2004) ที่ใช้ไอน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที มีประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในรำข้าวได้ และการคงสภาพด้วยวิธีนี้ช่วยทำให้น้ำมันที่สกัดได้จากรำข้าวเพิ่มขึ้น และงานวิจัยของ Srimani และคณะ (1977) พบว่า การให้ความร้อนโดยใช้ไอน้ำมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้ลมร้อน แต่มีข้อควรระวังในการให้ลมร้อนโดยวิธีนี้คือ หากไม่นำรำข้าวไปทำแห้งก่อนหลังผ่านกระบวนการคงสภาพจะทำให้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกยับยั้งกลับมามีกิจกรรมในรำข้าวอีกครั้ง (Juliano *et al*., 1985)

การเอกซ์ทรูชันเป็นการให้ความร้อนแก่วัตถุดิบซึ่งความร้อนที่เกิดขึ้นอาจจะเป็นความร้อนที่ให้โดยตรง โดยการใช้ไอน้ำหรือขดลวดความร้อน และความร้อนที่เกิดขึ้นเนื่องจากความเสียดทานและแรงเฉือนที่เกิดขึ้นภายในบาร์เรล หรือเรียกว่าพลังงานทางกล เป็นกระบวนการทำให้สุกแบบต่อเนื่องที่ใช้อุณหภูมิสูงและเวลาสั้น (HTST, High-Temperature/Short-Time) โดยทั่วไปอาจใช้อุณหภูมิสูงถึง 200 องศาเซลเซียสและใช้เวลาประมาณ 5-10 วินาที ผลของการเอกซ์ทรูชันจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในอาหารได้แก่ การเกิดเจลในผลิตภัณฑ์แป้ง เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน ทำลายเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหารขณะเก็บรักษา ทำลายสารพิษในธรรมชาติ เช่น สารยับยั้งการทำงานของทริปซินในถั่วเหลือง ทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ (มาฤดี ผ่องพิพัฒน์พงศ์, 2551) Randall และคณะ (1985) ใช้วิธีเอกซ์ทรูชันในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในรำข้าว ซึ่งพบว่า รำข้าวที่ผ่านกระบวนการเอกซ์ทรูชันที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที บรรจุแบบสุญญากาศ สามารถเก็บรักษาได้นานถึง 1 ปี แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้จะทำให้มีการสูญเสียโทโคฟีรอลและโทโคไตรอีนอลถึงร้อยละ 73

2.4.2.3 การใช้ความร้อนแบบคลื่นไมโครเวฟ (microwave heating)

เป็นการใช้พลังงานแบบคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่ความถี่ 2,450 หรือ 915 ล้านครั้งต่อวินาที เพื่อทำให้โมเลกุลของน้ำที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ในอาหารแตกตัว เมื่อนำอาหารมาวางไว้ในสนามไฟฟ้า โมเลกุลของน้ำและสารอื่นที่มีขั้วจะจัดเรียงตัวให้สอดคล้องกับทิศทางของสนามไฟฟ้า และเกิดการสั่นสะเทือนเสียดสีกันภายในโมเลกุลของอาหารประมาณ 2450 ล้านครั้งต่อวินาที ซึ่งพลังงานที่เกิดขึ้นจะเคลื่อนย้ายไปสู่อะตอมหรือโมเลกุลที่อยู่ใกล้เคียงทำให้เกิดความร้อนจากการสั่นสะเทือนต่อกันของโมเลกุลได้ (วิไล รังสาดทอง, 2546) ในงานวิจัยของ Ramezanzadeh และคณะ (2000) พบว่า การประยุกต์ใช้ความร้อนแบบไมโครเวฟระดับความถี่ 2,450 ล้านครั้ง/วินาที และใช้กำลังไฟฟ้า 250 วัตต์ นาน 3 นาที เพื่อคงสภาพรำข้าว (ความชื้นร้อยละ 21) จากนั้นบรรจุและเก็บที่อุณหภูมิ 4, 5 และ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่า องค์ประกอบทางเคมีและปริมาณกรดไขมันของรำข้าวที่ผ่านการคงสภาพเกิดการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก หากเทียบกับรำข้าวที่ไม่ผ่านการคงสภาพ และ Lakkakula และคณะ (2004) ที่ใช้ความร้อนแบบคลื่นไมโครเวฟคงสภาพรำข้าว (ความชื้นร้อยละ 21) ที่อุณหภูมิ 109 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เก็บรักษาเป็นเวลา 2 เดือน มีปริมาณกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2.80 เป็นร้อยละ 3.89 แต่รำข้าวที่ไม่ผ่านการคงสภาพจะมีปริมาณของกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 3.96 เป็นร้อยละ 18.03 นอกจากนี้ Malekian และคณะ (2000) ได้ศึกษาการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในรำข้าว โดยการอบด้วยไมโครเวฟเป็นเวลา 3 นาที

เปรียบเทียบกับวิธีเอกซ์ทรูชันที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส บรรจุแบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ วิเคราะห์ผลจากปริมาณกรดไขมันที่เพิ่มขึ้น ซึ่งพบว่ารำข้าวที่ผ่านการอบด้วยไมโครเวฟมีการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันจากร้อยละ 3.2 เป็นร้อยละ 3.9 ส่วนรำข้าวที่ผ่านการเอกซ์ทรูชันมีกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2.8 เป็นร้อยละ 3.3

2.4.3 การใช้เอนไซม์

เป็นอีกทางเลือกหนึ่งการการคงสภาพของรำข้าว เนื่องจากรำข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ซึ่งการใช้เอนไซม์ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสนั้นยังไม่ค่อยมีผู้ศึกษามากนัก เช่น Vercet และคณะ (2010) ได้ศึกษากิจกรรมของ phospholipase A_2 โดยหาสภาวะของการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหมาะสม โดยใช้เอนไซม์โปรติเอส ได้แก่ ทริปซิน และไคโม- ทริปซิน ที่พีเอช 6.7 อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่า ที่ 4 องศาเซลเซียส ไม่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ แต่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งกิจกรรมของ phospholipase A_2 ได้ โดยใช้เวลาทั้งหมด 40 นาที เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น กิจกรรมของ phospholipase A_2 จะค่อยๆ ลดลงจนถึงนาทีที่ 40 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะหยุดลง ส่วน Parrado และคณะ (2006) ศึกษาการใช้เอนไซม์กลุ่มโปรติเอสในการยับยั้งกิจกรรมของไลเปส โดยทำการทดลองโดยใช้เอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินที่สภาวะพีเอช เท่ากับ 8 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่า ช่วง 0-20 นาที ไลเปสมีกิจกรรมเพิ่มขึ้น จากนั้นจะค่อยๆ ลดลงจนถึงนาทีที่ 50 กิจกรรมของไลเปสหยุดลง จากนั้นนำรำข้าวที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์และรำข้าวที่ไม่ได้ผ่านการไฮโดรไลซ์มาวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนาการพบว่ารำข้าวทั้ง 2 มีปริมาณโปรตีน วิตามินอี และปริมาณกรดไขมันไม่แตกต่างกัน ยกเว้นปริมาณของแกมมาออริซานอลที่ผ่านการไฮโดรไลซ์มีประมาณร้อยละ 1.2 ส่วนรำข้าวที่ไม่ได้ผ่านการไฮโดรไลซ์มีปริมาณเพียงร้อยละ 0.35 นอกจากนี้ยังพบว่าการยับยั้งด้วยเอนไซม์ทำให้รำข้าวสามารถละลายน้ำได้ดีขึ้นเนื่องจากสายของเปปไทด์สั้นลง (<10 kDa)

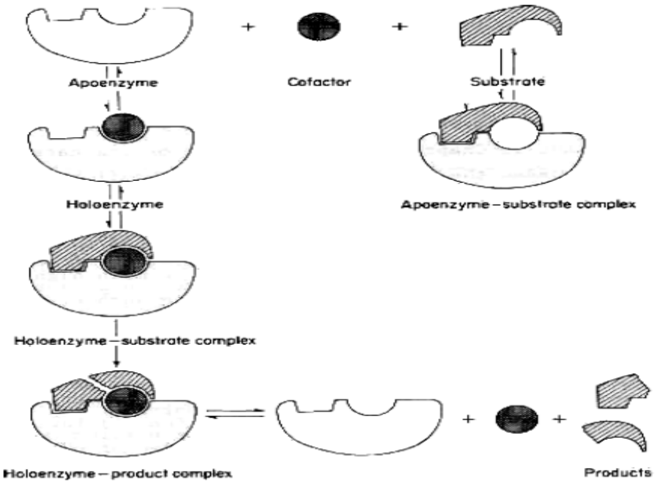
2.5 เอนไซม์

เอนไซม์คือ กลุ่มโปรตีนที่มีหน้าที่พิเศษแตกต่างจากโปรตีนทั่วไปคือ มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง คือใช้เอนไซม์ปริมาณน้อยแต่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว เร่งปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง คือ ไม่ต้องใช้อุณหภูมิหรือความดันสูง มีความจำเพาะต่อสารที่ทำปฏิกิริยาซึ่งเรียกว่า สารตั้งต้น เอนไซม์บางชนิดไม่จำเป็นต้องมีโคแฟกเตอร์เพื่อช่วยในการทำงานเรียกว่า อะโพเอนไซม์ (apoenzyme) บางชนิดจำเป็นต้องมีโคแฟกเตอร์ในการทำงานเรียกว่า โฮโลเอนไซม์ (holoenzyme) และเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสูง เช่น เอนไซม์อะไมเลสจะไม่ย่อยสลายโปรตีนเป็นต้น ความจำเพาะนี้คล้ายกับความพอดีของแม่กุญแจซึ่งเทียบได้กับสารตั้งต้น และเอนไซม์เทียบกันได้ลูกกุญแจ และสามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาโดยไม่ทำให้เกิดผลิตผลอื่น ทั้งนี้เอนไซม์จะต้องจับกับสารตั้งต้นก่อนจึงจะเร่งให้เกิดเป็นผลิตผลได้ดังภาพ 2.10 และสามารถเขียนสมการของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังสมการ 2.16

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [ES] \overset{k_2}{\rightleftharpoons} E + P \qquad (2.16)$$

E = เอนไซม์ S = สารตั้งต้น A = ผลผลิต
ES = สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้น

การที่เอนไซม์ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นมาก แม้จะมีปริมาณเอนไซม์เพียงเล็กน้อย เนื่องจากช่วยลดพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยา (activation energy, Ea) ตามทฤษฎีที่ว่าในการเกิดปฏิกิริยาทั่วไป ตัวทำปฏิกิริยาจะเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ได้ต้องผ่าน transition state ก่อน กล่าวคือ โมเลกุลของสารตั้งต้น (S) จะรับพลังงานกระตุ้นแล้วเปลี่ยนเป็น S* ก่อน จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นผลผลิตต่อไป แต่กรณีเมื่อมีเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้อง สารตั้งต้นจะรวมกับเอนไซม์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของสารตั้งต้นกับเอนไซม์ (ES) ซึ่งใช้พลังงานกระตุ้นลดลงจึงทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ได้เร็วขึ้น แล้วเอนไซม์ก็จะเป็นอิสระถูกนำกลับไปใช้ใหม่ดังภาพ 2.10 การที่เอนไซม์ถูกนำไปใช้รอบใหม่เรียกว่า จึงมีตัวเลขเทอร์นโอเวอร์ (turnover number) ซึ่งหมายถึงจำนวนโมลของสารตั้งต้นที่เปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์โดยเอนไซม์จำนวน 1 โมล ภายใน 1 หน่วยเวลา (วินาทีหรือนาที) ค่าเทอร์นโอเวอร์ขั้นต่ำของเอนไซม์จะเป็นค่าระหว่าง 10^{-1}-10^{-2} วินาที และขั้นสูงถึง 10^{-6}-10^{-7} ต่อวินาทีและโดยทั่วไปเอนไซม์จะมีค่าเทอร์นโอเวอร์ในช่วง 10^{3}-10^{6} ต่อนาที


Apoenzyme
Cofactor
Substrate
Holoenzyme
Apoenzyme – substrate complex
Holoenzyme – substrate complex
Holoenzyme – product complex
Products

ภาพ 2.10 ความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ โคแฟคเตอร์ สารตั้งต้น และผลิตผล

ที่มา **:** Whitaker *et al.* (1994)

2.5.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาของสารตั้งต้นจนได้เป็นผลผลิตแล้ว จะสามารถกลับมาทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้อีกอย่างต่อเนื่อง การได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมจึงมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โดยปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โดยสรุปประกอบด้วย

1. ความเข้มข้นของสารตั้งต้น เมื่อความเข้มข้นของสารตั้งต้น เพิ่มขึ้น อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นจนถึงจุดที่มีความเร็วสูงสุด ในกรณีที่มีสารตั้งต้น เพียงชนิดเดียวและความเข้มข้นของเอนไซม์คงที่ และหลังจากนั้นแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้น อัตราเร็วของปฏิกิริยาก็ไม่เพิ่มขึ้น ในบางกรณีความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่สูงเกินไปอาจยับยั้งปฏิกิริยาทำให้อัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยาลดลงได้

2. ความเข้มข้นของเอนไซม์ อัตราเร็วของปฏิกิริยามักจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ เมื่อมีปัจจัยอื่นๆ เช่น ความเข้มข้นของสารตั้งต้น ค่าพีเอช และอุณหภูมิคงที่ ยกเว้น ในกรณีต่างๆ ดังนี้คือ อัตราการละลายของสารตั้งต้น มีขีดจำกัด เช่น การละลายของออกซิเจนในระบบที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน การผันแปรสมบัติของสารตั้งต้น หรือผลิตภัณฑ์จนทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ หรือการที่โคแฟคเตอร์ที่จำเป็นสำหรับเอนไซม์แตกตัวออกจากเอนไซม์ เป็นต้น

3. ค่าพีเอช เอนไซม์ส่วนใหญ่จะเร่งปฏิกิริยาได้ในช่วงพีเอช ระหว่าง 4-10 ถ้าพีเอชต่ำกว่า 4 หรือสูงกว่า 10 จะทำให้เอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างถาวร ยกเว้น เปปซิน เรนนิน และอัลคาไลน์-

ฟอสฟาเทส ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ทุกชนิดเป็นโปรตีน การเปลี่ยนแปลงพีเอชมีผลต่อประจุบนโมเลกุลของโปรตีนจึงมีผลต่อการทำงานที่บริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ และจะมีผลสูงสุดเมื่อมีความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนหรือไฮดรอกซิลไอออนมากจนถึงจุดพีไอ ซึ่งโครงสร้างโมเลกุลแบบตติยภูมิของโปรตีนถูกทำลาย จึงทำให้ การรวมตัวของเอนไซม์กับสารตั้งต้นที่บริเวณเร่งไม่สามารถเกิดขึ้นได้ เอนไซม์แต่ละชนิดมีค่าพีเอชที่เหมาะสม สำหรับเร่งปฏิกิริยาให้ได้ความเร็วสูงสุด

4. อุณหภูมิ การเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้สารที่ทำปฏิกิริยามีพลังงานมากพอที่จะทำให้สารนั้นกลายเป็นสารที่ถูกกระตุ้นแล้วมีพลังงานสูง อยู่ในสภาพที่จะเปลี่ยนไปเป็นผลิตผลอย่างรวดเร็ว การเพิ่มอุณหภูมิจึงทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น แต่การเพิ่มอุณหภูมิทำให้โปรตีนซึ่งมีโครงรูปสามมิติที่ต้องจัดเรียงตัวของหมู่ต่างๆ ในโมเลกุล โดยเฉพาะบริเวณเร่งให้พอเหมาะแก่การจับกับสารตั้งต้น แล้วเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นผลผลิตได้ เมื่อมีอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้โปรตีนแปลงสภาพจากธรรมชาติ จึงทำให้เอนไซม์มีสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาลดลงหรือเสียไป

5. แอกติวิตีของน้ำ การทำงานเอนไซม์โดยทั่วไปจะเกิดได้ดีเมื่ออยู่ในภาวะที่เป็นสารละลายในน้ำ ยกเว้น เอนไซม์บางชนิด เช่น ไรโบนิวเคลียเอส และไลโซไซม์ เนื่องจากน้ำเป็นตัวทำละลายทั้งเอนไซม์และสารตั้งต้น จึงทำให้มีการการชนกันของโมเลกุลทั้ง 2 ชนิด จนสามารถจับตัวกันได้ ยิ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส น้ำยังทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้น ด้วยปฏิกิริยาจึงเกิดได้ดี เมื่อมีค่าแอกติวิตีของน้ำค่อนข้างสูง

6. โคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ เอนไซม์จำนวนมากจะเร่งปฏิกิริยาได้ต่อมีโคแฟคเตอร์ร่วมทำงานด้วย เช่น พอลิฟีนอลออกซิเดส ต้องมีไอออนของทองแดง แอลฟา-อะไมเลสต้องมีไอออนของแคลเซียมเป็นต้น หากขาดโคแฟคเตอร์ก็จะทำให้เอนไซม์ทำงานไม่ได้

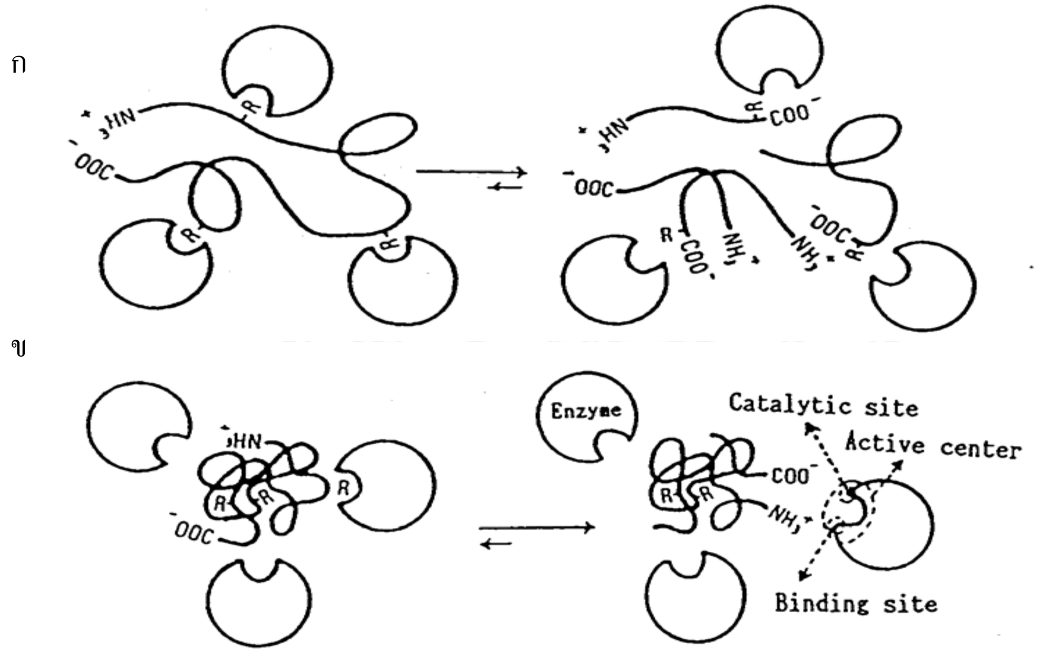
7. สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibitor) เป็นสารที่มีผลทำให้ความเร็วของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาลดลง เช่น ทริปซินอินฮิบิเตอร์ ที่พบในถั่วเหลืองซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน

2.5.2 เอนไซม์โปรติเอส (protease enzyme)

เอนไซม์ที่นิยมใช้ในการปรับปรุงการละลายของโปรตีน คือเอนไซม์โปรทิเอส หรือเอนไซม์โปรทิโอไลติก (proteolytic enzyme) ซึ่งสามารถไฮโดรไลซ์พันธะเปปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีนได้ ทำให้โมเลกุลโปรตีนมีขนาดเล็กลงและมีหมู่ที่แตกตัวได้ (ionizing group) (NH_4^+ และ COO^-) เพิ่มขึ้น สามารถเกิดอันตรกิริยากับโมเลกุลของน้ำได้มากขึ้น การละลาย จึงมีค่าเพิ่มขึ้น การใช้เอนไซม์มีข้อได้เปรียบเหนือกว่าการใช้สารเคมีตรงที่มีความเฉพาะเจาะจงในการทำปฏิกิริยามากกว่า สามารถควบคุมปฏิกิริยาได้ง่าย มีความสามารถในการทำงานแม้ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำๆ สภาวะการทำงานไม่รุนแรงจึงไม่ทำให้สูญเสียคุณค่าทางอาหารและที่สำคัญมีความปลอดภัยในการใช้สูง (Howell, 1996)

ในการใช้เอนไซม์นอกจากต้องคำนึงถึงชนิดของเอนไซม์ที่จะนำมาใช้แล้ว ยังต้องเลือกสภาวะในการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ให้เหมาะสม โดยต้องควบคุมสิ่งต่าง ๆ เหล่านี้ คือ พีเอช อุณหภูมิ ระยะเวลา ความเข้มข้นของสารตั้งต้น และเอนไซม์ให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด นอกจากนี้วัตถุดิบตั้งต้นก็มีความสำคัญมาก มีรายงานว่าถ้าในวัตถุดิบมีไขมันมากโมเลกุลของโปรตีนถูกไฮโดรไลซ์ได้น้อยลง เนื่องจากไขมันสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนกลายเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนได้ การใช้เอนไซม์เพื่อปรับปรุงสมบัติทางหน้าที่นั้นจะไฮโดรไลซ์เพียงระดับหนึ่งเท่านั้น (limited hydrolysis หรือ partiallyhydrolysis) เพราะถ้าเกิดการไฮโดรไลซิสมากเกินไปอาจทำให้เกิดรสขมและอาจทำลายสมบัติทางหน้าที่อื่นๆ ของโปรตีนที่ต้องการในผลิตภัณฑ์ เช่น สมบัติการเกิดฟอง สมบัติการเกิดอิมัลชัน เป็นต้น ในการควบคุมและติดตามการไฮโดรไลซิสโปรตีนของเอนไซม์นั้นมักพิจารณาจากระดับการไฮโดรไลซิส (degree of hydrolysis) ที่เกิดขึ้น ซึ่งหมายถึงเปอร์เซ็นต์พันธะเปปไทด์ที่ถูกทำลายเทียบกับพันธะเปปไทด์ที่มีอยู่เดิมในวัตถุดิบ ถ้าระดับการไฮโดรไลซิสสูงหมายถึงเอนไซม์มีความสามารถในการไฮโดรไลซ์พันธะเปปไทด์ของโมเลกุลโปรตีนได้มากวิธีการประเมินระดับการไฮโดรไลซิสมีหลายวิธี ได้แก่ Osmometry Method, pH Stat Method, TNBS (trinitro-benzene sulfonic acid) method, OPA (o-phthaldialdehyde) method หรือ TCA (trichloroacetic acid) index method (Nielsen *et al*., 2001) ซึ่งวิธีสุดท้ายนี้ใช้การวัดความก้าวหน้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเป็นเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติกเทียบกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในวัตถุดิบ (Kim *et al*., 1990) ผลของการไฮโดรไลซิสจะทำให้โปรตีนมีขนาดโมเลกุลเล็กลงและขนาดของสายเปปไทด์สั้นลง ซึ่งขนาดของโมเลกุลโปรตีนนิยมหาโดยวิธี Electrophoresis, Gel Filtration Chromatography หรือ Ultracentrifugation เป็นต้น (Howell, 1996)

เอนไซม์เข้ามามีบทบาทในกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารอย่างกว้างขวางในระดับอุตสาหกรรมซึ่งนิยมใช้เอนไซม์ในการดัดแปรโปรตีนมากกว่าการใช้สารเคมี เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิด ให้ผลในการย่อยสลายที่แตกต่างกันและมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสูงสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะไม่รุนแรงและไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการ เอนไซม์ที่ใช้ในการดัดแปรโปรตีนมีหลายประเภท ขึ้นกับการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543) โปรติเอสเป็นเอนไซม์ประเภทไฮโดรเลส (Hydrolase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีน โดยจะตัดพันธะเปปไทด์ของพอลิเปปไทด์ได้เป็นเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระ นอกจากนี้เอนไซม์โปรติเอสสามารถแบ่งเป็นประเภทต่างๆ ได้หลายแบบ เช่น แบ่งตามลักษณะการตัดสายยาวของพอลิเปปไทด์ได้เป็น 2 แบบ คือ เอกซ์โซเปปติเดส (Exopeptidases) และเอ็นโดเปปติเดส (Endopeptidase)


ก
H_3N^+
^-OOC
R
R
R
H_3N^+
R
COO^-
^-OOC
R
COO^-
NH_3^+
NH_3^+
^-OOC
R
ข
H_3N^+
R
R
R
^-OOC
Enzyme
Catalytic site
Active center
R
R
COO^-
NH_3^+
Binding site

ภาพ 2.11 ลักษณะการเข้าไฮโดรไลซ์โมเลกุลโปรตีนโดยโปรติเอส ภาพ ก) โมเลกุลโปรตีนที่พบในธรรรมชาติ ภาพ ข) โมเลกุลโปรตีนที่ถูกทำให้เสียสภาพบางส่วนด้วยความร้อน

ที่มา: Fukushima *et al.*(1992)

(1) เอกซ์โซเปปติเดส (Exopeptidases) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์ด้านปลายโซ่ของโมเลกุล ถ้าเป็นการตัดพันธะทางปลายด้านกลุ่มอะมิโน เรียกว่า Aminopeptidase ขณะที่การตัดพันธะทางปลายด้านกลุ่มคาร์บอกซิล เรียกว่า Carboxypeptidase

(2) เอ็นโดเปปติเดส (Endopeptidase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์อย่างอิสระภายในโซ่โมเลกุลของโปรตีนได้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ เอ็นโดเปปติเดสมีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนสูง เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงต่อซับสเตรทที่เป็นเปปไทด์โมเลกุลใหญ่หลายชนิดทำให้สามารถย่อยโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543)

นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมยังนิยมใช้เอนไซม์ทางการค้าในการย่อยสลายโปรตีน โดยเอนไซม์เหล่านี้ส่วนใหญ่ได้มาจากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติและสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนแตกต่างกัน เช่น

2.5.2.1 ทริปซิน (trypsin)

เป็นเอนไซม์โปรติเอสในกลุ่มเซอรีน (Serine) จัดเป็น endopeptidase โดยการตัดสุ่มสายด้านในของโปรตีน มีช่วงที่ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช เท่ากับ 8 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โครงสร้างประกอบด้วยกรดอะมิโนฮีสทีดีนอิสระที่ตำแหน่ง 57 กรดอะมิโนแอสพาร์เทตอิสระที่ตำแหน่ง 10 และกรดอะมิโนเซอรีนที่ตำแหน่ง 195 โครงสร้างของกรดอะมิโนทั้งสามชนิดก่อให้เกิดเป็นบริเวณเร่งของเอนไซม์ที่เรียกว่า “the active site serine nucleophilic” ในโครงสร้างนี้มีกรดอะมิโนแอสพาเทตที่ตำแหน่ง 189 ซึ่งจะอยู่ในโครงสร้างของบริเวณเร่ง กรดอะมิโนแอสพาเทตที่ตำแหน่ง 189 นี้จะทำหน้าที่จับบริเวณประจุบวกของกรดอะมิ-โนไลซีน และกรดอะมิโนอาร์จินีนให้เกิดสภาวะที่คงตัว ความสามารถในการทำงานเอนไซม์ทริปซินจะตัดสายเปปไทด์บริเวณหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนไลซีน กรดอะมิโนอาร์จินีน ยกเว้นหากกรดอะมิโนนั้นๆ ตามด้วยกรดอะมิโนโพรลีน (ผกามาส ปุรินทราภิบาล, 2552)

2.5.2.2 ไคโมทริปซิน (chymotrypsin)

เป็นเอนไซม์โปรติเอสในกลุ่มเซอรีน (Serine) เช่นเดียวกับทริปซิน มีช่วงที่ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช เท่ากับ 8 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โครงสร้างภายในประกอบด้วยมีโครงสร้างที่เป็น “hydrophobic pocket” ความสามารถในการทำงานมีความสามารถตัดพันธะเปปไทด์ที่บริเวณหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนไธโรซีน กรดอะมิโนทริปโตเฟน และกรดอะมิโน

ฟีนิลอะลานีน เพราะกรดอะมิโนเหล่านี้มีโครงสร้างเป็น aromatic ring ที่เหมาะต่อการเข้าจับบริเวณ “hydrophobic pocket” ของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังสามารถตัดพันธะเอสเทอร์ของสารตั้งต้น เช่น N-acetyl- L- tyrosine methyl และ N-benzoyl L-arginine methyl เป็นต้น (ผกามาส ปุรินทราภิบาล, 2552)

2.5.2.3 ปาเปน (papain)

เป็นเอนไซม์โปรติเอสในกลุ่มซัลไฟดริล (sulfhydryl) ประกอบด้วยพอลิเปปไทด์สายเดี่ยว จัดเป็น endopeptidase สามารถสกัดได้จากมะละกอ มีอยู่ 4 ชนิด คือ Papain, Chymopapain A และ B และ Papaya peptidase A โดย Chymopapain เป็นเอนไซม์ที่พบมากที่สุดในยางมะละกอ มีความทนร้อนและทนกรดได้ดี รองลงมาคือ Papain มีช่วงที่ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช เท่ากับ 6- 7.5 อุณหภูมิ 30- 50 องศาเซลเซียส ถูกยับยั้งด้วย sulfhydryl reagent จะไฮโดรไลซ์สารตั้งต้นที่มี L-arginine, L-lysine, glycine และ citrulline จะสูญเสียแอคติ-วิตีเมื่อหมู่ซัลไฟดริลเปลี่ยนแปลง (จำรัส นิมิตรพรชัย, 2534)

2.5.2.4 โบรมีเลน (bromelain)

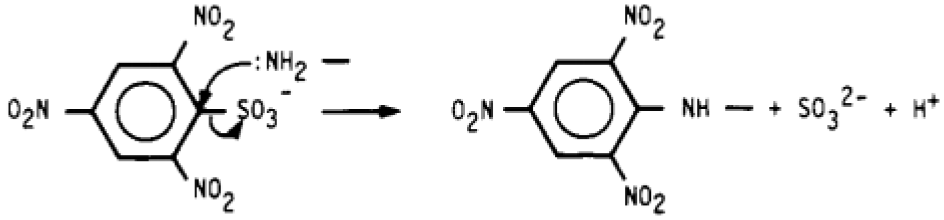
จัดเป็นเอนไซม์อยู่ในกลุ่มของเซอรีนโปรติเอส (serine) พบได้ตามส่วนต่างของสับปะรด ทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-60 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 7.0-7.4 แต่สลายตัวได้ในน้ำ มีความจำเพาะเจาะต่อเอนไซม์จำพวกกลุ่มซัลไฟดริล ไฮโดรไลซ์สารตั้งต้นที่มี N-benzoyl-Larginine ethyl ester และ N-benzoyl-L-arginine amide ตัดโปรตีนที่ตำแหน่งกรดอะมิโนไลซีน ไกลซีน ไทโรซีน และ อะลานีน ซึ่งให้เปปไทด์ที่มีกลิ่นรสไม่ขม เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (ณัฐวุฒิ ส่งแสง และคณะ, 2550)

2.5.2.5 ฟลาโวไซม์ (Flavorzyme®)

เป็นเอนไซม์ทางการค้าที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Aspergillus oryzae* ทำหน้าที่เป็นทั้งเอนโดเปปติเดส และเอกโซเปปติเดส ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ไม่มีรสขม มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 50 องศาเซลเซียส และมีพีเอช ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5-7 (ณัฐวุฒิ ส่งแสง และคณะ, 2550)

2.5.3 ระดับการย่อยสลายโปรตีน (Degree of hydrolysis, DH)

การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ทำได้โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสตัดพันธะเปปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนอิสระและเปปไทด์ที่สั้นลง การย่อยสลายโปรตีนด้วยวิธีนี้มีข้อดี คือ เอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นสูงจึงไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณมาก และสามารถย่อยสลายโปรตีนได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรง นอกจากนี้การใช้เอนไซม์มีอัตราการย่อยสลายโปรตีนค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กรดหรือด่าง แต่การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสอาจทำให้เกิดสารประกอบที่มีรสขมได้เนื่องจากการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่มีหมู่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic group) ในโมเลกุลของโปรตีนเช่น Isoleucine, Phenylalanine, Trytophan, Tyrosine และ Valine แต่เมื่อมีการควบคุมระดับการย่อยสลายโปรตีนแล้วสารประกอบที่ให้รสขมนี้จะเกิดน้อยลงเพราะสายเปปไทด์ที่เกิดขึ้นจะจัดเรียงตัวในลักษณะที่ไม่ก่อให้เกิดรสขม จึงสามารถควบคุมกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ได้ด้วยการควบคุมระดับการย่อยสลายโปรตีน (Degree of hydrolysis) (Kristinsson and Rasco, 2000)



ภาพ 2.12 ปฏิกิริยาของ TNBS กับกลุ่มของอะมิโน

ที่มา : Nissen *et al.* (1985) อ้างโดย ธนัยพร จันท์แสนโรจน์ (2550)

การวิเคราะห์ด้วย TNBS นั้นเป็นสารที่จำเพาะต่อ Primary amino groups ทำการวิเคราะห์โดยผสม TNBS กับ โปรตีนไฮโดรไลเสตแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร ข้อเสียของวิธีนี้คือ ใช้เวลาในการวิเคราะห์นานสารเคมีที่ใช้อาจปนเปื้อนด้วย Picric acid ทำให้ค่าที่ได้จากแบลงค์สูง TNBS ไม่เกิดปฏิกิริยากับ Proline และ Hydroxyproline และ TNBS สามารถทำปฏิกิริยากับ Amino group ของ lysine ได้ (Nissen *et al.,* 1985 อ้างโดย ธนัยพร จันท์แสนโรจน์, 2550) โดยระดับการย่อยสลายโปรตีนสามารถคำนวณได้จากสมการ 2.17

$$DH = \frac{(L_t - L_0) \times 100}{(L_{max} - L_0)} \qquad (2.17)$$

โดย

L_t = ปริมาณ α - amino acid ที่เวลา t
L_0= ปริมาณ α - amino acid เริ่มต้น
L_{max} = ปริมาณ α - amino acid หลังจากย่อยโปรตีนเสร็จแล้ว

2.5.4 สมบัติการละลาย (Solubility)

การละลายเป็นสมบัติเบื้องต้นที่สำคัญของโปรตีนไฮโดรไลเสต เพราะเป็นสมบัติที่อิทธิพลต่อสมบัติในด้านอื่นๆ เช่น อิมัลซิไฟเออร์ การเกิดโฟมและการเกิดเจล เป็นต้น (Halling *et al.*, 1981) จากงานวิจัยของ Clemente และคณะ (1996) ศึกษาสมบัติการละลายของโปรตีนถั่ว Chickpea 4 แบบ คือ โปรตีนถั่ว Chickpea เข้มข้น (CPI), โปรตีนถั่ว Chickpea ที่ย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ฟลาโว-ไซม์ (FCPH), โปรตีนถั่ว Chickpea ที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (ACPH) และโปรตีนถั่ว Chickpea ที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (AFCPH) พบว่า โปรตีนถั่ว Chickpea มีการละลายดีขึ้นเมื่อผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ โดย ACPH มีค่าการละลายร้อยละ 100 ที่พีเอช 7-8 ในขณะที่การใช้เอนไซม์ฟลาโวไซม์มีค่าการละลายมากกว่าร้อยละ 90 ที่พีเอช เท่ากับ 7 และพบว่าการใช้เอนไซม์อัลคาเลสร่วมกับเอนไซม์ฟลาโวไซม์ในการดัดแปรโปรตีนถั่ว ขณะที่ Klompong และคณะ (2007) ได้ศึกษาความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาสีกุนข้างเหลือง (*Selavoides leptolepsis*) ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสหรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนร้อยละ 5, 15 และ 25 พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตมีความสามารถในการละลายสูงสุดเมื่อระดับการย่อยสลายโปรตีนเท่ากับร้อยละ 25 และจากการทดสอบอิทธิพลของพีเอช ในช่วง 2-12 ต่อความสามารถในการละลาย พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตมีค่าการละลายต่ำสุดที่ พีเอช เท่ากับ 4 และมีค่าการละลายสูงสุดที่พีเอช ในช่วง 8-11 ส่วนโปรตีนที่ผ่านการดัดแปลงด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีค่าการละลายสูงสุดในช่วงพีเอช เท่ากับ 6-8 เช่นเดียวกับการศึกษาของ Thiansilakul และคณะ (2007) ที่พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทูแขก (*Decapterus maruadsi*) มีค่าการละลายสูงขึ้นเมื่อโปรตีนผ่านกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์โดยค่าการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตทีตรวจสอบด้วยวิธี Nitrogen solubility index มีค่าสูงถึงร้อยละ 99

2.6 แนวทางการใช้ประโยชน์จากรำข้าว

รำข้าวมีศักยภาพในการใช้ผลิตเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพเนื่องจากโปรตีนที่ในรำข้าวมีคุณค่าทางอาหารสูง (Kennedy and Burlingame, 2003) และไม่ก่อให้เกิดการแพ้ (Tsuji *et al*., 2001) นอกจากนั้นยังอุดมไปด้วยสารอาหาร วิตามิน แร่ธาตุ และสารต้านอนุมูลอิสระ สารหลายชนิดในรำข้าวมีประโยชน์ต่อสุขภาพและต่อต้านโรคไม่ติดต่อหลายโรค แต่อย่างไรก็ตามปัญหาหลักของรำข้าวในการผลิตเป็นเครื่องดื่มก็คือรำข้าวไม่ละลายน้ำ โปรตีนในรำข้าวเกาะตัวกันแน่นด้วยพันธะไดซัลไฟด์ทำให้ไม่สามารถละลายน้ำได้ ดังนั้นการปรับปรุงสมบัติการละลายของรำข้าวจึงเป็นสิ่งจำเป็นต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจากรำข้าว เอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอส รายงานว่าถูกใช้ในการปรับปรุงสมบัติการละลายของรำข้าว (Parrado *et al*., 2006)

ศุภวรรณ ถาวรชินสมบัติ (2552) ศึกษาหาแนวทางในการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับกากรำข้าว โดยสกัดเปปไทด์ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจากโปรตีน มีคุณสมบัติเป็นสารช่วยลดความดันและต้านอนุมูลอิสระได้ ขั้นแรกนำรำข้าวมาสกัดน้ำมันออกก่อน จากนั้นจึงนำไปสกัดโปรตีนรำข้าว โดยใช้สภาวะเป็นด่าง (พีเอช 11) จะได้โปรตีนรำข้าว เสร็จแล้วนำไปผสมน้ำในอัตราส่วน น้ำ : โปรตีน เท่ากับ 4:1 จากนั้นนำมาปรับสภาพให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ในการย่อยโปรตีนจะทำงาน คือ ค่าพีเอช 8 อุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการย่อยสลายประมาณ 4 ชั่วโมง เสร็จแล้วนำมาแยกโดยการกรอง จะได้สารละลายที่มีองค์ประกอบของเปปไทด์ ต่อจากนั้นจึงนำสารละลายมาทำแห้งแบบระเหิดจะได้ผงสีเหลืองอ่อน ไม่มีกลิ่น สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น การผลิตเป็นอาหารเสริมสุขภาพ การผสมในอาหารและเครื่องดื่มต่างๆ เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการอันจะส่งผลดีต่อสุขภาพ โดยเฉพาะการควบคุมความดันและการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นคุณสมบัติเด่นของเปปไทด์จากโปรตีนรำข้าว โดยเบื้องต้นทดลองนำมาผลิตในรูปแบบผงละลายน้ำหรือเป็นส่วนผสมของเครื่องดื่มต่างๆ เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ เช่นน้ำนมถั่วเหลือง น้ำข้าวกล้อง นอกจากนี้ยังทดลองผลิตเป็นผงบรรจุในแคปซูลสำหรับคนที่รักสุขภาพ ผลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับรำข้าวได้ไม่น้อยทีเดียว หากจำหน่ายกากรำข้าวเพื่อเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์จะขายได้ที่ราคาเพียงกิโลกรัมละ 6-8 บาทเท่านั้น แต่เมื่อนำมาสกัดเพื่อให้ได้เปปไทด์จากโปรตีนรำข้าว เปปไทด์ที่ได้จะมีราคาถึงกิโลกรัมละ 1,000-2,000 บาท โดยจากการศึกษากากรำข้าวสามารถสกัดเปปไทด์ได้ประมาณร้อยละ 5 ของน้ำหนัก

Faccin และคณะ (2009) ศึกษาการปรับปรุงคุณสมบัติทางเคมี ความหนืด ความเป็นกรด พีเอช และจุลินทรีย์ในเครื่องดื่มรำข้าวอินทรีย์ กลิ่นสตรอเบอร์รี่และกลิ่นโกโก้ ที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ที่

อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 และ 30 นาที พบว่า เครื่องดื่มรำข้าวที่ได้มีลักษณะเป็นอิมัลชัน มีสมบัติทางเคมีและความเป็นกรดไม่แตกต่างของรำข้าวที่ผ่านการแปรรูปเป็นเครื่องดื่มและไม่ได้แปรรูป แต่รำข้าวที่ผ่านการแปรรูปเป็นเครื่องดื่มมีปริมาณกรดอะมิโนลดลงจากรำข้าวที่ได้ผ่านการแปรรูป อุณหภูมิที่พาสเจอร์ไรส์ 15 นาทีเพียงพอต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย สามารถเก็บได้นาน 20 วัน และจากการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสโดยวิธี 9 points Hedonic scale พบว่ามีคะแนนสูงกว่า 6 ซึ่งผู้บริโภคให้การยอมรับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มรำข้าว

2.6.1 เสถียรภาพของแอนโทไซยานิน

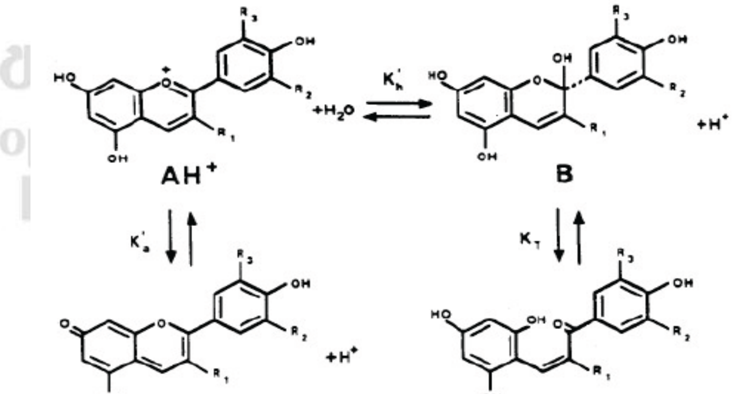
แอนโทไซยานินจากธรรมชาติสามารถนำมาประยุกต์ใช้□ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม และผลิตภัณฑ์□อื่นๆ ได้หลายชนิด แต่□ที่ได□รับความสนใจมากในปัจจุบันคือคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) จึงมีแนวโน้มนำมาประยุกต์ใช้ในด้านสุขภาพและความงาม โดยช่วยลดการเกิดริ้วรอยของผิวจากรังสียูวีและมลภาวะ อีกทั้งช่วยป้องกันเซลล์□เส้นผมไม่ให้อ่อนแอและทำให้เส้นผมเงางามแข็งแรง

แอนโทไซยานินประกอบด้วยส่วนของอะไกลโคน (aglycone) น้ำตาล (sugar) และหมู่เอซิล (acyl group) กำลังการผลิตแอนโทไซยานินทั่วโลกมีประมาณ 10,000 ตัน (คำนวณกำลังการผลิตจากองุ่นเพียงชนิดเดียว) (Andersen and Jordheim, 2006) ปัจจุบันมีการค้นพบแอนโทไซยานินมากกว่า 300 ชนิดจากสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์□ที่ได้พบกว่า 7,000 ชนิดแต่ละชนิดจะมีสีสันและคุณสมบัติแตกต่างกันไป แม้□ว่าแอนโทไซยานินจะมีด้วยกันหลายชนิดแต่ทุกชนิดจะมีโครงสร้างหลักเป็นสารชนิดเดียวกันที่เรียกว่า แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) ที่มีคาร์บอน 15 อะตอมอยู่ภายในโมเลกุล (สัมพันธ์□ คัมภิรานนท์□, 2546) คือ โครงสร้างแบบ C6-C3-C6 ซึ่งเป็นไกลโคไซด์□ (glycoside) ของ 2-phenylbenzopyrylium หรือ flavylium cation แอนโทไซยานิดินสามารถเกิดได้□ประมาณ 20 ชนิด แต่มีอยู่ 6 ชนิดเท่านั้นที่พบได้□บ่อยในพืชคือ pelargonidin (Pg) คิดเป็นร้อยละ 18 cyanidin (Cy) คิดเป็นร้อยละ 30 delphinidin (Dp) คิดเป็นร้อยละ 22 และ peonidin (Pn) petunidin (Pt) และ malvidin (M) คิดเป็นร้อยละ 20 (Andersen and Jordheim, 2006)

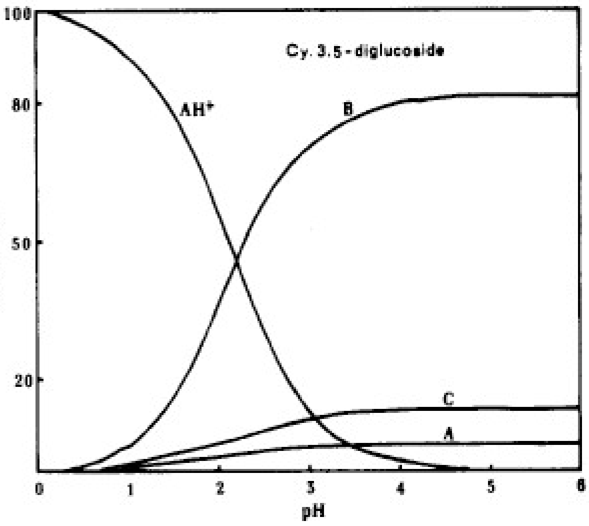
การแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซี (-OH) และหมู□เมทอกซี (-OCH$_3$) ของ flavylium ring จะทำให้เกิดสีของแอนโทไซยานิดินกล่าวคือ การเพิ่มจำนวนของหมู่□ไฮดรอกซีจะทำให้เกิดสีฟ้า (bluish shade) ส่วนการเพิ่มจำนวนของหมู่□เมทอกซีจะทำให้เกิดสีแดง (redness) การเพิ่มจำนวนของหมู่□ ไฮดรอกซีจะทำให้□ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)

เพิ่มขึ้น เนื่องจากการแทนที่ของกรดและด่างเกิดขึ้นได้ในหลายตำแหน่ง จึงทำให้จำนวนของแอนโทไซยานินมีมากกว่าแอนโทไซยานิดิน 15-20 เท่าโมเลกุลของน้ำตาลที่ต่อกับแอนโทไซยานิดิน ได้แก่ กลูโคส (glucose) กาแลกโตส (galactose) แรมโนส (rhamnose) อะราบิโนส (arabinose) ไดแซ็กคาไรด์และไตรแซ็กคา-ไรด์□ โดยแอนโทไซยานินที่พบมากที่สุดคือ 3-monoside, 3-biosides, 3,5-diglycosides และ 3,7- diglycosides (Sikorski *et al*., 2007)

ในสารละลายตัวกลาง (aqueous media) แอนโทไซยานินจะทำหน้าที่เป็นอินดิเคเตอร์วัดความเป็นกรด-ด่าง คือ ให้สีแดงที่พีเอชต่ำ ให้สีน้ำเงินที่สภาวะเป็นกลาง และไม่มีสีที่พีเอชสูง ในสารละลายที่เป็นกรดและเป็นกลางนั้น มีโครงสร้างของแอนโทไซยานิน 4 โครงสร้างที่อยู่ในสภาวะสมดุลคือ red flavyliumcation (AH^+), blue quinonoidal base หรือ red quinonoidal base (A), colorless carbinol pseudobase (B) และcolorless chalcone (C) ดังแสดงในภาพ 2.13 ในสภาวะที่เป็นกรดและพีเอชต่ำกว่า 2 จะมี AH^+ เป็นโครงเด่น เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น AH^+ จะเกิดการสูญเสียโปรตอนเกิดเป็นสารละลาย blue quinonoidal base หรือ red quinonoidal base (A) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เกิดเป็นปกติ แต่การเกิดปฏิกิริยาไฮเดรชัน (hydration) ของ AH^+ จะทำให้เกิด colorless carbinol pseudobase (B) ซึ่งเกี่ยวข้องกับความแตกต่างกันของพีเอช และโครงสร้างของแอนโทไซยานินจึงทำให้ปริมาณของ AH^+, A, B และ C ที่สภาวะสมดุลมีความแตกต่างกัน เช่น โครงสร้างของ 3-glycoside และ 3,5-diglycoside จะเกิดขึ้นเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นมากกว่า 3 ซึ่งจะเกิดเป็น colorless carbinol pseudobase (B) อย่างไรก็ตามปริมาณเพียงเล็กน้อยของ blue quinonoidal base (A) และ colorless chalcone (C) จะปรากฏให้เห็นและมีปริมาณเพิ่มขึ้นที่พีเอชสูงขึ้นพีเอช 4-6 ดังแสดงในภาพ 2.14



ภาพ 2.13 การเปลี่ยนรูปโครงสร้าง (Structural transformation) ของแอนโทไซยานิน
ที่มา: Mazza and Brouillard (1987)



ภาพ 2.14 การกระจายของ AH$^+$, A, B และ C ของ cyaniding 3,5-diglucoside ที่สภาวะสมดุล
ที่มา: Mazza and Brouillard (1987)

2.6.1.1 ปัจจัยที่มีผลต่อสีและความเสถียรของแอนโทไซยานิน

จากการศึกษาค้นคว้าปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของแอนโทไซยานิน พบว่า ปัจจัยทางเคมีและฟิสิกส์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของแอนโทไซยานินมีผลต่อความเสถียรของ แอนโทไซยานินมากที่สุด ได้แก่ อุณหภูมิ แสง พีเอช ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ โลหะ น้ำตาล และออกซิเจน รวมทั้งความเข้มข้นโครงสร้างเคมีและองค์ประกอบของแอนโทไซยานิน ดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.6.1.1.1 โครงสร้าง (Structure) ความเสถียรและสีของแอนโทไซยานินขึ้นอยู่กับธรรมชาติและจำนวนของน้ำตาลที่ใกล้กับ flavylium ion และจำนวนของกรดที่เชื่อมต่อกับ glycosylic moiety รวมทั้งเกี่ยวข้องกับจำนวนและตำแหน่งในการแทนที่ flavylium ion ของไฮดรอกซิลและเมทอกซิล ตัวอย่างเช่น 3-deoxy anthocyanins ที่มีสีเหลืองเนื่องจากเกิดการดีไฮดรอกซีเลชัน (dehydroxylation) ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ทำให้มีความเสถียรมากกว่า 3-hydroxy anthocyanins ที่มีสีแดงและมีความเสถียรต่ำกว่ามาก นอกจากนี้ยังพบว่าแอนโทไซยานินที่ประกอบด้วย aromatic acyl groups มีความเสถียรมากกว่า unacylated pigments อาจเนื่องมาจากความเร็วในการเปลี่ยนสีจากการไฮเดรชัน (hydration) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ในแอนโทไซยานินนิวเคลียส (anthocyanin nucleus) การเพิ่มจำนวนของหมู่ไฮดรอกซี (OH group) ในวงแหวนของแอนโทไซยานินนำไปสู่การดูดซับแสงสูงสุด ทำให้ความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นและเกิดการเปลี่ยนสีจากสีส้มไปเป็นสีน้ำเงิน-แดง แต่การแทนที่ด้วยหมู่เมทอกซี (-OCH$_3$ group) จะให้ผลตรงข้ามกัน หมู่ไฮดรอกซีที่ C-3

จัดว่ามีความสำคัญเนื่องจากเป็นจุดที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีส้มและสีแดง (Sikorski *et al.*, 2007)

2.6.1.1.2 อุณหภูมิและพีเอช (Temperature and pH) การสลายตัวจากความร้อน (thermal degradation) มีผลต่อความเสถียรของแอนโทไซยานิน คือ เมื่ออุณหภูมิเพิ่ม ความเสถียรของแอนโทไซยานินและรงควัตถุต่างๆ ในอาหารจะลดลง ตัวอย่างเช่น cyaniding-3-glucoside และ cyaniding-3-rutinoside จะสลายตัวที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ในสารละลายกรดอ่อน ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน หรือความเสถียรทางความร้อนของแอนโทไซยานินที่สกัดจากเปลือกของดอกทานตะวัน (Sunflower hulls) จากการสกัดด้วยซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ความเข้มข้นของสารละลายต่างๆ ที่อุณหภูมิ 65-95 องศาเซลเซียส และที่พีเอช 1-5 พบว่า การสลายตัวของแอนโทไซยานินจะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในสารละลายที่ได้จากการสกัด ซึ่ง Hiemori และคณะ (2009) ได้ศึกษาองค์ประกอบและความเสถียรทางความร้อนของแอนโทไซยานินในข้าวสีดำ (*Oryza sativa* L. *japonica var.*) โดยแอนโทไซยานิน 6 ชนิดถูกนำมาวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC-PDA และ LC-(ESI)MS/MS พบว่า แอนโทไซยานินที่พบมากที่สุดคือ cyanidin-3-glucoside (572.47 ไมโครกรัม/กรัม คิดเป็นร้อยละ 91.13 ของปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด) และ peonidin-3-glucoside (29.78 ไมโครกรัมต่อกรัม คิดเป็นร้อยละ 4.74 ของปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด) รองลงมาคือ cyaniding-dihexoside 3 ไอโซเมอร์ และ cyaniding hexoside อีก 1 ชนิด นอกจากนี้ความเสถียรทางความ ร้อนของแอนโทไซยานินที่ประเมินจากการหุงข้าวและความดันที่ใช้ พบว่าวิธีการทั้งหมดของกระบวนการหุงข้าวสี (black rice) เป็นสาเหตุทำให้ปริมาณของแอนโทไซยานินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยความดัน (pressure) ที่ใช้ในการหุงข้าวเป็นสาเหตุสำคัญสุดที่ทำให้ปริมาณของ cyanidin-3-glucoside ลดลง รองลงมาคือ หม้อหุงข้าว (rice cooker) และปริมาณก๊าซที่ใช้ คิดเป็นร้อยละ 79.8, 74.2 และ 65.4 ตามลำดับ ในขณะเดียวกันปริมาณของ protocatechuic acid มีการเพิ่มขึ้นอีก 2.7-3.4 เท่า ในทุกวิธีการของกระบวนการหุงข้าว ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการหุงข้าวสีดำ เป็นสาเหตุให้เกิดการสลายตัวทางความร้อนของ cyanidin-3-glucoside และการเกิดของ protocatechuic acid ขึ้นพร้อมกัน

สีและความเสถียรของแอนโทไซยานินที่สกัดจากมะเขือเทศม่วงและแดงสด พบว่า พีเอช และอุณหภูมิมีผลต่อความเสถียรน้อยกว่าความเข้มข้นของแครอทสีม่วงและองุ่น เยื่อราสพ์เบอรี (raspberry pulp) จากธรรมชาติและผ่านการพาสเจอไรซ์จะไม่ไวต่อการเปลี่ยนสีของแอนโท-ไซยานินระหว่างกระบวนการผลิตและบรรจุกระป๋อง แต่สีจะจางไปภายหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ

37 องศาเซลเซียส นาน 50 วัน ทั้งนี้อุณหภูมิยังมีผลต่อการเปลี่ยนสีของแอนแทไซนิน เนื่องจากสัดส่วนของ cyanidin และ pelargonidin 3-glycoside ในน้ำผลไม้ราสเบอรีแดงเข้มข้นและภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน พบว่า แอนโทไซยานินมีการเปลี่ยนสีอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียสมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย

2.6.1.1.3 กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acids) มีผลต่อความเสถียรของ แอนโทไซยานินเกิดจากการควบแน่น (condensation) ของกรดแอสคอร์บิกที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของแอนโทไซยานิน กรดแอสคอร์บิกมีความสามารถในการป้องกันแอนโทไซยานิน เนื่องจากสามารถลดการเกิด o-quinone ก่อนกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชัน การสลายตัวของกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid degradation) มีผลทำให้เกิดการสลายตัวของแอนโทไซยานิน (anthocyanin degradation) เพิ่มขึ้น (Sikorski *et al.*, 2007) กรดแอสคอร์บิกเป็นนิวคลีโอไฟล์ (nucleophiles) ที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ โดยจะเข้าทำลายที่ส่วนของประจุของโมเลกุลของแอนโทไซยานิน นอกจากนี้ยังมีกลไกของกรดแอสคอร์บิกที่มีผลต่อความเสถียรของแอนโทไซยานิน คือ กรดแอสคอร์บิกเป็นสาเหตุทำให้เกิด oxidative cleavage ที่ pyrilium ring จากการกระทำของอนุมูลอิสระ กรดแอสคอร์บิกทำหน้าที่เป็น molecular oxygen activator ในการสร้างอนุมูลอิสระออกมาทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของแอนโทไซยานินการเติมกรดแอสคอร์บิกปริมาณ 330 มิลลิกรัม/ลิตรในสารละลายที่มี malvidin-3- glucoside, malvidin 3,5-diglucoside และ flavylium salt จะเกิดการแทนที่ที่ต่างกันในคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4 (พีเอช 2) โดยโครงสร้างของ anthocyanin flavylium salt มีบทบาทสำคัญต่อความเสถียรของ anthocyanin ซึ่ง diglucoside จะทำให้สีของ anthocyanin จางลงช้ากว่า monoglucoside ทั้งนี้ชนิดของ flavylium cation ไม่มีผลต่ออัตราการสลายตัวของกรดแอสคอร์บิก (rate of ascorbic acid degradation) อย่างมีนัยสำคัญ อะเซโรลา (acerola) เป็นแหล่งธรรมชาติของกรดแอสคอร์บิกที่ดีที่สุด การศึกษาส่วนประกอบของอะเซโรลาที่มีต่อความเสถียรของแอนโทไซยานินเปรียบเทียบกับอาไซอิ (acai) ที่ไม่พบกรดแอสคอร์บิกเป็นส่วนประกอบ พบว่า ความเสถียรของอะเซโรลาเกิดจากความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกในผลไม้ แต่การเติมกรดแอสคอร์บิกลงในสารละลายอาไซอิเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกเท่ากับอะเซโรลานั้นจะทำให้ความเสถียรของอาไซอิลดลงอย่างเห็นได้ชัด และระหว่างการเก็บรักษาน้ำผลไม้ พบว่า ไม่มีการตกค้างของกรดแอสคอร์บิก (ascorbic retention) และปริมาณการสูญเสียของแอนโทไซยานินในน้ำผลไม้เลย แต่อัตราการสูญเสียของแอนโทไซยานินในน้ำผลไม้ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของแอนโทไซยานิน โดยกรดแอสคอร์บิกจะสลายตัวร้อยละ 100 (ภายใน 9 วัน) เมื่อไม่มีแอนโทไซยานิน ขณะที่เมื่อมี malvidin-3-glucoside และ

malvdin 3,5-diglucoside จะทำให้กรดแอสคอร์บิกสลายตัวร้อยละ 15 และ 23 (ภายใน 9 วัน) ตามลำดับ

2.6.1.1.4 น้ำตาล (Sugars) การเติมน้ำตาลมีผลต่อความเสถียรของแอนโทไซยานิน ซึ่งขึ้นอยู่กับโครงสร้างความเข้มข้นของแอนโทไซนานินและชนิดของน้ำตาล โดย reducing และ non-reducing sugar มีผลในการทำลายความเสถียรของแอนโทไซยานินในแบล็คเคอเรนท์ (black currant) ความเสถียรทางความร้อนของแอนโทไซยานิน (anthocyanin thermostability) จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของซูโครส (concentration of sucrose) เพิ่มขึ้นจาก 0 เป็นร้อยละ 20 ขณะที่ความเข้มข้นที่ร้อยละ 40 จะมีผลดีต่อความเสถียรของรงควัตถุ ตรงข้ามกันความเสถียรทางความร้อนของรงควัตถุ (thermostability of pigments) จะลดลงแบบเส้นตรงเมื่อความเข้มข้นของฟรุกโตส (concentration of fructose) เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นเพราะการเกิดฟูรอลดีไฮด์ (furaldehyde formation)

2.6.1.1.5 ปัจจัยอื่น แอนโทไซยานินจะมีสีจางลงที่พีเอช 3 โดยการเติมโซเดียมซัลไฟต์ที่ C-2 หรือ C-4 ในส่วนกำเนิดสี (chromophore) ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดเร็วที่สภาวะความเป็นกรด (acidification) ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ EDTA และส่วนผสมระหว่างซัลเฟอร์ไดออกไซด์และ EDTA มีผลต่อการสูญเสียแอนโทไซยานินในน้ำผลไม้สตรอเบอรี่น้อยมากเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 10 สัปดาห์ ในทางกลับกัน การเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จะทำให้เกิดการสูญเสียแอนโทไซยานินและทำให้สารประกอบพอลิเมอร์ลดลงการทดลองกับสตรอเบอรี่และราสเบอรี่โดยใช้ความดันอุทกสถิต (hydrostatic pressure) สูงจาก 200-800 เมกะปาสคาล ที่อุณหภูมิ 18 และ 21 องศาเซลเซียสและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 20 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่า ความเสถียรของราสเบอรี่มีค่ามากที่สุดที่ความดันอุทกสถิต 200 เมกะปาสคาล (4 องศาเซลเซียส) รองลงมาคือ 800 เมกะปาสคาล (4 องศาเซลเซียส)

2.6.1.2 ประโยชน□ของแอนโทไซยานิน

2.7.1.2.1 ใช้เป็นสีผสมอาหาร (colorant) เนื่องจากคุณสมบัติพิเศษของผลิตภัณฑ์สีผสมอาหาร แอนโทไซยานินสามารถอยู่ในรูปแบบผงและของเหลวได้ จึงสามารถเลือกใช้ได้ตามต้องการของอาหาร และผสมกับส่วนของไข่ขาวเพื่อใช้เป็นสารช่วยให้ความคงตัว (stabilizer) แทนการใช้แป้ง รวมทั้งเพิ่มความคงตัวให้กับผลิตภัณฑ์ที่มีค่าปริมาณน้ำอิสระรวมทั้งเพิ่มความคงตัวให้□กับผลิตภัณฑ์□ ที่มี (water activity) ต่ำ แต่ทั้งนี้สีผสมอาหารแอนโทไซยานินไม่□ เหมาะกับผลิตภัณฑ์ที่มี พีเอชสูง เช่น น้ำมะนาว เป็นต้น (นารีรัตน์□ อนรรฆเมธี, 2553)

2.6.1.2.2 ใช้เป็นส่วนผสมในสารกันแดด (sunscreen) ช่วยให้ผิวหนังดูอ่อนกว่าวัยชะลอความเสื่อมสภาพของผิวหนังเนื่องจากสารแอนโทไซยานินช่วยยับยั้งความเสียหายของผิวหนังจากกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) ที่เกิดจากแสงอัลตราไวโอเลต โดยป้องกันการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว เมื่อใช้ร่วมกับวิตามินอีจะทำให้□การทำงานมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้ยังใช้ทำสบู่□ได้ด้วย (Francis *et al*., 2002)

2.6.1.2.3 ช่วยดูดซับรังสีอัลตราไวโอเลต เนื่องจากรังสีอัลตราไวโอเลตมีความยาวคลื่นสั้น จึงมีพลังงานสูงเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต โดยไปขัดขวางการจำลองบนดีเอ็นเอ (DNA) เป็นสารพันธุกรรม มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน และทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ (สัมพันธ์ คัมภิรานนท์, 2546)

2.6.1.2.4 ต้านอนุมูลอิสระ โดยทำหน้าที่เป็นตัวต้านอนุมูลอิสระในกระบวนการเมทาบอลิซึมภายในสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะกระบวนการออกซิเดชัน เช่นการสังเคราะห์แสงจะมีการสร้างสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ขึ้น แอนโทไซยานินจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารนี้ทำให้พิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หมดไป ในแง่ของโภชนาการแอนโทไซยานินช่วยลดความเสี่ยงจากโรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน โดยยับยั้งการรวมตัวระหว่างออกซิเจนกับคอเลสเตอรอลชนิด LDL-cholesterol ซึ่งเป็นไขมันที่ไม่พึงประสงค์ ในขณะเดียวกันจะเพิ่มปริมาณคอเลสเตอรอลชนิด HDL-cholesterol ที่เป็นไขมันไม่ดี ดังนั้นการดื่มน้ำองุ่นแดงวันละ 2-3 แก้ว จะช่วยลดอัตราเสี่ยงการแข็งตัวของเลือดได้ (Zhao *et al*., 2009)

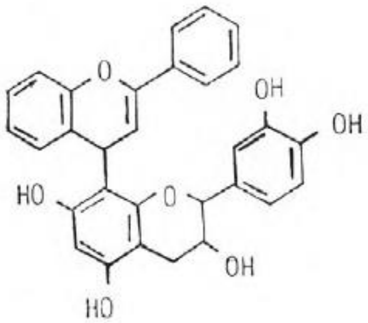
2.6.2 การเพิ่มเสถียรภาพของแอนโทไซยานินโดยการทำโคพิกเมนท์

เนื่องจากสารแอนโทไซยานินเป็นสารฟลาโวนอยด์ประเภทที่ละลายได้ในน้ำ (water soluble) และมีความคงตัวต่ำ ดังนั้นจึงมีการศึกษาการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนในลักษณะเป็นโคพิกเมนท์ซึ่งปรากฏการณ์นั้นเพิ่มความสำคัญต่อความคงตัวของสีของแอนโทไซยานิน เมื่อเกิดปรากฏการณ์โคพิกเมนท์แล้วโมเลกุลของสารจะสามารถปกป้องไม่ให้อนุภาคบวกจากน้ำและอนุภาคอื่นๆ เช่น เปอร์ออกไซด์และซัลเฟอร์เปอร์ออกไซด์เข้ามาแทนที่ในโมเลกุลได้ทำให้คุณสมบัติในการละลายเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารที่ไม่ชอบน้ำ (Ovando *et al.,* 2012) มีการศึกษาการสร้างสารประกอบเชิงซ้อน Delphinidin จากอัญชันและ Cyanidin จากกุหลาบโดยมีโลหะเป็นตัวทำให้เกิดปฏิกิริยา จากงานวิจัยนี้จึงได้นำผลผลิตจากกระบวนการดังกล่าวมาใช้ในการทดสอบการติดสี ผม

ต่อไป ซึ่งคาดหวังว่าสารนี้จะมีคุณสมบัติในการติดสีผมได้ดีขึ้นและมีระยะเวลายาวนานขึ้นอีกทั้งเป็นสารสกัดที่ได้ จากธรรมชาติซึ่งน่าจะมีอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ผลิตภัณฑ์น้อยหรือไม่มีเลย

รงควัตถุร่วมเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานิน คือการเกิดโคพิกเมนท์กับสารประกอบต่างๆ เช่น ฟลาโวล, ฟลาโวนอล, อะรูโรน, ฟลาโวโนน, ฟลาโวน-3-ออลส์, อัลคาลอยด์ และกรดอะมิโน เป็นต้น ทั้งนี้อัตราการเกิดโคพิกเมนท์ขึ้นอยู่กับชนิดของโคพิกเมนท์ชนิดของแอนโทไซยานิน ความเข้มข้นของโคพิกเมนท์ และความเข้มข้นของแอนโทไซยานินด้วย

เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์ (2535) ศึกษาความคงตัวของแอนโทไซยานิน โดยทำการเติมวัตถุเจือปนในอาหารเพื่อช่วยในการรักษาเสถียรภาพของแอนโทไซยานิน คือ คาเทชิน รูนิน และกรดคาฟเฟอิก ความเข้มข้น 80 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 98 วัน พบว่า ความคงตัวของแอนโทไซยานินสูงในสภาวะที่มี รูนิน คาเทชิน และกรดคาฟเฟอิก ตามลำดับ สารประกอบแสดงความคงตัวสูงดังภาพ 2.15



ภาพ 2.15 สารประกอบระหว่างแอนโทไซยานินกับคาเทชิน
ที่มา: Markakis *et al*. (1982)