

การหาปริมาณโปรตีนในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี Determination of Protein Content in Soybean Seeds by Near Infrared Spectroscopy

วรินทร์ มณีวรรณ¹, ศุภศักดิ์ ลิมปิติ¹ และ ปาริชาติ เทียนจุมพล¹
Warintorn Maneewan¹, Supasark Limpiti¹ and Parichat Theanjumpol¹

Abstract

The spectrum of soybean seed samples cv. Chiangmai 60 which had been stored for 6 months were measured by NIRSystem6500 in wavelength region from 1100 nm to 2500 nm. Their protein content was determined by Kjeldahl method every month. Partial least square regression (PLSR) was used to develop the calibration equation. It was found that the range of protein content of the seeds was 35.46-44.77 %. The calibration equation obtained has the values of correlation coefficient (R), standard error of calibration (SEC), standard error of prediction (SEP) and ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP (RPD) equal to 0.94, 1.34 %, 1.36 % and 2.69, respectively. It can be concluded that near infrared spectroscopy technique could reliably determine the protein content in soybean seeds.

Key word: near infrared spectroscopy (NIRS), protein content, soybean seeds

บทคัดย่อ

เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน ถูกนำมาวัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง NIRSystem6500 ในช่วงความยาวคลื่น 1100 นาโนเมตร ถึง 2500 นาโนเมตร และตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Kjeldahl ทุก 1 เดือน สร้างสมการทำนายด้วยเทคนิค partial least square regression (PLSR) พบว่าปริมาณโปรตีนของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมีค่าระหว่าง 35.46-44.77 % สมการทำนายมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณโปรตีนในกลุ่ม calibration (SEC) ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณโปรตีนในกลุ่ม validation (SEP) และสัดส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณโปรตีนในกลุ่ม validation ต่อค่า SEP (RPD) เท่ากับ 0.94, 1.34 %, 1.36 % และ 2.69 ตามลำดับ จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี สามารถใช้ตรวจวัดปริมาณโปรตีนในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองได้

คำสำคัญ เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี, ปริมาณโปรตีน, เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

คำนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่ปลูกและใช้ประโยชน์ในประเทศไทยมานาน สามารถนำเมล็ดไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งทางด้านอุตสาหกรรม และอาหารต่างๆ มากมาย เมล็ดถั่วเหลืองถือว่าเป็นพืชที่มีคุณค่าทางอาหารสูง ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 17-34 % (สมชาย และ ศุภชัย, 2543) โปรตีนจากถั่วเหลืองมีคุณภาพดีในแง่ของกรดอะมิโน (amino acid) โดยเฉพาะมีกรดอะมิโนพวกไลซีน (lysine) และทริปโตเฟน (tryptophan) ซึ่งกรดอะมิโนทั้งสองตัวนี้ มีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการเจริญเติบโตของมนุษย์และสัตว์ (ทรงเชาว์, 2545) จะเห็นได้ว่าโปรตีนมีความสำคัญทางด้านโภชนาการอย่างยิ่ง หากสามารถตรวจวัดปริมาณโปรตีนได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำแล้ว จะมีประโยชน์อย่างมากต่อการนำมาประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมต่างๆ

วิธีการหาปริมาณโปรตีนมาตรฐานโดยวิธีของ Kjeldahl นั้น ประกอบด้วยหลายขั้นตอน ซึ่งใช้เวลานาน และใช้สารเคมีและปริมาณตัวอย่างมากในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง อีกทั้งยังเป็นการทดสอบที่ทำลายตัวอย่าง (จารูวรรณ, 2547) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้นำ เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (near infrared spectroscopy) มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณโปรตีนของถั่วเหลือง มีข้อดีคือ สามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็ว โดยไม่ทำลายตัวอย่าง และยังสามารถตรวจวัดองค์ประกอบหลายๆ อย่างพร้อมกัน

¹ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว / ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

¹ Postharvest Technology Research Institute / Postharvest Technology Innovation Center, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

อุปกรณ์และวิธีการ

งานวิจัยนี้ใช้เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่ผ่านการปรับปรุงสภาพแล้วมาเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง สุ่มตัวอย่างทุก 1 เดือน จำนวน 30 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 200 กรัม บรรจุในเซลล์บรรจุตัวอย่างสำหรับเมล็ดธัญพืช (coarse sample cell) จากนั้นนำไปวัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง NIRSystem6500 (Foss NIRSystems, Silver Spring, USA) ในช่วงความยาวคลื่น 1100-2500 นาโนเมตร โดยวัดการสะท้อนกลับของแสง (reflectance) และนำตัวอย่างมาตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Kjeldahl (AOAC, 1984) และสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นด้วยเทคนิค partial least square regression (PLSR) โดยใช้โปรแกรม the Unscrambler © version 7.6 (CAMO, Oslo, Norway) ข้อมูลถูกแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือ calibration set เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นระหว่างข้อมูลปริมาณโปรตีนที่วัดโดยวิธีมาตรฐาน กับข้อมูลค่าการดูดกลืนแสง ของถั่วเหลืองในช่วงความยาวคลื่น 1100-2500 นาโนเมตร กลุ่มที่ 2 คือ validation set เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบสมการถดถอยเชิงเส้น ในการทำนายโปรตีนของตัวอย่าง

ผลการทดลองและวิจารณ์

สเปกตรัมของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พันธุ์เชียงใหม่ 60 พบพิก (peak) ชัดเจนที่สุดที่ความยาวคลื่น 1470 และ 1942 นาโนเมตร ซึ่งคือ พิกของน้ำ Williams and Norris (2001) พบว่า พิกน้ำชัดเจนที่ความยาวคลื่น 1450 และ 1940 (Figure 1) จากนั้นแปลงข้อมูลสเปกตรัมด้วย multiplicative scatter correction (MSC) เพื่อลดอิทธิพลการกระเจิงของแสง (scattering effect) (Martens et al., 1983) และอนุพันธ์อันดับที่สอง (second derivative) เพื่อลดอิทธิพลการซ้อนทับของพิก (overlapping) (Williams and Norris, 2001) พบพิกหัวกลับที่ความยาวคลื่น 1190, 1730, 1980 2180 และ 2274 นาโนเมตร (Figure 2) และพบว่า สมการทำนายที่สร้างด้วยข้อมูลสเปกตรัมซึ่งแปลงข้อมูลด้วยอนุพันธ์อันดับสอง (4 nm averaging for left and right side) และ MSC ร่วมกับ อนุพันธ์อันดับสอง มีความแม่นยำใกล้เคียงกัน แต่สมการที่ได้จากการแปลงข้อมูลด้วยทั้งสองเทคนิค มีความเสถียรกว่า ซึ่งสมการที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient : R) เท่ากับ 0.94 ที่ช่วงความยาวคลื่น 1108 – 2260 นาโนเมตร ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณโปรตีนในกลุ่ม calibration (SEC) เท่ากับ 1.34 % ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณโปรตีนในกลุ่ม validation (SEP) เท่ากับ 1.36 % และสัดส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณโปรตีนในกลุ่ม validation ต่อค่า SEP (RPD) เท่ากับ 2.69 (Table 1) แสดงว่า สมการทำนายนี้ สามารถใช้สำหรับคัดแยกปริมาณโปรตีนของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองได้ และเมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยใน regression coefficient plot (Figure 3) พบว่าที่ความยาวคลื่น 1180, 1734, 1980, 2178 นาโนเมตร มีอิทธิพลต่อสมการถดถอย คือ พิกของโปรตีนซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่รายงานว่า โปรตีนจะดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 1186, 1724, 1734, 1978 2180 และ 2274 นาโนเมตร (Hong et al., 1994; Osborne et al., 1993; Shenk et al., 2001 and William, 2007)

ผลการทำนายปริมาณโปรตีนในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ของตัวอย่างในกลุ่ม calibration และ validation แสดงใน

Figure 4

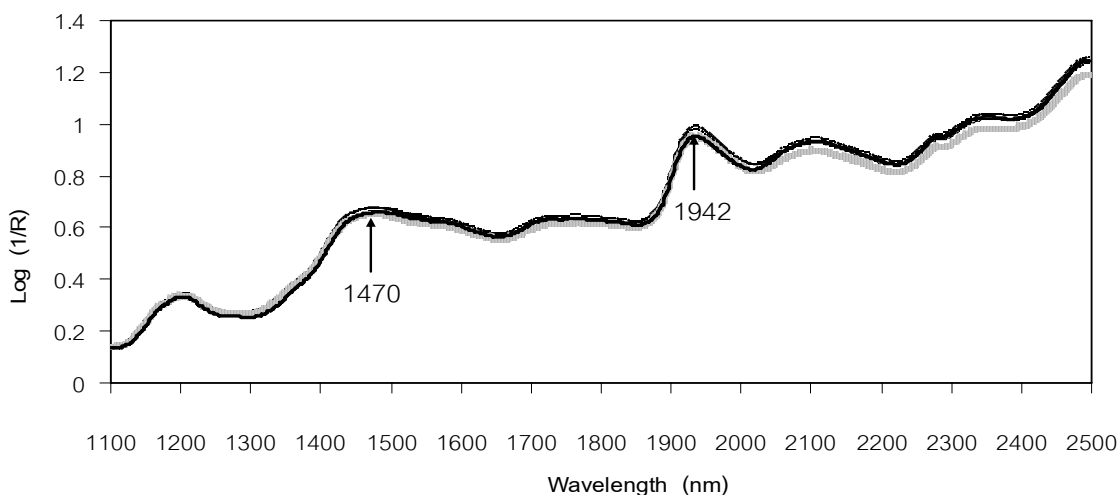


Figure 1 The original spectra of soybean seed (CM 60) storage for 6 month.

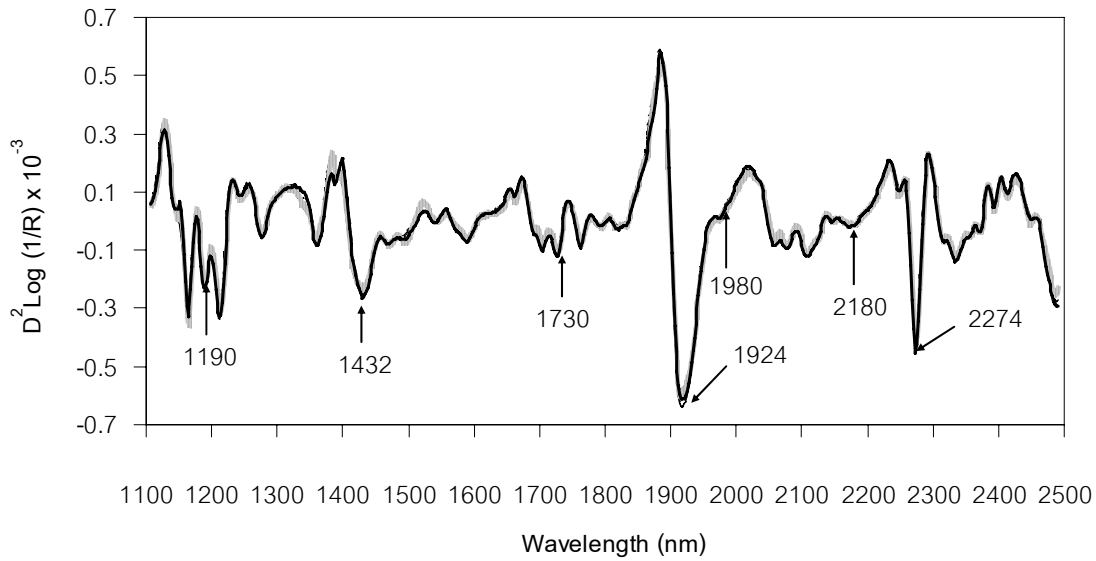


Figure 2 Soybean seed storage for 6 month spectra treated with multiplicative scatter correction and second derivative.

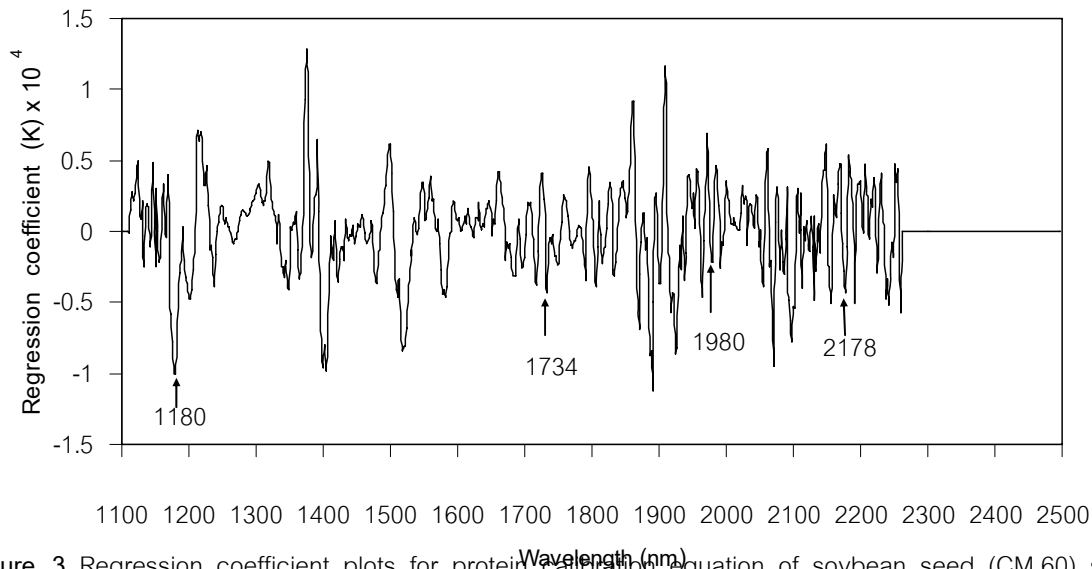


Figure 3 Regression coefficient plots for protein calibration equation of soybean seed (CM 60) storage for 6 month.

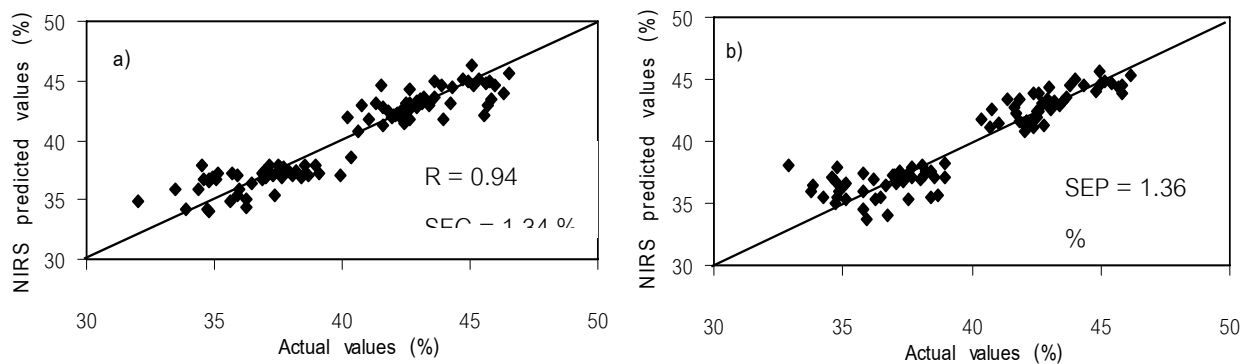


Figure 4 Scatter plots for predicting protein content in the calibration sample set (a) and the validation sample set (b) using protein calibration equation to develop.

Table 1 PLSR calibration results for protein content using spectra treated with multiplicative scatter correction (MSC) and second derivative.

Pre-treatment	Wavelength (nm)	F	R	SEC	SEP	Bias	RPD
MSC	1120-2480	9	0.93	1.36	1.32 ^{ns}	-0.01	1.76
Second derivative	1108-2260	5	0.94	1.34	1.36 ^{ns}	0.03	2.69
MSC-Second derivative	1108-2260	5	0.94	1.34	1.36 ^{ns}	0.03	2.69

F: number of factors used in the calibration equation.

R: multiple correlation coefficients

SEC: standard error of calibration.

SEP: standard error of prediction, tested by the method of Fearn (1996)

Bias: average of difference between actual value and NIR value.

^{ns}: means no significant difference at 95% confidence.

RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP.

สรุป

เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีนในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ซึ่งความถูกต้องและความแม่นยำของสมการขึ้นอยู่กับวิธีการลดความแปรปรวนของข้อมูลสเปกตรัม และการเลือก ช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม

คำขอขอบคุณ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนงบประมาณ, อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- จารุวรรณ บางแวง. 2547. วิธีการทำนายค่าอมิโลสโดยใช้เทคนิค Near Infrared Reflectance Spectroscopy. หน้า 99-111. ใน: งามชื่น คงเสรี, (ผู้รวบรวม), คุณภาพและการตรวจสอบข้าวหอมมะลิไทย. สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม, กระทรวงอุตสาหกรรม. บริษัทเจริญ เอ็กซ์เพรส จำกัด, กรุงเทพฯ.
- ทรงเชาว์ อินสมพันธ์. 2545. พืชไร่สำคัญของประเทศไทย. เอกสารประกอบการสอน. ภาควิชาพืชไร่, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 52 หน้า.
- สมชาย บุญประดับ และ ศุภชัย แก้วมีชัย. 2543. ถั่วเหลืองในเขตชลประทาน. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด เขตจตุจักร, กรุงเทพฯ. 177 หน้า.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1984. Official Methods of Analysis of AOAC. Washington D.C.
- Fearn, T. 1996. Comparing standard deviations. *NIR news*. 7: 5-6.
- Hong, T.L., S.J. Tsai, and S.C.S. Tsou. 1994. Development of a sample set for soya bean calibration of near infrared reflectance spectroscopy. *J. Near Infrared Spectrosc.* 2: 223-227.
- Martens, H., S.A. Jensen, and P. Geladi. 1983. Multivariate linearity transformation for near infrared reflectance spectra of meat. *Application Spectroscopy. Proceedings of the Nordic Symposium, Applied statistics*, pp. 235-267, Stockholm Forlag Publication, Stavanger, Norway.
- Osborne, B.G., T. Fearn, and P.H. Hindle. 1993. *Practical NIR spectroscopy : with Applications in Food and Beverage Analysis*. 2nd ed. Longman Group UK. Limited, UK. 227 pp.
- Shenk, J.S., J.J. Workman, and M.O. Westerhaus. 2001. Application of NIR spectroscopy to agricultural products. pp. 419-474. In : D.A. Burns, and E.W. Ciurczak, (eds.), *Handbook of Near-Infrared Spectroscopy*. 2nd ed. Marcel Dekker Inc., New York.
- Williams, P.C. and K. Norris. 2001. *Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. 2nd ed. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota. 296 pp.
- Williams, P.C. 2007. Application of Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) in the Agricultural and Food Industries. July 4th, 2007. Kasetsart University, Bangkok, Thailand. 25 pp.