โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำข้าวสังข์หยดและฤทธิ์การต่อต้านอนุมูลอิสระ

Extraction of Rice Bran Protein Hydrolysates from Sangyod rice bran and its antioxidant activities

ชื่อนิสิต นางสาววรพิชชา ชมภูพื้น

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2559

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำข้าวสังข์หยด และฤทธิ์การต่อต้านอนุมูลอิสระ

Extraction of Rice Bran Protein Hydrolysates from Sangyod rice bran and its antioxidant activities

โดย

นางสาววรพิชชา ชมภูพื้น

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559

โครงการ การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำข้าวสังข์หยดและฤทธิ์การต่อต้านอนุมูลอิสระ

โดย นางสาววรพิชชา ชมภูพื้น

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ
(ศาตราจารย์ ดร. ธวัชชัย ตันทุลานิ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เหมืองสิน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ ประไพรักษ์สิทธิ์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นวลพรรณ จันทรศิริ)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

..... หัวหน้าภาควิชาเคมี
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

วันที่ ..... เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2560

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ☑ ดีมาก ☐ ดี ☐ พอใช้

ชื่อโครงการ การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำข้าวสังข์หยดและฤทธิ์การต่อต้านอนุมูลอิสระ
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาววรพิชชา ชมภูพื้น เลขประจำตัว 5633138423
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เหมืองสิน
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ ประไพรักษ์สิทธิ์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำข้าวสังข์หยดซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสารอาหารและฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ โดยมีขั้นตอนการเตรียมด้วยวิธีการสกัดด้วยเบสและตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก แล้วทำไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ปาเปน ปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ เวลาในการสกัดโปรตีน เวลาในการทำไฮโดรไลซิส อุณหภูมิของการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีนด้วยเทคนิค UV-vis spectroscopy การทดสอบความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging activity) พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ เวลาในการสกัดโปรตีน 2 ชั่วโมง เวลาในการทำไฮโดรไลซิส 1 ชั่วโมง และอุณหภูมิของการทำให้แห้งแบบพ่นฝอยที่ 150 องศาเซลเซียส (HD150/1h) โดยมีปริมาณโปรตีนสูง ฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระสูง และอายุการเก็บรักษาได้มากที่สุด เมื่อเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเซตจากสภาวะอื่น โดยมีปริมาณโปรตีน 0.39 กรัมต่อกรัมสารตัวอย่าง ปริมาณสารประกอบฟีนอล 39.39 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารตัวอย่าง ความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระมีค่า IC_{50} 282.1 μg/mL และจากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของกล้ามเนื้อหนู (L929) โดยเวลาในการทำไฮโดรไลซิสไม่มีผลต่อฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระมากนัก เมื่อเทียบกับอุณหภูมิของการทำแห้งแบบพ่นฝอย และโปรตีนไฮโดรไลเซตมีประสิทธิภาพเหนือกว่าโปรตีนสกัดที่ยังไม่ผ่านการทำไฮโดรไลซิส นอกจากนั้นโปรตีนที่สกัดได้ยังมีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระมากกว่าโปรตีนจากท้องตลาดที่นำมาทดสอบทั้ง 5 ชนิดอีกด้วย

คำสำคัญ : รำข้าวสังข์หยด, โปรตีนไฮโดรไลเซต, ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

Project Title Extraction of Rice Bran Protein Hydrolysates from Sangyod rice bran and its antioxidant activities
Student Name Miss Vorapichcha Chompupuen Student ID 5633138423
Advisor Associate Professor Dr. Nongnuj Muangsin
Co-advisor Associate Professor Dr. Narong Praphairaksit
Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2016

Abstract

Nutritious rice bran protein hydrolysates from Sangyod rice bran were obtained and their antioxidant activities were studied in this work. The hydrolysates were prepared by alkaline extraction and precipitation of proteins at isoelectric point, followed by hydrolysis with enzyme papain. Various parameters have been investigated including the extraction and hydrolysis times as well as the inlet air temperature of the spray dryer. The proteins were characterized by UV-vis spectroscopy and its antioxidant activity was investigated using DPPH radical scavenging assay. The optimal conditions are: extraction time at 2 hours, hydrolysis time at 1 hour and inlet air temperature of spray dryer at 150°C (HD150/1h). The resulting hydrolysates obtained under this condition possessed high protein content, high antioxidant activity and has long shelf-life. The HD150/1h has protein content of 0.39 g/g sample, total phenolic content of 39.39 mg Gallic acid Equivalents (GAE)/g sample, the antioxidant activity with IC_{50} 282.1 μg/mL. The cytotoxicity test indicated that these protein hydrolysates are not toxic to normal cells (L929). Moreover, its antioxidant activity was higher than 5 proteins commercially available in the market.

Keywords : Sangyod rice bran, protein hydrolysates, antioxidant activity

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เหมืองสิน และรองศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ ประไพรักษ์สิทธิ์ ในการให้คำปรึกษา แนะนำการทดลอง และช่วยชี้แนะแนวทางในการแก้ไขปัญหา รวมถึงการตรวจงานเอกสารต่างๆ

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. ธวัชชัย ตันฑุลานิ และ รองศาสตราจารย์ ดร. นวลพรรณ จันทรศิริ ในการให้ความอนุเคราะห์เป็นกรรมการประเมินโครงงานวิจัยในครั้งนี้

ขอบขอบคุณนายฐปนรรค์ จตุยศพร นิสิตปริญญาเอก ภาควิชาชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล ในการให้คำปรึกษาด้านความรู้ชีวเคมี และสละเวลาในการช่วยทำการทดลอง

ขอขอบคุณคุณสุรวิทย์ คงมีผล บริษัท ดั๊กเคน (ประเทศไทย) จำกัด ในการเอื้อเฟื้อเอนไซม์ปาเปนเพื่อใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณคุณสถาป เสวกวรรณ บริษัท ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ จำกัด ในการเอื้อเฟื้อรำข้าวสังข์หยดเพื่อใช้ในการทดอง

ขอขอบคุณพี่ๆปริญญาเอกและปริญญาโทในกลุ่มวิจัย ที่ให้คำปรึกษาและชี้แนะแนวทางการทำการทดลอง การแก้ปัญหา และความรู้ต่างๆที่ได้รับตลอดระยะเวลาการทำงาน

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตารางประกอบ ..... ฌ

สารบัญรูปประกอบ ..... ญ

สารบัญตัวย่อ ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย 2

1.2.1 วัตถุประสงค์ 2

1.2.2 ขอบเขตงานวิจัย 2

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

1.4 ทฤษฎีและความรู้ที่เกี่ยวข้อง 5

1.4.1 อมูลอิสระ (Free radicals) และสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) 5

1.4.2 เอนไซม์ปาเปน 6

1.4.3 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล (Total Phenolic Content) 6

1.4.4 การหาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging activity) 7

บทที่ 2 ขั้นตอนการทดลอง 9

2.1 สารเคมี 9

2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ 10

2.3 วิธีการทดลอง 11

หน้า

2.3.1 การเตรียมสารตัวอย่าง 11
2.3.2 การสกัดโปรตีนจากรำข้าวด้วยการสกัดเบสแล้วตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก 11
2.3.3 การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ปาเปน 11
2.4 การตรวจสอบคุณสมบัติโปรตีนที่สกัดได้ 12
2.4.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร 12
2.4.2 การหาขนาดโมเลกุลของโปรตีน 12
2.4.3 การหาปริมาณโปรตีน 13
2.4.4 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล 13
2.4.5 การทดสอบวิธีเบเนดิกต์ (Benedict's test) 14
2.5 การทดสอบความสามารถในการต่อต้านสารอนุมูลอิสระ โดยเทคนิคการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging activity) 15
2.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ 17
บทที่ 3 ผลการทดลองและการอภิปรายผลการทดลอง 19
3.1 การสกัดโปรตีนจากรำข้าวด้วยวิธีการสกัดด้วยเบสและตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก 19
3.2 การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ปาเปน 21
3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีนที่สกัดได้ 22
3.3.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร 22
3.3.2 การหาขนาดโมเลกุลของโปรตีน 23
3.3.3 การหาปริมาณโปรตีน 24
3.3.4 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล 26
3.3.5 วิธีเบเนดิกต์ (Benedict's test) 28
3.4 การทดสอบความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging activity) 29

หน้า

3.4.1 การทดสอบความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนตัวอย่างที่สกัดได้ 30

3.4.2 การทดสอบความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนตัวอย่างตามท้องตลาด 32

3.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ 33

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง 34

เอกสารอ้างอิง 36

ภาคผนวก 39

ภาคผนวก ก กราฟแสดงค่า IC_{50} ของโปรตีนที่สกัดได้ 40

ภาคผนวก ข กราฟแสดงค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดแอสคอบิกและโปรตีนจากท้องตลาด 44

ประวัติผู้วิจัย 47

สารบัญตารางประกอบ

ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารละลายที่ใช้เพื่อการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด..... 14
ตารางที่ 2.2 ปริมาณสารละลายที่ใช้ในการทดสอบหาน้ำตาลรีดิวซ์ 15
ตารางที่ 2.3 ปริมาณสารละลายที่ใช้ตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช.....17
ตารางที่ 3.1 น้ำหนักของโปรตีนไฮโดรไลเซตทั้ง 6 ชนิดหลังทำให้แห้งแบบพ่นฝอย 21
ตารางที่ 3.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง เพื่อหาปริมาณโปรตีน..... 25
ตารางที่ 3.3 แสดงปริมาณโปรตีนเทียบกับน้ำหนักสารตัวอย่าง 26
ตารางที่ 3.4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง เพื่อหาปริมาณฟีนอล..... 27
ตารางที่ 3.5 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเปรียบเทียบกับปริมาณสารกรดแกลลิก 28
ตารางที่ 3.6 แสดงค่าความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยการกำจัดอุมูลอิสระดีพีพีเอช ของโปรตีนที่สกัดได้ทั้ง 8 ชนิด.....31
ตารางที่ 3.7 แสดงค่าความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยการกำจัดอุมูลอิสระดีพีพีเอชของโปรตีนในท้องตลาดทั้ง 5 ชนิด.....32

สารบัญรูปประกอบ

รูปภาพที่ 1.1 ลักษณะของอนุมูลอิสระและการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ 6
รูปภาพที่ 1.2 โครงสร้างสารประกอบฟีนอล 7
รูปภาพที่ 1.3 แสดงการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนรอบวงอะโรมาติก 7
รูปภาพที่ 1.4 การเกิดปฏิกิริยาของ DPPH Assay 8
รูปภาพที่ 3.1 ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีจากรำข้าวที่เวลาต่างๆ 19
รูปภาพที่ 3.2 แสดงแผนภาพการเปลี่ยนแปลงประจุของกรดอะมิโนที่ pH ต่างๆ 20
รูปภาพที่ 3.3 โครงสร้างกรดอะมิโน a. tyrosine b. tryptophan 22
รูปภาพที่ 3.4 แสดงกราฟการดูดกลืนแสง a) CP100 และ b) HD100/1h 23
รูปภาพที่ 3.5 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของรำข้าวสังข์หยดที่สภาวะต่างๆ ด้วย SDS-PAGE โดย เลนที่ (1)HD100/1h (2)HD100/1h (3)HD100/1h (4)CP100 (5)HD100/1h (6)HD100/1h (7)HD100/1h และ (8)CP150 24
รูปภาพที่ 3.6 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร 25
รูปภาพที่ 3.7 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร 27
รูปภาพที่ 3.8 แสดงสีของสารละลายตัวอย่างต่างๆ เมื่อทดสอบด้วยวิธีเบเนดิกต์ 29
รูปภาพที่ 3.9 กราฟแสดงตัวอย่างการหาค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้นต่างๆและ %Inhibition 30
รูปภาพที่ 3.10 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน HD150/1h และ CP100 ที่ความเข้มข้นต่างๆกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดชีวิตของเซลล์ปกติ L929 33
รูปภาพที่ ก-1 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ CP100 41
รูปภาพที่ ก-2 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ CP150 41
รูปภาพที่ ก-3 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ HD100/1h 42
รูปภาพที่ ก-4 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ HD100/6h 42
รูปภาพที่ ก-5 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ HD100/24h 42
รูปภาพที่ ก-6 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ HD150/1h 43
รูปภาพที่ ก-7 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ HD150/6h 43

รูปภาพที่ ก-8 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ HD150/24h 43
รูปภาพที่ ข-1 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของกรดแอสคอบิก (Ascorbic acid) 45
รูปภาพที่ ข-2 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ whey protein 45
รูปภาพที่ ข-3 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ Hydrolyzed Rice Protein 45
รูปภาพที่ ข-4 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ Hydrolyzed Protein
(Soy, Oat, Wheat, Maize Protein) 46
รูปภาพที่ ข-5 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ Hydrolyzed Silk Protein (Sericin) 46
รูปภาพที่ ข-6 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ Hydrolyzed Milk (Casein) Protein 46

สารบัญตัวย่อ

mL	=	มิลลิลิตร
µL	=	ไมโครลิตร
N	=	นอร์มาลิตี
M	=	โมลาริตี หรือ โมลต่อลิตร
mM	=	มิลลิโมลาริตี หรือ มิลลิโมลต่อลิตร
mg/mL	=	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
µg/mL	=	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
% v/v	=	ร้อยละโดยปริมาตร
% w/v	=	ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร
Da	=	ดาลตัน
kDa	=	กิโลดาลตัน

mg gallic acid equivalent (GAE)/g sample = มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารตัวอย่าง

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าว หรือชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Oryza sativa* L. นับเป็นอาหารหลักของคนไทย รวมถึงเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศ โดยในปี 2553-2558 ประเทศไทยมีการผลิตข้าวสูงถึงประมาณ 30 ล้านตันต่อปี[1] เมื่อมีปริมาณข้าวสูงสิ่งที่ตามมาจึงเป็นปริมาณรำข้าวที่มากถึง 2.7 ล้านตันต่อปี เนื่องจากรำข้าวเป็นผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการขัดสีเมล็ดข้าวเพื่อให้ได้ข้าวที่พร้อมส่งออกและรับประทาน นอกจากจะเป็นผลพลอยได้ที่มักถูกนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์และเป็นของเสียแล้ว รำข้าวยังนับเป็นแหล่งของโปรตีนและไขมันอีกด้วย เพราะในรำข้าวประกอบด้วยไขมันประมาณ 12-22% โปรตีนประมาณ 11-17% และสารอื่นๆ ที่มีคุณประโยชน์อีกมากมาย[2]

โปรตีนเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกาย มีส่วนช่วยเสริมสร้างกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อที่สึกหรอ แหล่งที่สำคัญของโปรตีน เช่น เนื้อสัตว์ นม ไข่ เป็นต้น แต่พบว่าในทารกและเด็กที่อายุน้อยมีการแพ้นมวัวมากที่สุด รองลงมาคือการแพ้ไข่[3] ซึ่งอาหารทั้ง 2 ชนิดเป็นแหล่งที่สำคัญของโปรตีน ปัจจุบันจึงได้มีความพยายามในการสกัดโปรตีนทางเลือก เพื่อทดแทนการแพ้อาหารที่มีโปรตีนบางชนิด และเพื่อทดแทนโปรตีนจากสัตว์ที่มีราคาแพง ทำให้การหาโปรตีนจากพืชเพื่อทดแทนโปรตีนจากสัตว์เริ่มมีบทบาทสำคัญมากขึ้น โดยเมื่อเปรียบเทียบโปรตีนจากรำข้าวกับโปรตีนจากสัตว์และจากพืชอื่นๆ เช่น โปรตีนถั่วเหลือง พบว่าโปรตีนและกรดอะมิโนที่ได้จากโปรตีนรำข้าวมีสารอาหารคุณภาพเทียบเท่าโปรตีนถั่วเหลือง โปรตีนข้าว โปรตีนจากนมวัว และเคซีน[4]

นอกจากโปรตีนในรูปดั้งเดิมแล้ว ยังมักมีการนำโปรตีนมาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส เพื่อให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซต ซึ่งก็คือ โปรตีนที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด เบส หรือเอนไซม์ โปรตีนที่ได้จะมีขนาดเล็กลง หรือสายเปปไทด์ที่สั้นลงโดยมีความยาวที่ไม่เท่ากันหลายสาย อาจจะเล็กลงไปจนถึงกลายเป็นกรดอะมิโนอิสระก็ได้ ความสำคัญของการไฮโดรไลซิสโปรตีนก็เพื่อทำให้ย่อยง่าย ช่วยในเรื่องของการดูดซึมซึ่งจะทำให้ร่างกายดูดซึมได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยหลายงาน ที่รายงานว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตและเปปไทด์ทั้งจากพืชและจากสัตว์มีความสามารถในการ ต่อต้านอนุมูลอิสระ เช่น เปลือกถั่ววอลนัท[5]

มะเขือเทศ[6] ผักกาดขาว[7] เป็นต้น เนื่องจากเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนบางชนิดมีบทบาทสำคัญในการต่อต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) ถูกตระหนักถึงอย่างแพร่หลาย เพราะมีงานวิจัยต่างๆ ยืนยันว่าการมีปริมาณอนุมูลอิสระในร่างกายมากเกินไป ก่อให้เกิดโรคได้ เช่น มะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด แก่ก่อนวัย โรคเรื้อรังชนิดต่างๆ เป็นต้น [8] ซึ่งสารที่จะมาช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระได้นั้น เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เนื่องจากบางครั้งร่างกายไม่สามารถผลิตสารต้านอนุมูลอิสระได้อย่างเพียงพอ จึงมีความจำเป็นที่ต้องรับประทานอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มเข้าไป หรือการได้รับสารจากทางอื่น

ข้าวสังข์หยดเริ่มถูกให้ความสนใจมากในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นข้าวกล้องสีแดง-ม่วงที่มีคุณค่าทางอาหารสูง เพราะประกอบไปด้วยแอนโทไซยานิน (anthocyanin) แกมมาโอไรซานอล (γ-oryzanol) วิตามิน B1 B2 B3 (niacin) B6 และแร่ธาตุสำคัญ เช่น เหล็ก แคลเซียม ฟอสฟอรัส เป็นต้น ข้าวสังข์หยดมีรงควัตถุที่เป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารประกอบฟีนอล ประเภท ฟลาโวนอยด์ชนิดแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการรักษาอาการอักเสบได้[9] มีผู้สนใจนำข้าวสังข์หยดมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์หลากหลายชนิด เช่น การนำแป้งข้าวสังข์หยดมาทำผลิตภัณฑ์คุกกี้ข้าวสังข์หยดทดแทนการใช้แป้งสาลี[10] การนำรำข้าวสังข์หยดใส่เป็นสารเติมแต่งสำหรับผลิตภัณฑ์มาการองเพื่อเพิ่มใยอาหาร[11] การนำรำข้าวสังข์หยดมาสกัดน้ำมันรำข้าวเพื่อใช้ในครีม-เจล[12] เป็นต้น แต่ยังไม่มีงานวิจัยที่นำรำข้าวสังข์หยดมาทำโปรตีนไฮโดรไลเซตทางเลือกและศึกษาฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ งานวิจัยชิ้นนี้จึงสนใจศึกษาการสกัดโปรตีนจากรำข้าวสังข์หยดและไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ปาเปนเพื่อให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซต ที่มีปริมาณโปรตีนและมีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระสูง

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย

1.2.1 วัตถุประสงค์

เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มี ปริมาณโปรตีนและฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระสูง

1.2.2 ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยชิ้นนี้จะทำการสกัดโปรตีนจากรำข้าวพันธุ์สังข์หยดที่ทำการกำจัดไขมันแล้ว ด้วยเทคนิคการสกัดด้วยเบสแล้วตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก แล้วทำการไฮโดรไลซ์โปรตีนที่ได้ (crude protein) ด้วยเอนไซม์ปาเปนเพื่อให้ได้เป็นโปรตีนไฮโดรไลเซต (hydrolysate

protein) ซึ่งทำให้แห้งด้วยเทคนิคการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย โดยศึกษาปัจจัยของเวลาในการสกัดโปรตีน (extraction time) เวลาในการไฮโดรไลซ์ (hydrolysis time) และอุณหภูมิของการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย (Inlet air temperature) เพื่อให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีปริมาณโปรตีนและมีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระสูง แล้วพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีนที่สกัดได้ (crude protein) และโปรตีนไฮโดรไลเซต (hydrolysate protein) โดย หาขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE หาปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค UV-vis spectrophotometry หาปริมาณสารประกอบฟีนอลด้วยเทคนิค UV-vis spectrophotometry ทดสอบความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging activity) และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 2006 Theerakulkait และคณะ[13] ได้ทำการทดลองสกัดโปรตีนจากรำข้าว โดยศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนที่สกัด ได้แก่ การสกัดไขมันก่อนนำรำข้าวมาใช้งาน เวลาในการสกัดด้วยเบส และ ความเร็วเครื่องกวนสาร พบว่า การใช้รำข้าวที่ผ่านการสกัดไขมันออก จะให้ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้สูงกว่ารำข้าวที่มีไขมัน (full fat) ได้แก่ 17.5 และ 14.1 กรัม ตามลำดับ โดยปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงเวลาการสกัด 10-45 นาที จากนั้นมีการเพิ่มปริมาณโปรตีนที่ไม่สูงมากนัก และความเร็วในการใช้เครื่องกวนสารให้ปริมาณที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ในปี ค.ศ. 2008 Ghosh และคณะ[14] ได้ทำการทดลองนำรำข้าวจากประเทศอินเดียมาทำการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซต โดยทำการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ปาเปนซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ได้จากมะละกอ โดยเริ่มจากการนำรำข้าวที่ผ่านและไม่ผ่านการกรองด้วยตะแกรงขนาด 80 mesh มาสกัดโปรตีน เพื่อศึกษาว่าการกรองมีผลต่อการสกัดหรือไม่ แล้วทำการสกัดโปรตีนด้วยเทคนิคการสกัดด้วยเบสที่ pH 10.0 จากนั้นตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริกที่ pH 4.0 แล้วศึกษาเวลาในการทำไฮโดรไลซิสที่ 0, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที พบว่ารำข้าวที่ผ่านการกรองให้ปริมาณโปรตีน 24.1±1% ในขณะที่รำข้าวที่อยู่ด้านบนของตะแกรงให้ปริมาณโปรตีน 13.1±0.8 % แสดงว่ารำข้าวที่ผ่านการกรองแล้วสามารถสกัดได้ปริมาณโปรตีนสูงกว่า

ในปี ค.ศ. 2013 Zhou และคณะ[15] ทำการทดลองเพื่อศึกษาผลของเวลาในการไฮโดรไลซ์ (Hydrolysis time) โปรตีนสกัดจากเมล็ด Neocarya macrophylla โดยใช้เอนไซม์เปปซินย่อยก่อนแล้วตามด้วยเอนไซม์ทริปซิน เวลาที่ใช้ในการศึกษา คือ 5 ถึง 180 นาที โดยผู้วิจัยศึกษาทั้งคุณสมบัติทาง

กายภาพและคุณค่าทางอาหารของโปรตีนไฮโดรไลเซต ผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้เวลาในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น โปรตีนมีคุณสมบัติทางกายภาพลดลง แต่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น โดยมีค่า IC_{50} ของการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลเรดิคัล ความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะ การตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช และความสามารถในการรีดิวซ์ ดังนี้ 4.31, 0.39, 2.10 และ 15.39 mg/mL ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ามีพันธะเปปไทด์ขนาดเล็ก (500-3000 Da) เพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลาในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้นอีกด้วย

ในปี ค.ศ. 2015 เนื่องโปรตีนจากรำข้าวถูกให้ความสนใจเป็นอย่างมากในช่วงหลายสิบปีที่ผ่านมา เพราะมีความต้องการใช้โปรตีนทางเลือกจากพืชมาทดแทนโปรตีนจากสัตว์ เพื่อคนที่แพ้โปรตีนจากสัตว์ หรือเพื่อคนที่บริโภคเนื้อสัตว์ไม่ได้ เพราะ จะทำให้ขาดโปรตีนซึ่งเป็นสารอาหารสำคัญที่ร่างกายต้องการ รวมถึงโปรตีนจากสัตว์มีราคาที่ค่อนข้างแพง Cho และคณะ[4] จึงได้ทำการทดลองเปรียบเทียบปริมาณสารอาหารระหว่างโปรตีนที่ได้จากพืชและจากสัตว์ โดยโปรตีนจากสัตว์ ได้แก่ เวย์โปรตีน และ เคซีน โปรตีนจากพืช ได้แก่ ถั่วเหลือง ข้าว (ในส่วนที่เป็นเอนโดสเปิร์ม) และ รำข้าว พบว่าปริมาณสารอาหารของโปรตีนในรำข้าวมีความเทียบเท่ากับสารอาหารจากโปรตีนสัตว์และจากโปรตีนของพืชชนิดอื่น

มีผู้สนใจนำข้าวสังข์หยดมาแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆมากขึ้น เนื่องจากข้าวสังข์หยดเป็นข้าวกล้องสีแดง-ม่วงที่มีคุณค่าทางอาหารสูง เพราะประกอบไปด้วยแอนโทไซยานิน (anthocyanin) แกมมาโอไรซานอล (γ-oryzanol) วิตามิน B1 B2 B3 (niacin) B6 และแร่ธาตุสำคัญ เช่น เหล็ก แคลเซียม ฟอสฟอรัส เป็นต้น ข้าวสังข์หยดมีรงควัตถุที่เป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ มีการนำรำข้าวสังข์หยดมาใช้แปลงเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่รำข้าว เช่น

ในปี ค.ศ. 2013 Bunyasawat และ Bhoosem[11] ได้นำรำข้าวสังข์หยดมาเป็นสารเติมแต่งในผลิตภัณฑ์มาการอง ในอัตราส่วน ร้อยละ 5, 10 และ 15 จากนั้นทดสอบคุณค่าทางโภชนาการ พบว่า ในด้านของรสชาติผู้ชิมให้ความยอมรับทั้ง 3 สูตร และเมื่อเพิ่มปริมาณรำข้าวมากขึ้นพบว่ามีคุณค่าทางโภชนาการเพิ่มขึ้น ทั้งปริมาณพลังงาน โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรตและใยอาหาร

ในปี ค.ศ. 2016 Itharat และ คณะ[9] ได้ทำการสกัดสารจากรำข้าวสังข์หยด เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้านการอักเสบ รวมถึงหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในรำข้าวสังข์หยดด้วย โดยผลการทดลองพบว่าการสกัดรำข้าวสังข์หยดด้วยเอทานอล 95% สามารถยับยั้งผลของ NO production ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบได้สูงที่สุด จึงทำให้เหมาะแก่การรักษาโรคที่เกี่ยวกับการอักเสบ โดยสารสกัดนี้มีแกมมาโอไรซานอลและวิตามินอีในปริมาณสูง และ ในส่วนของรำข้าวนั้นมีปริมาณของแกมมาโอไรซานอลมากกว่าจากข้าวสังข์หยดทั้งเมล็ด นอกจากนี้คณะวิจัยยังพบว่าปริมาณวิตามินบี B1 และวิตามิน B2 มีปริมาณสูงในสารที่สกัดจากรำข้าวด้วยน้ำเดือดอีกด้วย

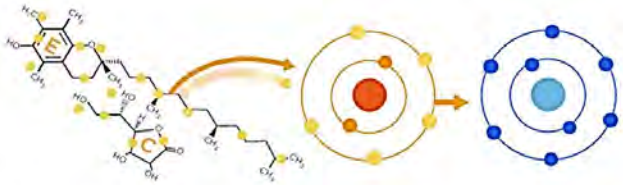
1.4 ทฤษฎีและความรู้ที่เกี่ยวข้อง

1.4.1 อนุมูลอิสระ (free radicals) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

อนุมูลอิสระ (free radicals) คือ โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนขาดหายไป 1 ตัว ทำให้ตัวมันเองไม่เสถียรและพร้อมจะเกิดปฏิกิริยากับสารหรือโมเลกุลที่อยู่บริเวณใกล้เคียงโดยสามารถเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ ดังนั้นเมื่อเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย โมเลกุลต่างๆ เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ ดีเอ็นเอ ไมโทคอนเดรีย เป็นต้น จะถูกทำลาย โดยอาจจะถูกแย่งอิเล็กตรอนหรือถูกให้อิเล็กตรอนเพิ่มมา ทำให้โมเลกุลในร่างกายเกิดความไม่เสถียรขึ้น[16] โดยจะทำให้เซลล์เกิดการทำงานที่ผิดปกติจนเกิดเป็นความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งเป็นภาวะที่ร่างกายไม่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระจำนวนมากที่เกิดขึ้นได้ เพราะโดยปกติแล้วร่างกายมีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระอยู่แล้ว แต่อาจมีปัจจัยอื่นๆที่ทำให้ร่างกายไม่สามารถกำจัดได้ประสิทธิภาพเท่าเดิม ทำให้มีอนุมูลอิสระสะสมในร่างกายมากเกินความพอดี ซึ่งสาเหตุนี้เอง สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น มะเร็ง โรคหัวใจ โรคเกี่ยวกับไขข้อ แก่ก่อนวัย โรคเรื้อรังชนิดต่างๆ เป็นต้น[17, 8]

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือ โมเลกุลที่มีความเสถียรเพียงพอที่สามารถให้อิเล็กตรอนไปยังอนุมูลอิสระ เพื่อลดความสามารถในการทำลายโมเลกุลอื่นๆของอนุมูลอิสระ ช่วยปกป้องเซลล์จากความเป็นพิษ และป้องกันการเกิดโรคต่างๆได้ สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม[8]

1) กลุ่มที่เป็นเอนไซม์ (enzymatic antioxidants) เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) และ glutathione reductase เป็นต้น
2) กลุ่มที่ไม่ใช่เอนไซม์ (nonenzymatic antioxidants) บางชนิดร่างกายสารมารถสร้างเองได้ แต่บางชนิดร่างกายสร้างเองไม่ได้รับจากอาหารหรือผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น glutathione, coenzyme Q10, metal-chelating proteins, วิตามินอี, วิตามินซี, แคโรทีนอยด์, ฟลาโวนอยด์ เป็นต้น



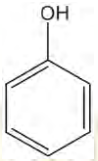
รูปภาพที่ 1.1 ลักษณะของอนุมูลอิสระและการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ[18]

1.4.2 เอนไซม์ปาเปน

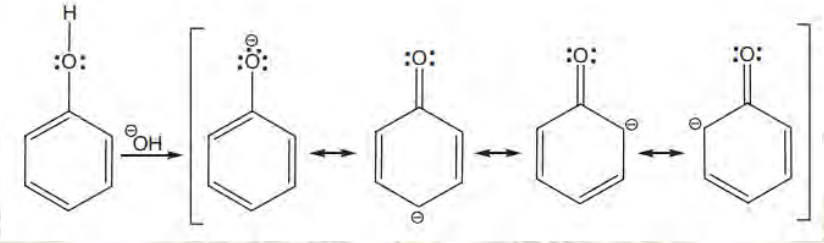
ปาเปน เป็น cysteine protease พบได้ในพวกยางมะละกอ (*Carica papaya*) จัดเป็นเอนไซม์จากธรรมชาติ ทำหน้าที่ตัดพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโนที่มีหมู่โซ่ข้างเป็นเบส ได้แก่ histidine lysine ซึ่งมีช่วงการทำงานได้หลากหลาย มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง pH 6.0–7.0 สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง แต่จะสูญเสียการทำงานเมื่ออุณหภูมิสูงเกิน 80 องศาเซลเซียส เนื่องจากโปรตีนเกิดการเสื่อมสภาพ มีมวลโมเลกุล 23,406 ดาลตัน

1.4.3 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล (Total Phenolic Content)

สารประกอบฟีนอล คือ สารประกอบที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่เป็นหมู่เกาะอยู่บนวงแอโรมาติก มีโครงสร้างตามรูปภาพที่ 1.2 ซึ่งทั้งหมู่เกาะและจำนวนวงแอโรมาติกมีความหลากหลายตั้งแต่ขนาดเล็กไปจนขนาดใหญ่มาก โดยสารประกอบฟีนอลมีสมบัติเป็นกรดอ่อน เนื่องจากการที่มีวงแอโรมาติกทำให้หมู่ไฮดรอกซิลนี้มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยสามารถให้โปรตอน (H^+) ได้ตามรูปภาพที่ 1.3 แล้วสารประกอบนี้สามารถเกิดการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนได้ทั่ววงแอโรมาติก ทำให้สารประกอบนี้มีความเสถียร โดยแอนไอออนที่เกิดขึ้น เรียกว่า ฟีโนเลตแอนไอออน เป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้[18] ด้วยความสามารถในการให้โปรตอนได้นั้น ทำให้สารประกอบฟีนอลมีความสามารถในการเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)



รูปภาพที่ 1.2 โครงสร้างสารประกอบฟีนอล



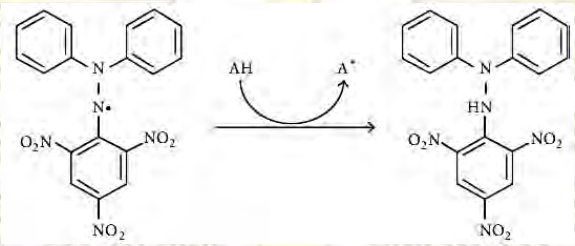
รูปภาพที่ 1.3 แสดงการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนรอบวงแอโรมาติก

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล สามารถทำได้โดยวิธีการ Folin–Ciocalteu assay[19] ซึ่งใช้รีเอเจนต์ Folin-Ciocalteau phenol โดยรีเอเจนต์นี้เป็นสารผสมที่ประกอบด้วย heteropoly acids, phosphomolybdic และ phosphotungstic acids ซึ่งจัดเป็นสารที่มีความเสถียร ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างเอเจนต์ Folin-Ciocalteau phenol กับสารประกอบ polyphenol ในผลิตภัณฑ์ จัดเป็นปฏิกิริยารีดอกซ์ โดย molybdenum และ tungsten มีออกซิเดชันสเตทเป็น +6 ทั้งคู่ สารละลายนี้จะมีสีเหลือง ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้ molybdenum และ tungsten จะมีออกซิเดชันสเตทอยู่ระหว่าง +5 และ +6 โดยสารนี้จะมีสีน้ำเงิน เมื่อนำสารละลายที่เกิดขึ้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร แล้วเทียบกับสารละลายมาตรฐาน จะสามารถคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลได้ โดยสารมาตรฐานที่นิยมใช้ คือ กรดแกลลิก และในการทำปฏิกิริยานั้นจะทำที่สภาวะเบส โดยการเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเพื่อให้สารประกอบโพลีฟีนอลเกิดการเสียโปรตอนเป็นฟีโนเลตแอนไอออน โดยแอนไอออนตัวนี้จะทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์[20]

1.4.4 การหาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging activity)

DPPH หรือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็นอนุมูลอิสระที่มีความเสถียรสูง และในสารละลายจะให้สีม่วงเข้มที่สังเกตง่าย (λ_{max} = 515-517 นาโนเมตร) เป็นวิธีการที่นิยมใช้มาก เนื่องจากใช้งานง่ายเพียงละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสมก็สามารถใช้งานได้เลย ใช้เวลาในการ

วิเคราะห์ต่ำ และใช้อุปกรณ์น้อย หลักการของการทดสอบด้วย DPPH คือ เป็นการศึกษาความสามารถในกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ที่มีอยู่ในสารละลาย โดย DPPH ที่ลดลง สามารถวัดได้จากเทคนิคการตรวจวิเคราะห์โดยทำให้เกิดสี ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เพราะเมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ได้รับโปรตอนหรืออิเล็กตรอนจากสารใดๆ (เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ หรือ สารอนุมูลอิสระอื่นๆ) สารละลายจะเปลี่ยนไปเป็นสีเหลือง ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง [21, 22]



รูปภาพที่ 1.4 การเกิดปฏิกิริยาของ DPPH Assay[21,22]

บทที่ 2
ขั้นตอนการทดลอง

2.1 สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
2. ไฮโดรคลอกริก (HCl)
3. เฮกเซน (C_6H_{14})
4. เอทานอล (C_2H_6O)
5. เอนไซม์ปาเปน (papain enzyme)
6. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)
7. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ($C_4H_4KNaO_6$)
8. โซเดียมซิเตรต ($C_6H_5Na_3O_7$)
9. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4{\cdot}5H_2O$)
10. กรดแอสคอบิก (Ascobic acid)
11. โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
12. ไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)
13. bovine serum albumin (BSA)
14. Folin & Ciocalteu's phenol
15. กรดแกลลิก ($C_7H_6O_5$)
16. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
17. ตัวอย่างโปรตีนจากท้องตลาด 5 ชนิด
    - Whey Protein
    - Hydrolyzed Rice Protein
    - Hydro Protein (Soy, Oat, Wheat, Maize Protein)
    - Hydrolyzed Milk (Casein) Protein
    - Hydrolyzed Silk Protein (Sericin)

2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. บีกเกอร์ ขนาด 10 25 50 100 500 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร
2. ขวดกำหนดปริมาตร ขนาด 10 25 50 100 และ 250 มิลลิลิตร
3. หลอดทดลอง
4. พาสเจอร์ปิเปต
5. ปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร
6. ไมโครปิเปต
7. ไมโครเวล ขนาด 96 หลุม
8. เอพเพนดอร์ฟ
9. คิวเวทท์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
10. เทอร์โมมิเตอร์
11. ถาดอะลูมิเนียม
12. ตะแกรงกรอง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.5 มิลลิเมตร
13. ผ้าไนลอน
14. พีเอชมิเตอร์
15. Vortex
16. Mini Spray Dryer B-290 บริษัท BUCHI
17. Microplate readers บริษัท Biotek จำกัด รุ่น Powerwave XS2
18. Hot plate

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การเตรียมสารตัวอย่าง

การสกัดโปรตีนจากรำข้าวสังข์หยดด้วยการสกัดเบสแล้วตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก ตามวิธีการสกัดของ Ghosh และคณะ[14] เริ่มด้วยการสกัดไขมันออกจากรำข้าว โดยใช้ตัวทำละลายสกัด คือ เฮกเซน ในอัตราส่วนรำข้าวต่อเฮกเซน คือ 1 ต่อ 3 คนสารผสมทิ้งไว้เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทำการแยกตัวทำละลายจากรำข้าว จากนั้นผึ่งรำข้าวปราศจากไขมันบนถาดอลูมิเนียมที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ข้ามคืน เมื่อรำข้าวปราศจากไขมันแห้งแล้ว ให้นำรำข้าวมาร่อนผ่านตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร จากนั้นเก็บส่วนที่ผ่านตะแกรงในถุงพลาสติกปิดปากถุงให้แน่น เก็บในที่มืด อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

2.3.2 การสกัดโปรตีนจากรำข้าวด้วยการสกัดเบสแล้วตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก

ผสมรำข้าวกับน้ำกลั่น ในอัตราส่วนรำข้าวต่อน้ำกลั่น คือ 1 ต่อ 4 ทำการปรับสารผสมให้มี pH 10 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 N จากนั้นคนสารเป็นเวลา 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 - 55 องศาเซลเซียส แล้วนำสารผสมที่ได้กรองผ่านผ้าไนล่อนแล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทิ้งตะกอนแล้วนำสารละลายด้านบนมาปรับให้ได้ pH 4.0 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก (HCl) 1 N แล้วคนสารผสมเป็นเวลา 1, 2 และ 4 ชั่วโมงตามเวลาการทำครั้งแรก ที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายที่มีตะกอนโปรตีนมาทำให้แห้งโดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย ด้วยเครื่อง Mini Spray Dryer B-290 ที่อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้า 100 และ 150 องศาเซลเซียส จะได้โปรตีนสกัดจากรำข้าว (crude protein : CP) เก็บสารในถุงพอลีเอทิลีนสีชาทึบ แล้วเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

2.3.3 การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ปาเปน

โปรตีนสกัดจากรำข้าว 10 กรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.02 mM ปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยเริ่มแรกใส่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับ pH ของสารละลายให้ใกล้เคียง 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2.0 N แล้วเติมสาระลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์อีก 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับสารละลายให้ได้ pH 7.0 ด้วยพีเอชมิเตอร์ (pH meter) และปรับอุณหภูมิของสารละลายให้ได้ 37 องศาเซลเซียส และคนสารตลอดการทดลอง เมื่อควบคุมสภาวะได้แล้ว ทำการเติมเอนไซม์ปาเปนปริมาณ 0.01

กรัม จากนั้นจึงเริ่มจับเวลาเพื่อศึกษาเวลาไฮโดรไลซิส (hydrolysis time) ได้แก่ 1 6 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วให้หยุดปฏิกิริยาโดยการทำลายการทำงานของเอนไซม์ปาเปน โดยการนำบีกเกอร์สารละลายแช่ในอ่างน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่ไม่ละลายออก ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ทิ้งตะกอนแล้วนำสารละลายด้านบนมาทำให้แห้งโดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย ด้วยเครื่อง Mini Spray Dryer B-290 ที่อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้า 100 และ 150 องศาเซลเซียส ตามอุณหภูมิเดิมของ CP จะได้โปรตีนไฮโดรไลเซต (hydrolysate protein : HD) เก็บสารในถุงพอลีเอทิลีนสีชาทึบ แล้วเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

2.4 การตรวจสอบคุณสมบัติโปรตีนที่สกัดได้

2.4.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

นำโปรตีนที่สกัดได้ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วใช้สารละลายส่วนบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 200-750 นาโนเมตร

2.4.2 การหาขนาดโมเลกุลของโปรตีน

โดยใช้เทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยการชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 50 มิลลิกรัมใส่ในเอพเพนดอร์ฟ ละลายด้วย Tris-Cl pH7.4 ความเข้มข้น 1 M และ 10% SDS นำไปให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียสนาน 20 นาทีนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16000 x g นาน 10 นาที จากนั้นโหลดตัวอย่างลงเจลที่มี 4% acrylamide stacking gel และ 12.5% acrylamide separating gel โดยใช้ silver strain

2.4.3 การหาปริมาณโปรตีน

เตรียมโปรตีนตัวอย่างเหมือนการทดลองที่ 2.4.2 จากนั้นเจือจางสารตัวอย่าง 50 เท่าในไมโครเวลเพลท ขนาด 96 หลุม แล้วเติมชุดรีเอเจนต์ BCA Protein Assay Kit จากบริษัท Thermo Fisher Scientific Inc. นำไปบ่มที่อุณภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร โดยสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ใช้คือ bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 0, 0.025, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 และ 2 μg/mL

2.4.4 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล

ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (total phenolic content : TPC) ถูกวิเคราะห์ด้วย Folin-Ciocalteu method ตามวิธีการทดลองของ Thamnarathip และคณะ[23] ซึ่งต้องใช้สารดังต่อไปนี้

1) รีเอเจนต์ Folin & Ciocalteu ความเข้มข้นเจือจาง (1:10 v/v)
   - ปิเปตรีเอเจนต์ Folin & Ciocalteu ความเข้มข้น 2N ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในบีเกอร์ จากนั้นปิเปตน้ำปราศจากไอออน 9 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเข้ากัน
2) โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.0% (w/v)
   - ชั่งโซเดียมคาร์บอเนตหนัก 3.5 กรัม ละลายสารด้วยน้ำปราศจากไอออนในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร
3) สารละลายกรดแกลลิก ความเข้มข้น 0.6 mg/mL
   - ชั่งกรดแกลลิก หนัก 0.0300 กรัม ละลายสารด้วยน้ำปราศจากไอออนในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร
4) การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ที่ความเข้มข้น0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 และ 0.06 mg/mL โดยปิเปตสาร ตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารละลายที่ใช้เพื่อการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

ความเข้มข้นกรดแกลลิก (mg/mL)	ปริมาตรกรดแกลลิกความเข้มข้น 0.6 mg/mL (μL)	ปริมาตรน้ำปราศจากไอออน (μL)
0	0	1000
0.01	17	983
0.02	33	967
0.03	50	950
0.04	67	933
0.05	83	917
0.06	100	900

เมื่อเตรียมสารละลายที่ต้องใช้ครบแล้ว ให้เริ่มการทดสอบ ดังนี้

1) ผสมสารละลายโปรตีนตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร เข้ากับรีเอเจนต์ Folin & Ciocalteu เจือจาง (1:10 v/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.0% (w/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มสารละลายในที่มืดนาน 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
2) นำสารละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm
3) ใช้สารละลายกรดแกลลิก ที่ความเข้มข้น 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 และ 0.06 mg/mL เป็นสารละลายมาตรฐาน การรายงานค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดแสดงในหน่วย mg gallic acid equivalent (GAE)/g sample

2.4.5 การทดสอบวิธีเบเนดิกต์ (Benedict's test)

ตามวิธีการของ คณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย[24] ชั่งสารโปรตีนตัวอย่างทั้ง 8 ชนิดหนัก 0.0500 กรัม ใส่ในแต่ละเอพเพนดอร์ฟ ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารด้วยเครื่อง vortex นาน 15 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่ไม่ละลายออก ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อนำสารละลายด้านบนมาทดสอบ จากนั้นเตรียมสารละลายดังนี้

1) สารละลายเบเนดิกต์
   - ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟตหนัก 0.4325 กรัม
   - ชั่งโซเดียมซิเตรตหนัก 4.375 กรัม
   - ชั่งโซเดียมคาร์บอเนตหนัก 2.5000 กรัม
   - ละลายสารทั้ง 3 ชนิดข้างต้นเข้าด้วยกันในบีกเกอร์ ด้วยน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 25 มิลลิลิตร
2) สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0.1% (w/v)
   - ชั่งกลูโคสหนัก 0.0100 กรัม ละลายสารด้วยน้ำปราศจากไอออนในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร

เมื่อเตรียมสารละลายที่ต้องใช้ครบแล้ว ให้เริ่มการทดสอบโดยปิเปตสารต่างๆ ตามตารางที่ 2.2 จากนั้นนำไปให้ความร้อนในบีกเกอร์น้ำเดือดนาน 3-5 นาที แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย โดยสังเกตควบคู่ไปกับหลอด blank และ positive test เสมอ

ตารางที่ 2.2 ปริมาณสารละลายที่ใช้ในการทดสอบหาน้ำตาลรีดิวซ์

หลอดทดลอง	blank	positive test	สารตัวอย่าง
น้ำ (mL)	0.5	-	-
สารละลายกลูโคส (mL)	-	0.5	-
สารละลายตัวอย่าง (mL)	-	-	0.5
สารละลายเบเนดิกต์ (mL)	1	1	1

2.5 การทดสอบความสามารถในการต่อต้านสารอนุมูลอิสระ โดยเทคนิคการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging activity)

ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของโปรตีนตัวอย่างในสาร 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ตามวิธีการของ Stanisavljević และ คณะ[25] โดยมีการปรับเปลี่ยนเล็กน้อย สารที่ต้องเตรียมมีดังนี้

1) สารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆในน้ำปราศจากไอออน ได้แก่ $1x10^5$, $0.5x10^5$, $1x10^4$, $0.5x10^4$, $1x10^3$, $0.5x10^3$, $.5x10^2$, 10, 5 และ 1 μg/mL โดยใช้หลักการ Serial Dilutions จากการชั่งสาร 0.1000 กรัมละลายในน้ำปราศจากไอออน 1 มิลลิลิตร

2) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.05 mM
   - เตรียมสารละลายโพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 1 M โดยชั่งสารหนัก 13.6084 กรัม ละลายสารด้วยน้ำปราศจากไอออนในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เรียกว่าสารละลาย A
   - เตรียมสารละลายไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 1 M โดยชั่งสารหนัก 14.1957 กรัม ละลายสารด้วยน้ำปราศจากไอออนในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เรียกว่าสารละลาย B
   - ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน โดยปิเปตสารละลาย A ปริมาตร 21.1 มิลลิลิตร และสารละลาย B ปริมาตร 28.9 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 2000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ตรวจวัดพีเอชด้วยพีเอชมิเตอร์ ถ้าพีเอชไม่ตรงให้ปรับด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริก

3) สารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 mM
   - ชั่ง DPPH หนัก 0.0015 กรัม ละลายสารด้วยเอทานอลในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร

เมื่อเตรียมสารละลายที่ต้องใช้ครบแล้ว ให้เริ่มการทดสอบโดยปิเปตสารต่างๆ ตามตารางที่ 2.3 จากนั้นบ่มสารละลายไว้ในที่มืดนาน 30 นาที (เนื่องจากสารละลายตกตะกอน ที่นาทีที่ 20 จึงนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที) แล้วจึงนำสารละลายด้านบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm

ตารางที่ 2.3 ปริมาณสารละลายที่ใช้เพื่อตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช

	Sample	Control	Blank
ปริมาตรสารละลายตัวอย่างในน้ำปราศจากไอออน (μL)	100	100	-
ปริมาตรสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์(μL)	400	400	500
ปริมาตรสารละลาย DPPH (μL)	200	-	200
ปริมาตรเอทานอล	-	200	-

โดยค่า scavenging activity สามารถคำนวณได้จากสมการด้านล่าง แล้วนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารตัวอย่างกับ %I ที่คำนวณได้ จะได้ค่า half inhibition concentration (IC_{50}) กำหนดให้

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ประกอบด้วยสารตัวอย่างและสารละลาย DPPH

$A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ประกอบด้วยสารตัวอย่างและเอทานอล

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ประกอบด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และสารละลาย DPPH

$$I\% = \frac{A_{blank} - (A_{sample} - A_{control})}{A_{blank}} \times 100\%$$

2.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

- เลี้ยงเซลล์ปกติของกล้ามเนื้อหนู (L929) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเลี้ยงเซลล์ไว้ในไมโครเพลทขนาด 96 หลุม แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้น $1x10^5$, $1x10^4$, $1x10^3$, $1x10^2$, 10 และ 1 μg/mL โดยใช้หลักการ Serial Dilutions จากการชั่งสาร 0.1000 กรัมละลายในน้ำmilli-Q 1 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 μL ใส่ในแต่ละหลุม จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น $1x10^4$, $1x10^3$, $1x10^2$, 10, 1 และ 0.1 μg/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
- ปิเปตสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 mg/mL ปริมาตร 10 μL ใส่ลงในทุกหลุม เพื่อย้อมสีเซลล์ที่มีชีวิตรอด จากนั้นบ่มสารเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C 5% คาร์บอนไดออกไซด์

- ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ด้านบนแต่ละหลุมออก จากนั้นปิเปตสารละลาย DMSO เพื่อละลายผลึก formazan ทิ้งไว้จนกว่าจะได้สารละลายสีม่วงคงที่ เขย่าสารให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

โดยค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิต (% cell viability) สามารถหาค่าได้จากสมการด้านล่าง แล้วนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารตัวอย่างกับ % cell viability ที่คำนวณได้ กำหนดให้

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ประกอบด้วยสารตัวอย่างในเซลล์

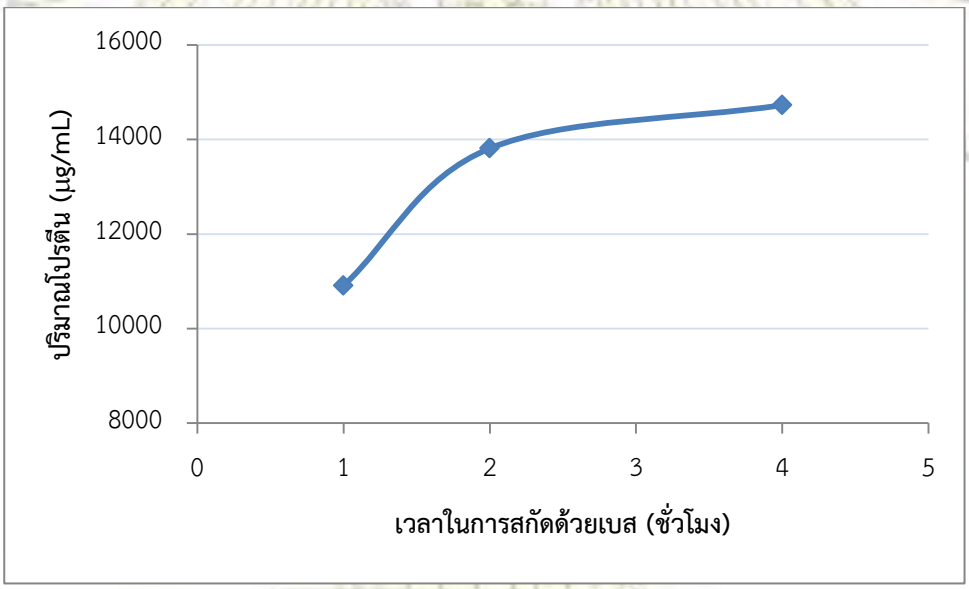
A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารตัวอย่างในเซลล์

$$\% \text{ cell viability} = \frac{A_{sample}}{A_{blank}} \times 100\%$$

บทที่ 3
ผลการทดลองและการอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การสกัดโปรตีนจากรำข้าวด้วยวิธีการสกัดด้วยเบสและตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก

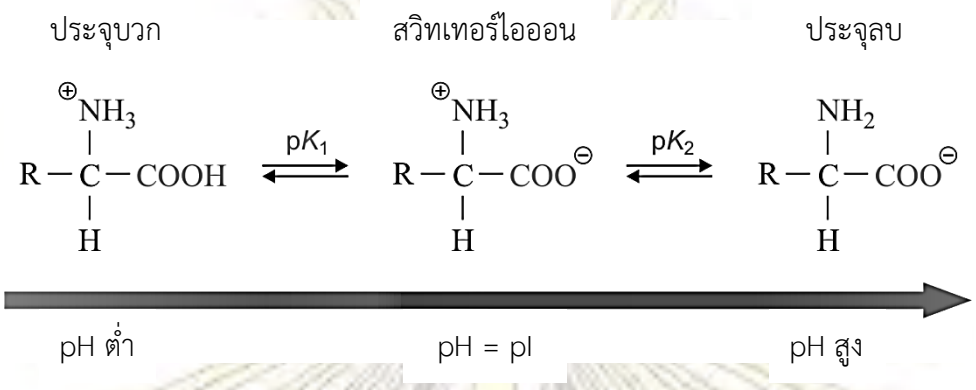
ในขั้นแรกเป็นการทดสอบหาเวลาที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวด้วยการสกัดด้วยเบสและตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก โดยศึกษาที่เวลา 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการทดลองขนาดเล็กที่ใช้รำข้าว 10 กรัม และทำให้โปรตีนแห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่าได้ปริมาณโปรตีนดังรูปภาพที่ 3.1 ลักษณะผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีน้ำตาลดำ ละลายน้ำไม่ดีจึงต้องใช้อ่างส่งคลื่นความถี่สูงเพื่อช่วยให้ละลายดีขึ้น โดยจะเห็นว่า จากชั่วโมงที่ 1 ไปถึงชั่วโมงที่ 2 ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างมาก แต่ชั่วโมงที่ 4 นั้นไม่ได้แตกต่างจากชั่วโมงที่ 2 เท่าไหร่นัก จึงสรุปได้ว่า ในการทดลองขั้นนี้ มีเวลาในการสกัดที่เหมาะสม คือ 2 ชั่วโมง ซึ่งจะใช้ในการทดลองครั้งต่อไป



รูปภาพที่ 3.1 ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีจากรำข้าวที่เวลาต่างๆ

การทดลองขั้นต่อมาเป็นการศึกษาอุณหภูมิของการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย ในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์นั้น เพื่อให้โปรตีนจากในรำข้าวละลายออกมายังตัวทำละลายที่มีสภาวะเป็นเบส เนื่องจากโปรตีนประกอบไปด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดที่มีโครงสร้างเป็น $NH_2(CH)COOH$-R ที่มีทั้งหมู่เอมีนที่เป็นเบสและหมู่คาร์บอกซิลิกที่เป็นกรด โดยหมู่โซ่ข้าง (side chain : R) เป็นส่วนที่ทำให้กรดอะมิโนมีความแตกต่างกันไป โดยกรดอะมิโนมีโครงสร้างเป็นสวิทเทอร์ไอออน (Zwitterion) ตามรูปภาพที่ 3.2 ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยประจุบวกและประจุลบทำให้โมเลกุลนี้มีความเป็นเป็นกลาง

แต่เมื่ออยู่ในภาวะที่เป็นเบส หมูคาร์บอกซิลิกจะเสียโปรตอน ทำให้ประจุรวมเป็น -1 ซึ่งจะเกิดการผลักกันเองของกรดอะมิโน ทำให้กรดอะมิโนหรือโปรตีนสามารถละลายน้ำได้[24]



รูปภาพที่ 3.2 แผนภาพการเปลี่ยนแปลงประจุของกรดอะมิโนที่ pH ต่างๆ

จากนั้นนำสารผสมมากรองด้วยผ้าไนล่อนเพื่อแยกกากรำข้าวขนาดใหญ่ออก แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกส่วนที่ไม่ละลายน้ำออก ได้แก่ กากรำข้าวขนาดเล็ก เส้นใยไฟเบอร์ และอื่นๆ จะได้สารละลายใสสีน้ำตาล เมื่อทำการทดลองปรับ pH ของสารละลายหลังเซนตริฟิวจ์เป็น pH 4.0 จะสังเกตเห็นว่ามีตะกอนเกิดขึ้นในสารละลายอย่างชัดเจน เนื่องจาก ที่ pH 4.0 เป็นจุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point : pI) ของโปรตีน ที่จุดนี้กรดอะมิโนจะมีประจุสุทธิเป็น 0 เนื่องจากกรดอะมิโนมีทั้งประจุบวกและประจุลบ ทำให้มันสามารถจับกับกรดอะมิโนข้างเคียงที่มีประจุตรงข้ามได้แล้วเกิดการรวมตัวและตกตะกอนขึ้น จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาทำให้แห้งแบบพ่นฝอย โดยใช้เครื่อง Mini Spray Dryer B-290 ที่อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้า 100 และ 150 องศาเซลเซียส จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลอ่อน มีกลิ่นคล้ายรำข้าว ซึ่งกำหนดชื่อเป็น CP100 และ CP150 ตามลำดับ โดยน้ำหนักโปรตีนสกัดที่ได้ คือ 49.45 กรัม และ 75.49 กรัม คิดเป็น % recovery คือ 4.94 และ 7.55 ตามลำดับ โดยจะเห็นว่าที่อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้า 150 องศาเซลเซียสนั้นให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่มากกว่า เนื่องจากที่อุณหภูมิสูง ปริมาณความชื้นในผลิตภัณฑ์จะน้อยลง ทำให้สูญเสียปริมาณสารในกระบวนการทำให้แห้งน้อยลงจึงได้ผลิตภัณฑ์มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้า 100 องศาเซลเซียส นอกจากจะได้ปริมาณสารมากกว่าแล้วในเรื่องของการเก็บรักษายังสามารถเก็บรักษาได้นานกว่าอีกด้วย[26]

3.2 การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ปาเปน

ในขั้นตอนนี้ได้ทำการศึกษาเวลาในการไฮโดรไลซิส ที่ 1, 6 และ 24 ชั่วโมง ดังนั้นในแต่ละตัวอย่างจะทำการชั่งสาร 3 ครั้งเพื่อศึกษาแต่ละเวลา จากนั้นละลายสารตัวอย่างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.02 mM ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เนื่องจาก CP100 และ CP150 มีสภาพเป็นกรด จึงต้องปรับให้ได้ pH 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N จากนั้นปรับอุณหภูมิให้ได้ 37 องศาเซลเซียส ก่อนจะใส่เอนไซม์ปาเปน เพื่อให้สภาวะเหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ เพราะปาเปนมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง pH 6.0–7.0 หลังจากใส่เอนไซม์ปาเปนแล้วจึงเริ่มทำการจับเวลาในการไฮโดรไลซิส เมื่อครบเวลาในแต่ละบีกเกอร์แล้วทำการหยุดปฏิกิริยา โดยการนำบีกเกอร์มาให้ความร้อนในบ่อน้ำร้อน 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อทำให้เอนไซม์ปาเปนไม่สามารถทำงานได้ จากนั้นจึงได้มาทำให้แห้งแบบพ่นฝอย โดยใช้เครื่อง Mini Spray Dryer B-290 ที่อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้า 100 และ 150 องศาเซลเซียสตามเดิมของสารตั้งต้น ได้น้ำหนักผลิตภัณฑ์ดังตารางที่ 3.1 โดยกำหนดให้ CP100 ที่ไฮโดรไลซิสด้วยเวลา 1, 6 และ 24 ชั่วโมง มีตัวย่อเป็น HD100/1h, HD100/6h และ HD100/24h ตามลำดับ และกำหนดให้ CP150 ที่ไฮโดรไลซิสด้วยเวลา 1, 6 และ 24 ชั่วโมง มีตัวย่อเป็น HD150/1h, HD150/6h และ HD150/24h ตามลำดับ โดยจะเห็นว่าปริมาณสารที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส มีค่ามากกว่าที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เนื่องจากมีความชื้นน้อยกว่า

ตารางที่ 3.1 น้ำหนักของโปรตีนไฮโดรไลเซตทั้ง 6 ชนิดหลังทำให้แห้งแบบพ่นฝอย

สาร	น้ำหนัก CP100 (g)	น้ำหนักผลิตภัณฑ์ที่ได้ (g)
HD100/1h	10.0062	1.2438
HD100/6h	10.0070	2.0275
HD100/24h	10.0402	1.5432

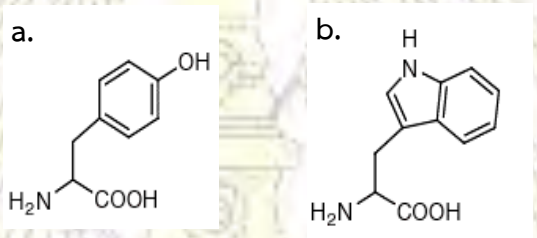
	น้ำหนัก CP150 (g)	น้ำหนักผลิตภัณฑ์ที่ได้ (g)
HD150/1h	10.0403	4.1297
HD150/6h	10.0252	4.7101
HD150/24h	10.0357	3.7127

ในกระบวนการไฮโดรไลซิส ซึ่งเป็นการย่อยโปรตีนให้มีขนาดเล็กลง โดยการตัดพันธะเปปไทด์ให้เป็นสายสั้น ซึ่งจะช่วยในแง่ของการดูดซึม โดยจากการทดลองพบว่าการไฮโดรไลซิสนั้นส่งผลต่อการละลายของโปรตีนด้วย ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ crude protein แล้ว หากละลายสารในปริมาณ 10 mg/mL เขย่าสารเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ จากนั้นแยกสารละลายออก นำตะกอนที่เหลือไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้สารแห้ง แล้วชั่งน้ำหนักส่วนที่ไม่ละลายน้ำจะพบว่า crude protein มีส่วนที่ไม่ละลายน้ำมากกว่าโปรตีนไฮดีนไฮโดรไลเซตอย่างชัดเจน

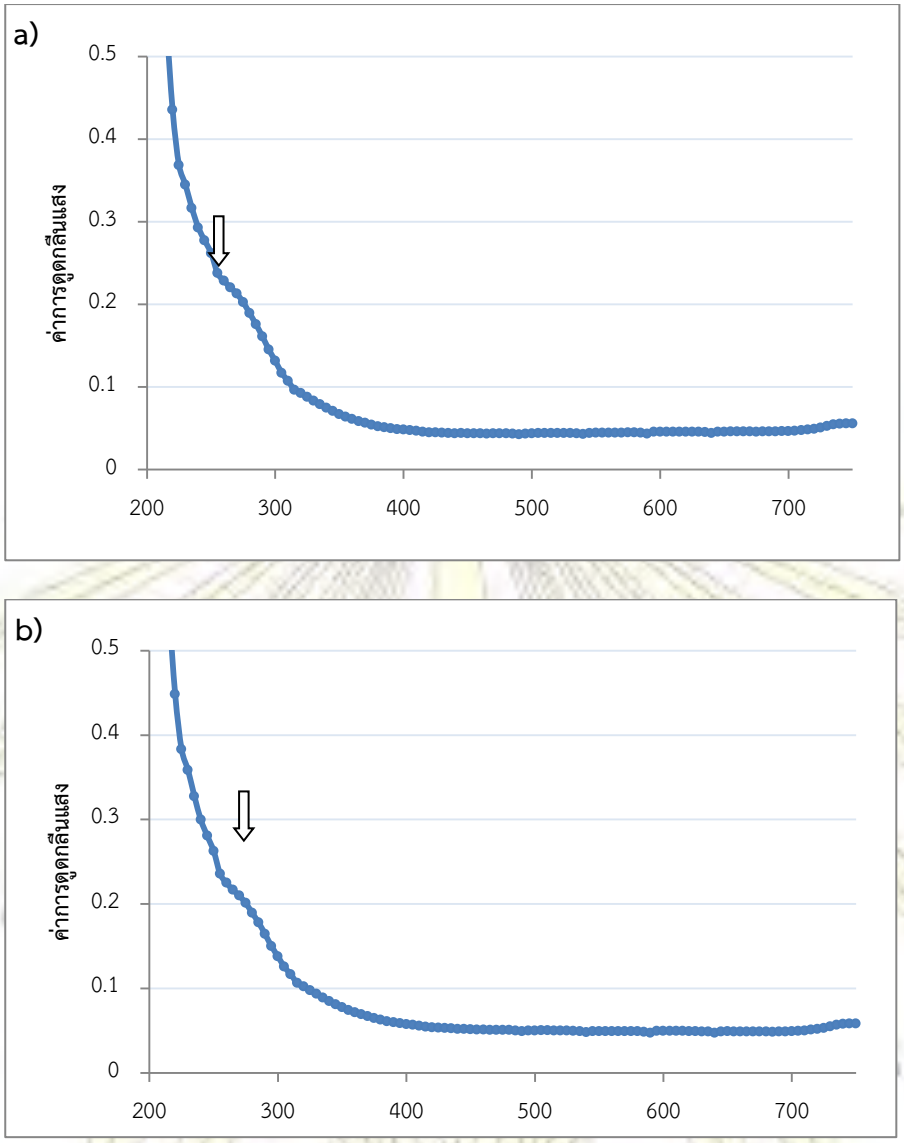
3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีนที่สกัดได้

3.3.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

นำโปรตีน CP100 และ HD100/1h ละลายกับน้ำปราศจากไอออน จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 10000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อให้สารละลายใสไม่มีความขุ่น เพราะใช้สารละลายนี้กับเทคนิค UV-vis spectroscopy โดยทำการวัดค่าความยาวคลื่นที่ 280 นาโนเมตร ซึ่งเป็นการทดสอบเชิงคุณภาพเพื่อยืนยันโปรตีน โดยเทคนิคนี้ไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีอื่นๆ ใช้เพียงตัวอย่างโปรตีนที่ต้องการทดสอบเท่านั้น จึงง่าย สะดวกและรวดเร็ว เนื่องจากในโปรตีนที่มีกรดอะมิโนจำพวกหมู่โซ่ข้างที่เป็นวงอะโรมาติก ได้แก่ tyrosine และ tryptophan ที่มีโครงสร้างตามรูปภาพที่ 3.3 ทำให้สามารถดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลตได้ ผลการทดลองแสดงตามรูปภาพที่ 3.4 โดยจะเห็นว่ามีพีคขนาดเล็กปรากฏที่ 280 นาโนเมตร จึงสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้ทั้ง crude และ ผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลเซตเป็นโปรตีน



รูปภาพที่ 3.3 โครงสร้างกรดอะมิโน a) tyrosine และ b) tryptophan

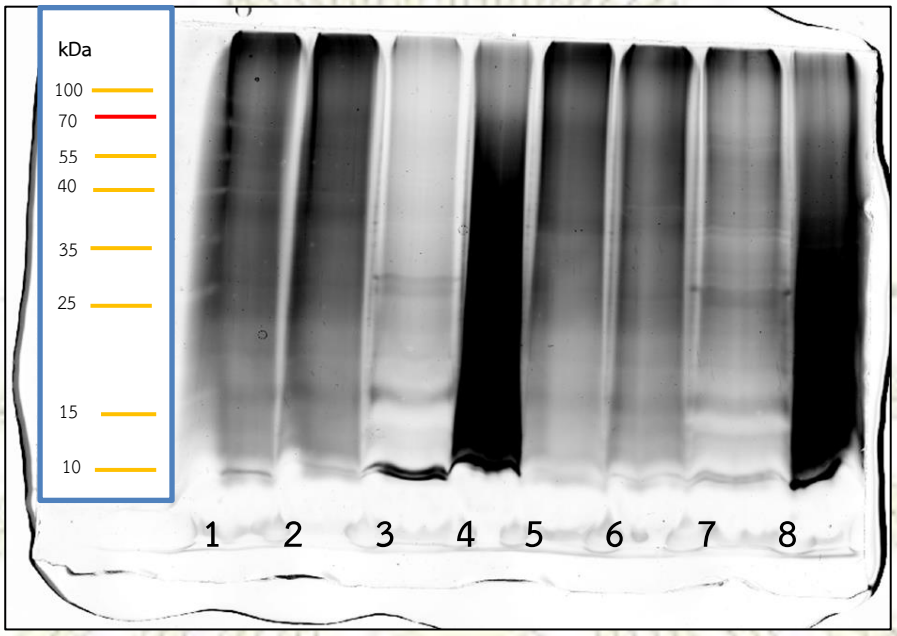


รูปภาพที่ 3.4 แสดงกราฟการดูดกลืนแสง a) CP100 และ b) HD100/1h

3.3.2 การหาขนาดโมเลกุลของโปรตีน

เทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นเทคนิคเพื่อใช้หาขนาดโมเลกุลของสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่โดยใช้สนามไฟฟ้า สารที่นิยมใช้เทคนิคนี้ ได้แก่ ดีเอ็นเอ โปรตีน เป็นต้น โดยการแปลผลจะเทียบขนาดกับโปรตีนมาตรฐาน ได้ผลการทดลองดังรูปภาพที่ 3.5 โปรตีนมาตรฐานเห็นแบนที่ไม่ชัดเจนเนื่องจากโดนสารละลายโปรตีนบดบัง แต่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จึงกำหนดขนาดไว้ในกรอบสีน้ำเงิน (ด้านซ้ายของรูปภาพ) โดยเลนที่ 4 และ 8 เป็นของสาร CP100 และ CP150 ตามลำดับ จะเห็นว่าไม่สามารถแยกแบนด์ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากโปรตีนนี้ไม่บริสุทธิ์และอาจมีสารอื่นผสมอยู่มาก เช่น พวกรงควัตถุ เป็นต้น ในสภาวะไฮโดรไลซิสที่ 1 และ 2 ชั่วโมง

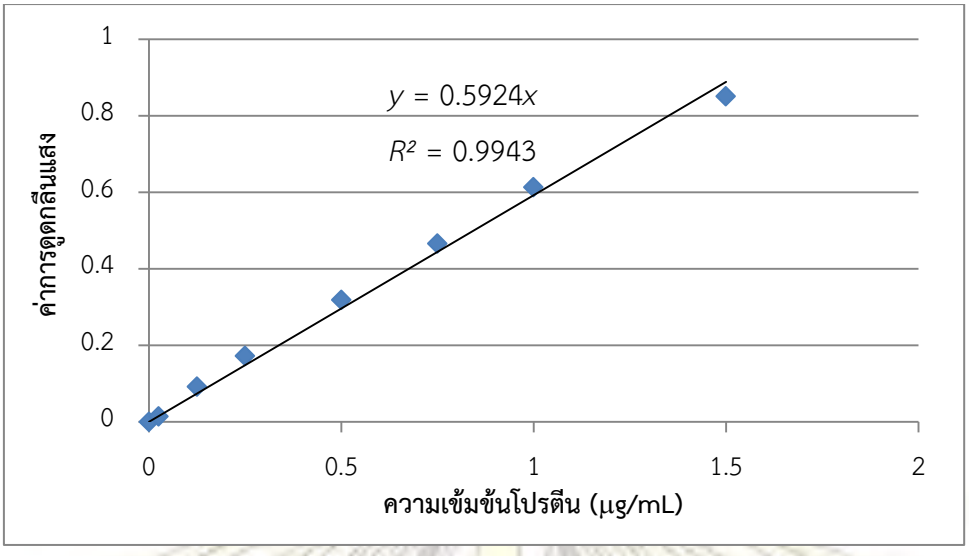
จะเห็นแบนที่ประมาณ 35 - 40 kDa แต่ไม่พบแบนด์นี้เมื่อใช้เวลาไฮโดรไลซิส 24 ชั่วโมง และพบแบนที่ 25-35 kDa แทน ดังนั้นจึงคาดได้ว่าโปรตีนถูกไฮโดรไลซิสให้มีขนาดเล็กลงอย่างชัดเจนเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง แต่ในทุกๆตัวอย่างจะพบโปรตีนขนาดประมาณ 15 kDa



รูปภาพที่ 3.5 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของรำข้าวสังข์หยดที่สภาวะต่างๆ ด้วย SDS-PAGE โดย เลนที่ (1)HD100/1h (2)HD100/1h (3)HD100/1h (4)CP100 (5)HD100/1h (6)HD100/1h (7)HD100/1h และ (8)CP150

3.3.3 การหาปริมาณโปรตีน

การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีการ bicinchoninic acid (BCA) assay สารละลายคิวปรัส (Cu^{2+}) จะเข้าจับกับพันธะเปปไทด์แล้วกลายเป็นคิวปริกไอออน (Cu^{+}) ที่สามารถกับ bicinchoninic acid ได้ จะเห็นสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-vis spectroscopy ได้ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร โดยความเข้มของสีน้ำเงินแปรผันตรงกับปริมาณโปรตีนในสารละลาย สามารถหาความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างโดยการสร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีน bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0, 0.025, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 และ 2 μg/mL จะได้กราฟมาตรฐาน ดังรูปภาพที่ 3.6



รูปภาพที่ 3.6 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร

เมื่อนำสารละลายโปรตีนตัวอย่างทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ CP100, CP150, HD100/1h, HD100/6h, HD100/24h, HD150/1h, HD150/6h และ HD150/24h มาวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ BCA assay แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง เพื่อหาปริมาณโปรตีน

ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง
CP100	0.543
CP150	0.574
HD100/1h	0.658
HD100/6h	0.725
HD100/24h	0.645
HD150/1h	0.698
HD150/6h	0.677
HD150/24h	0.654

จากกราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA จะได้สมการกราฟมาตรฐาน $y = 0.6223x$ ที่มีค่า $R^2 = 0.9981$ และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนตัวอย่างที่วัดได้มาคำนวณหาความเข้มข้นโปรตีนในสารละลาย จะได้ผลดังตารางที่ 3.3 จากผลการทดลองพบว่า CP100 และ CP150 มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตทุกสภาวะ แต่โปรตีนไฮโดรไลเซตมีปริมาณโปรตีนที่ใกล้เคียงกัน

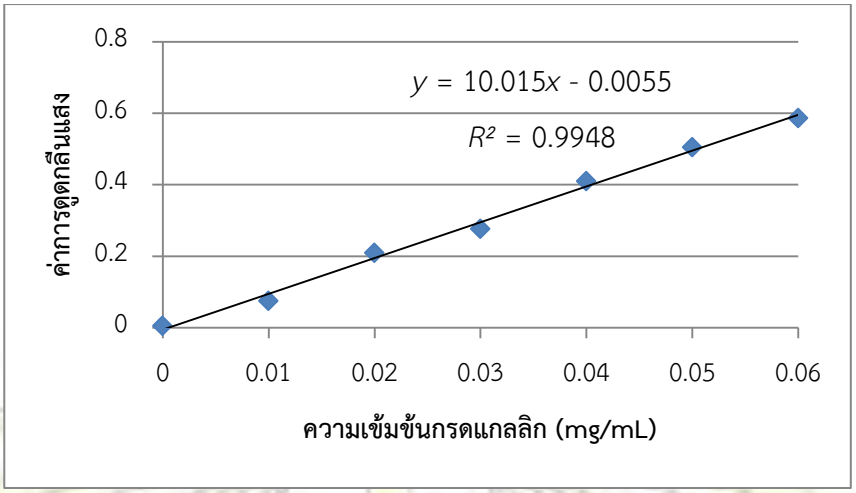
ดังนั้นเวลาในการไฮโดรไลซิสและอุณหภูมิของการทำให้แห้งแบบพ่นฝอยไม่มีผลต่อปริมาณโปรตีน แต่การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ปาเปนมีผลต่อปริมาณโปรตีน

ตารางที่ 3.3 แสดงปริมาณโปรตีนเทียบกับน้ำหนักสารตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นโปรตีน (μg/mL)	กรัมโปรตีน/กรัมตัวอย่าง
CP100	36.38	0.33
CP150	38.99	0.38
HD100/1h	46.08	0.41
HD100/6h	51.74	0.52
HD100/24h	44.99	0.43
HD150/1h	49.46	0.43
HD150/6h	47.69	0.47
HD150/24h	45.75	0.45

3.3.4 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลตามวิธีการ Folin Ciocalteu method เพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอล โดยอาศัยหลักการที่ฟีนอลมีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นเบสจะแตกตัวให้ฟีโนเลตแอนไอออน ซึ่งมีความสามารถในการรีดิวซ์สารละลายรีเอเจนต์ Folin & Ciocalteu's phenol ทำให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-vis spectroscopy ได้ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร สามารถหาปริมาณสารประกอบฟีนอลของโปรตีนตัวอย่างโดยการสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ที่ความเข้มข้น 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 และ 0.06 mg/mL จะได้กราฟมาตรฐาน ดังรูปภาพที่ 3.7



รูปภาพที่ 3.7 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

เมื่อนำสารละลายโปรตีนตัวอย่างทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ CP100, CP150, HD100/1h, HD100/6h, HD100/24h, HD150/1h, HD150/6h และ HD150/24h มาวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Folin Ciocalteu method แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง เพื่อหาปริมาณฟีนอล

ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง
CP100	0.339
CP150	0.354
HD100/1h	0.325
HD100/6h	0.347
HD100/24h	0.339
HD150/1h	0.317
HD150/6h	0.311
HD150/24h	0.321

จากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก จะได้สมการกราฟมาตรฐาน $y = 10.015x - 0.0055$ ที่มีค่า $R^2 = 0.9948$ และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนตัวอย่างที่วัดได้มาคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลในสารละลายตัวอย่าง จะได้ผลดังตารางที่ 3.5 โดยการรายงานผลปริมาณฟีนอลทั้งหมดจะรายงานในหน่วย mg Gallic acid Equivalents (GAE)/g sample โดยจะเห็นว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลมีปริมาณไม่แตกต่างกันมาก ทั้ง crude protein และ โปรตีนไฮโดรไลเซต อาจจะเนื่องมาจากใช้

วิธีการสกัดโปรตีนที่เหมือนกัน เนื่องจากสารประกอบฟีนอลจะมีการสร้างแรงกระทำกับโปรตีนทั้งพันธะโควาเลนต์และไม่ใช่พันธะโควาเลนต์[7] ทำให้สามารถพบสารประกอบฟีนอลในโปรตีนที่สกัดได้จากวิธีเดียวกัน นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลยังมีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย

ตารางที่ 3.5 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเปรียบเทียบกับปริมาณสารกรดแกลลิก

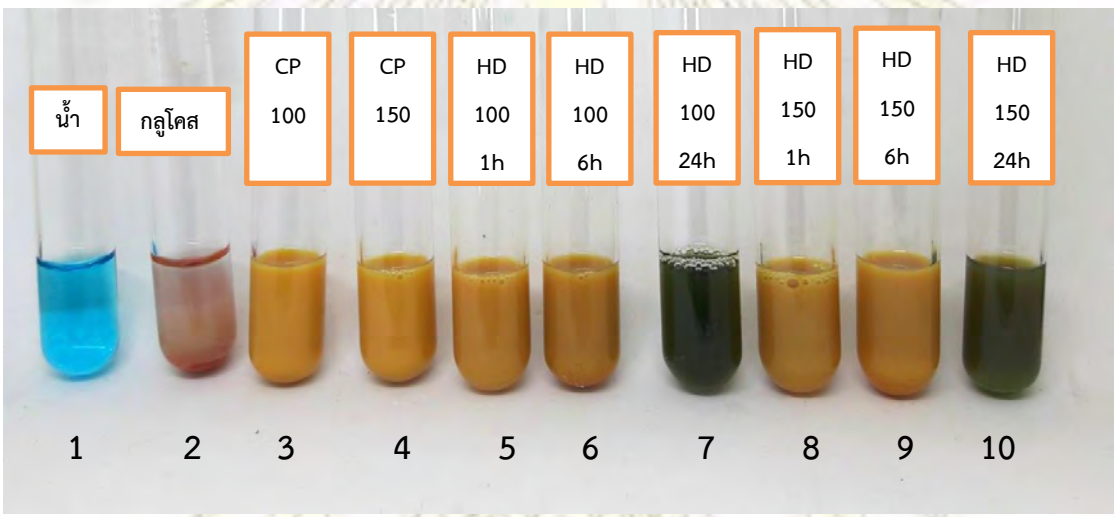
ตัวอย่าง	mg gallic acid equivalents (GAE)/g sample
CP100	41.8/
CP150	52.58
HD100 1h	46.43
HD100 6h	42.37
HD100 24h	43.91
HD150 1h	39.39
HD150 6h	44.14
HD150 24h	43.62

3.3.5 วิธีเบเนดิกต์ (Benedict's test)

วิธีเบเนดิกต์เป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณ เพื่อตรวจสอบว่าสารตัวอย่างมีน้ำตาลรีดิวซ์หรือไม่ โดยน้ำตาลรีดิวซ์ คือ สารคาร์โบไฮเดรตจำพวกน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือโมเลกุลคู่ ที่มีหมู่แอลดีไฮด์อิสระและหมู่คีโตนอิสระ ซึ่งมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนได้ โดยในสารละลายจะมีคิวปริกไอออน (+2) ในสภาวะเบส ซึ่งเมื่อสารนี้ได้รับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นคิวปรัสไอออน (+1) ในรูปออกไซด์ (Cu_2O) ทำให้สีของสารละลายเปลี่ยนแปลง ใช้ความร้อนในการเร่งปฏิกิริยานาน 3-5 นาที ซึ่งสารประกอบนี้ไม่ละลายน้ำ ทำให้ตกตะกอนสีแดงอิฐออกมาในที่สุด โดยสีของสารละลายสามารถเปลี่ยนแปลงได้ในช่วงสีฟ้า เขียว เหลือง ส้ม และแดงอิฐ โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเกี่ยวข้องกับสีของสารละลายดังนี้[27]

- สีฟ้า หมายความว่า ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์
- สีเขียว หมายความว่า มีน้ำตาลรีดิวซ์ 0.1-0.5 % ในสารละลาย
- สีเหลือง หมายความว่า มีน้ำตาลรีดิวซ์ 0.5-1 % ในสารละลาย
- สีส้ม หมายความว่า มีน้ำตาลรีดิวซ์ 1-1.5 % ในสารละลาย
- สีแดง หมายความว่า มีน้ำตาลรีดิวซ์ 1.5-2 % ในสารละลาย
- สีแดงอิฐ หมายความว่า มีน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่า 2% ในสารละลาย

จากการทดสอบตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้ทั้ง 8 ชนิด ชั่งโปรตีนตัวอย่างสารละ 50 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน 1 มิลลิลิตร เข่าสารให้เข้ากัน แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 4000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกส่วนที่ไม่ละลายน้ำออก เพื่อให้สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีได้ง่ายขึ้น ได้ผลการทดลองแสดงตามรูปภาพที่ 3.8 โดยหลอดทดลองที่ 1 เป็น blank ที่ใส่น้ำเปล่าเพื่อดูสีสารละลายที่ไม่มีการเกิดปฏิกิริยาจะเห็นเป็นสารละลายใสสีฟ้า หลอดทดลองที่ 2 คือ สารละลายกลูโคส 0.1% ซึ่งเป็นชุด positive test จะสังเกตเห็นตะกอนสีแดงอิฐในสารละลายสีแดงอิฐ เนื่องจากกลูโคสเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ หลอดทดลองที่ 3-10 เป็นสารละลายโปรตีนตัวอย่าง ตามที่ได้ระบุไว้ในรูปภาพที่ 3.8 จะเห็นว่าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองในหลอดที่ 3, 4, 5, 6, 8 และ 9 แสดงว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 0.5-1 % ในสารละลายโปรตีน ในหลอดที่ 7 และ 10 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ 24 ชั่วโมง จะได้สารละลายสีเขียว แสดงว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่น้อยกว่าทั้ง 6 หลอดข้างต้น



รูปภาพที่ 3.8 สีของสารละลายตัวอย่างต่างๆ เมื่อทดสอบด้วยวิธีเบเนดิกต์

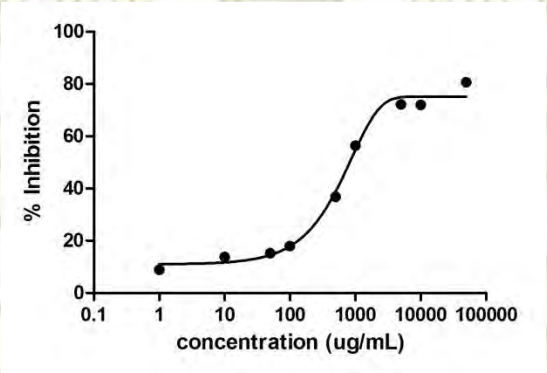
3.4 การทดสอบความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging activity)

การตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีความเสถียร และง่ายต่อการตรวจวัด เพราะเมื่อละลาย DPPH ในเอทานอลจะได้สารละลายสีม่วงเข้ม ซึ่งเมื่อสารนี้รับโปรตอน (อิเล็กตรอน) จะเกิดเป็นสารประกอบที่มีสีเหลืองซึ่งสีม่วงจะจางหายไปตามปริมาณการเพิ่มขึ้นของสารประกอบสีเหลืองนี้ ทำให้สามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาได้ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ซึ่งสามารถคำนวณได้ตามสมการด้านล่าง โดยสาเหตุที่ต้องทำชุด control เนื่องจากว่า สารละลายตัวอย่างสามารถดูดกลืนความยาวคลื่นที่ 517 นาโนเมตรได้เช่นกัน จึงเป็นการ

รบกวนระบบการทำงาน ทำให้จำเป็นต้องลบค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างออกให้เหลือเพียงค่าการดูกลืนแสงของส่วนที่ทำปฏิกิริยากับดีพีพีเอช โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด

3.4.1 การทดสอบความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนตัวอย่างที่สกัดได้

โดยเตรียมสารตัวอย่างด้วยการละลายน้ำปราศจากไอออน ให้ได้ความเข้มข้น 10^5 μg/mL (ชั่งสารหนัก 0.1000 กรัม ละลายในน้ำ 1 มิลลิลิตร) แล้วเจือจางด้วยวิธี Serial Dilutions เพื่อให้สารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ $1x10^5$, $0.5x10^5$, $1x10^4$, $0.5x10^4$, $1x10^3$, $0.5x10^3$, $1x10^2$, $0.5x10^2$, 10, 5 และ 1 μg/mL โดยที่แต่ละค่าความเข้มข้นจะให้ค่า %inhibition ต่างๆกัน ซึ่งเมื่อนำมาสร้างกราฟการกระจายตัวระหว่างความเข้มข้นสาร (หลังผสมกับรีเอเจนต์ต่างๆ) และ %inhibition จะได้กราฟรูปตัวเอส (S curve) ที่สามารถหาค่า half inhibition concentration (IC_{50}) ได้ ซึ่งค่า IC_{50} นี้ยิ่งมีค่าน้อยจะยิ่งแสดงถึงความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอชได้ดี ลักษณะกราฟที่ได้แสดงดังตัวอย่างในรูปภาพที่ 3.9 โดยค่า IC_{50} ที่ได้ มาจากการคำนวณด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5



รูปภาพที่ 3.9 กราฟแสดงตัวอย่างการหาค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้นต่างๆและ %Inhibition

จากผลการทดลองและคำนวณพบว่า crude protein ทั้ง 2 สภาวะ คือ CP100 และ CP150 มีค่า IC_{50} คือ 904.8 และ 608.3 μg/mL ตามลำดับ โดย CP150 มีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลที่ดีกว่า อาจจะเนื่องมาจากการใช้อุณหภูมิลมร้อนขาเข้าที่มากกว่าทำให้เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด ซึ่งผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยานี้เกิดจากการทำปฏิกิริยากันระหว่างน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) กับเอไมด์ กรดอะมิโน เปปไทด์ โปรตีน หรือสารประกอบอื่นๆที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ แล้วเร่งปฏิกิริยาด้วยความร้อน ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนี้เอง มีความสามารถในการรีดิวซ์หรือให้อิเล็กตรอนได้[28] จึงเป็นเหตุผลให้อนุมูลอิสระดีพีพีเอชได้รับอิเล็กตรอนมากขึ้น ค่า IC_{50} ของ CP150 จึงน้อยกว่า CP100 เพราะจากผลการทดสอบด้วยวิธีเบเนดิกต์ สารตัวอย่างทั้ง 2

ชนิดมีน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งคู่ แต่ CP150 ใช้อุณหภูมิในการทำแห้งมากกว่า จึงอาจจะเกิดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดได้มากกว่า

การหาค่า IC_{50} ของโปรตีนไฮดีนไฮโดรไลเซตนั้นสามารถสรุปผลได้ดัง ตารางที่ 3.6 เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง crude protein และ ไฮโดรไลเซตโปรตีนจะพบว่า crude protein มีค่า IC_{50} สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตมาก เนื่องจาก crude protein ที่ได้นั้น ประกอบไปด้วยโปรตีนขนาดใหญ่ทำให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่จำเพาะ และกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์การต่อต้านอนุมูลอิสระถูกจำกัดพื้นที่อยู่บริเวณด้านในของโครงสร้างโปรตีน ทำให้แสดงฤทธิ์การทำงานได้ไม่ดี ในขณะที่โปรตีนไฮโดรไลเซตจะถูกทำลายโครงสร้างของโปรตีนให้คลายตัวมากขึ้น มีการตัดพันธะเปปไทด์มากขึ้น จึงเผยกรดอะมิโนซึ่งมีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระออกมาสู่ด้านนอกของโปรตีนมากขึ้น[28] โดยกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ เช่น cysteine และ methionine ที่มีธาตุซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ สามารถให้อิเล็กตรอนได้[29] histidine, tryptophan เป็นต้น ทำให้การทำงานของโปรตีนไฮโดรไลเซตในการกำจัดอนุมูลดีพีพีเอชมีมากขึ้น แต่เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มโปรตีนไฮโดรไลเซตเหมือนกัน จะพบว่า โปรตีนที่ใช้เวลาไฮโดรไลซิสนาน 24 ชั่วโมงมีค่า IC_{50} สูงที่สุด แสดงว่ามีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด เนื่องมาจากว่า การใช้เวลาไฮโดรไลซิสที่มากเกินไปจะทำให้ความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระต่ำลง[28] และเมื่อพิจารณาผลจากปฏิกิริยาการทดสอบเบเนดิกซ์แล้ว HD100/24h และ HD150/24h มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตตัวอื่นๆ จึงทำให้ผลการต่อต้านอนุมูลอิสระจากผลิตภัณฑ์ในปฏิกิริยาเมลลาร์ดมีผลน้อยกว่า แต่ก็ยังคงมีประสิทธิภาพดีกว่า crude protein

ตารางที่ 3.6 แสดงค่าความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยการกำจัดอุมูลอิสระดีพีพีเอชของโปรตีนที่สกัดได้ทั้ง 8 ชนิด

สาร	IC_{50} (µg/mL)
CP100	904.8
CP150	608.3
HD100/1h	375.1
HD100/6h	341.7
HD100/24h	401.1
HD150/1h	282.1
HD150/6h	273.5
HD150/24h	295.1

3.4.2 การทดสอบความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนตัวอย่างตามท้องตลาด

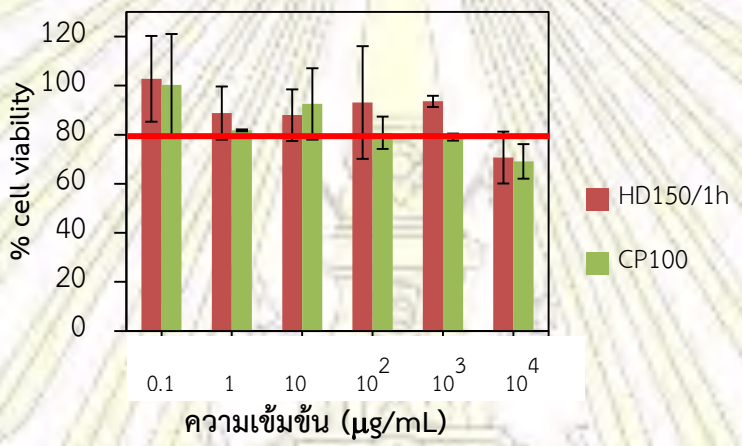
เพื่อทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนที่สกัดได้ทั้ง 8 ชนิด ได้ทำการเปรียบเทียบค่า IC_{50} จากการสุ่มโปรตีนที่มีขายตามท้องตลาด ทั้งที่เป็นโปรตีนสำหรับบริโภคและสำหรับเป็นสารผสมในเครื่องสำอาง มีทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ 1) Whey Protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่ได้จากนมวัว 2) Hydrolyzed Rice Protein เป็นโปรตีนที่ได้จากเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าว 3) Hydro Protein (Soy, Oat, Wheat, Maize Protein) ซึ่งเป็นโปรตีนผสมของธัญพืชชนิดต่างๆ 4) Hydrolyzed Milk (Casein) เป็นโปรตีนเคซีนที่อยู่ในนม 5) Protein Hydrolyzed Silk Protein (Sericin) เป็นโปรตีนจากไหมหรือชื่อว่าเซริซีน นอกจากนี้ยังทำการทดสอบหาค่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ Ascorbic acid หรือวิตามินซี ซึ่งจัดเป็นสารต้านอนุมูลที่มีประสิทธิภาพสูงและเป็นที่รู้จักอย่างมาก ได้ผลการทดลองดัง ตารางที่ 3.7 พบว่า โปรตีนไฮโดรเซตที่สกัดได้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าโปรตีนตามท้องตลาดทั้ง 5 ชนิด

ตารางที่ 3.7 แสดงค่าความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยการกำจัดอุมูลอิสระดีพีพีเอชของกรดแอสคอบิกและโปรตีนในท้องตลาดทั้ง 5 ชนิด

สาร	IC_{50} (μg/mL)
กรดแอสคอบิก	21.83
Whey protein	3,494
Hydrolyzed Rice Protein	1,148
Hydrolyzed Protein (Soy, Oat, Wheat, Maize Protein)	8,538
Hydrolyzed Silk Protein (Sericin)	10,622
Hydrolyzed Milk (Casein) Protein	15,103

3.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษของสารตัวอย่างต่อเซลล์ โดยใช้วิธี MTT assay เป็นการศึกษาการทำงานของเซลล์เมื่ออยู่ในสารละลายตัวอย่าง ว่ามีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดมากน้อยอย่างไร โดยปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตรอดจะส่งผลต่อความเข้มของสีม่วงจาก formazan โดยผลการทดลองแสดงดังรูปภาพที่ 3.10 จะเห็นว่าเซลล์ที่มีชีวิตรอดมีปริมาณค่อนข้างคงที่ในช่วงความเข้มข้น 0.1-1000 μg/mL และมีเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิต (% cell viability) 80-100% ซึ่งเป็นค่าการรอดชีวิตที่สูง โดยเซลล์ที่มีชีวิตรอดเริ่มลดลงเมื่อความเข้มข้นสูงถึง 10000 μg/mL และเมื่อเปรียบเทียบกับ CP150 จะพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตมีเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตที่สูงกว่า แสดงว่าโปรตีนตัวอย่าง HD150/1h มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ จึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านชีวภาพได้



รูปภาพที่ 3.10 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน HD150/1h และ CP100 ที่ความเข้มข้นต่างๆกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดชีวิตของเซลล์ปกติ L929

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ ศึกษาการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำข้าวสังข์หยด โดยการสกัดด้วยเบสแล้วตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย และมีเอนไซม์ปาเปนในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยในขั้นตอนการสกัดโปรตีนจากรำข้าวด้วยเบส พบว่าที่เวลา 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ให้ปริมาณโปรตีน 10,907 13,812 และ 14,727 μg/mL ตามลำดับ เนื่องจากที่ 2 และ 4 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนไม่ต่างกันมาก จึงเลือกเวลาการสกัดเบสที่ 2 ชั่วโมง

เมื่อนำ CP100 และ CP150 มาไฮโดรไลซ์ที่เวลา 1, 6 และ 24 ชั่วโมง จะได้ตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซต 6 ชนิด ได้แก่ HD100/1h, HD100/6h, HD100/24h, HD150/1h, HD150/6h และ HD150/24h พบว่า หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ 150 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่มากกว่า มีความชื้นน้อยกว่าและเก็บรักษาได้ง่ายกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ 100 องศาเซลเซียส นอกจากนี้เมื่อศึกษาสมบัติโปรตีนในด้านอื่นๆ พบว่า จาก SDS-PAGE การไฮโดรไลซิสนาน 24 ชั่วโมงทำให้โปรตีนมีขนาดเล็กลงมากกว่าที่ไฮโดรไลซิส 1 และ 6 ชั่วโมง นำโปรตีนที่สกัดได้ทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ CP100, CP150, HD100/1h, HD100/6h, HD100/24h, HD150/1h, HD150/6h และ HD150/24h มาพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ผลดังนี้ จากการหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี bicinchoninic acid (BCA) assay พบว่ามีปริมาณโปรตีน 0.33, 0.38, 0.41, 0.52, 0.43, 0.43, 0.47 และ 0.45 กรัมต่อกรัมสารตัวอย่าง ตามลำดับ จากการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลตามวิธีการ Folin Ciocalteu method พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลในโปรตีน ได้แก่ 41.82, 52.58, 46.43, 42.37, 43.91, 39.39, 44.14 และ 43.62 mg gallic acid equivalent (GAE)/g sample ตามลำดับ จากการทดสอบด้วยวิธีเบเนดิกซ์ พบว่า โปรตีนที่สกัดได้มีน้ำตาลรีดิวซ์เป็นส่วนประกอบ แต่ที่เวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิส 24 ชั่วโมงมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำที่สุด จากการทดสอบความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging activity) พบว่า มีค่า half inhibition concentration (IC_{50}) ดังนี้ 904.8, 608.3, 375.1, 341.7, 401.1, 282.1, 273.5 และ 295.1 μg/mL ตามลำดับ โดยฤทธิ์การต่อต้านอนุมูลอิสระคาดว่ามาจาก 2 ส่วน คือ การไฮโดรไลซิสโปรตีนเป็นการตัดพันธะเปปไทด์ทำให้โปรตีนมีความยาวที่สั้นลงและทำให้โครงสร้างโปรตีนเปลี่ยนแปลง กรดอะมิโนที่มี

ฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่เคยโดนบังอยู่ด้านในจึงออกมาสู่ข้างนอกโปรตีนทำให้มีฤทธิ์การทำงานดีขึ้น และอีกเหตุผลหนึ่ง คือ การทำให้แห้งด้วยความร้อนจะเกิดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ด ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเซตมีประสิทธิภาพการต่อต้านอนุมูลอิสระดีกว่า CP100 และ CP150

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำข้าวสังข์หยด คือ เวลาในการสกัดโปรตีน 2 ชั่วโมง เวลาในการไฮโดรไลซิส 1 ชั่วโมง และอุณหภูมิของการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย 150 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณโปรตีนสูง ฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระสูง และอายุการเก็บรักษาได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเซตตัวอื่น นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าโปรตีนจากท้องตลาดทั้ง 5 ชนิดอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย ผลผลิตข้าว. http://www.thairiceexporters.or.th/production.htm (accessed 12 Febuary 2016).
2. Sharif, M. K.; Butt, M. S.; Anjum, F. M.; Khan, S. H. Rice Bran: A Novel Functional Ingredient. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2014,** *54* (6), 807-816.
3. Food Allergy Research & Education. Milk Allergy. http://www.foodallergy.org/allergens/milk-allergy (accessed 10 February 2017).
4. Han, S. W.; Chee, K. M.; Cho, S. J. Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. *Food Chemistry* **2015,** *172*, 766-769.
5. Lai, T.; Lin, Z.; Zhang, R.; Guo, X.; Ma, Z.; Liao, W.; Ren, J.; Hu, X. Processing Stability of Antioxidant Protein Hydrolysates Extracted from Degreased Walnut Meal. *International Journal of Food Engineering* **2016,** *2*, 155-161.
6. Chang, C. H.; Lin, H. Y.; Chang, C. Y.; Liu, Y. C. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *Journal of Food Engineering* **2006,** *77* (3), 478-485.
7. Hernández, J. A.; Cortés, G. I.; Dávila, O. G.; Vioque, J.; Alaiz, M.; Girón, C. J.; Megías, C.; Jiménez, M. C. Influence of peptides–phenolics interaction on the antioxidant profile of protein hydrolysates from Brassica napus. *Food Chemistry* **2015,** *178*, 346-357.
8. Pham, H. L. A.; He, H.; Pham, H. C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science : IJBS* **2008,** *4* (2), 89-96.
9. Itharat, A.; Uttama, S.; Makchuchit, S. Anti-Inflammatory activities of constituents in Sang Yod Rice extracts, γ-Oryzanol, Vitamins E, B1, B2 and B3, using inhibitory effects on Nitric Oxide (NO) production in Lipopolysaccharide (LPS) activated RAW 264.7 Murine Macrophage Cells. *Med Aromat Plants* **2016,** *5*, 244.
10. สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ, การพัฒนาผลิตภัณฑ์คุกกี้ข้าวสังข์หยดเพื่อสุขภาพ. จากหนังสือ องค์ความรู้และนวัตกรรมด้านเกษตรอินทรีย์ ปี พ.ศ.*2552-2553*, 2554; หน้า 62.
11. Bunyasawat, J.; Bhoosem, C. Supplementation of Fiber in Macaron product with Sangyod Rice Bran.

https://repository.rmutp.ac.th/bitstream/handle/123456789/1287/HEC_56_31.pdf?sequence=1 (accessed 20 January 2017).

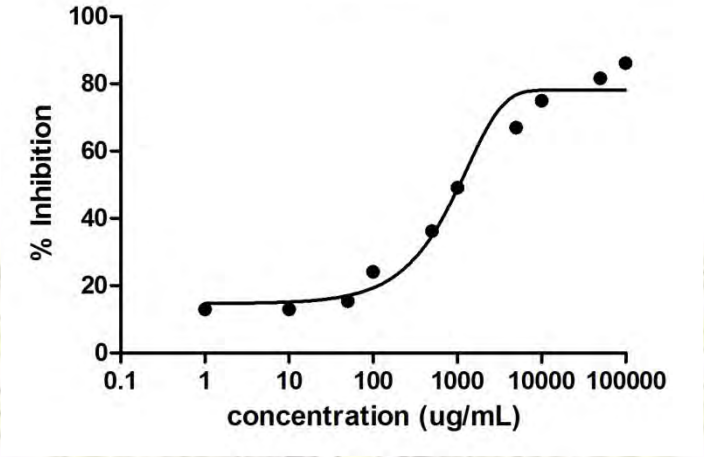
12. Rattanapiboon, N.; Jinda, N., Antioxidants in rice bran oil from Sangyod breeding rice and application in cream-gel. researchgate, 2012.
13. Theerakulkait, C.; Chaiseri, S.; Mongkolkanchanasiri, S. Extraction and Some Functional Properties of Protein Extract from Rice Bran. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* **2006,** *40*, 209 - 214.
14. Bandyopadhyay, K.; Misra, G.; Ghosh, S. Preparation and Characterisation of protein hydrolysates from Indian defatted rice bran meal. *Journal of Oleo Science* **2008,** *57* (1), 47-52.
15. Amza, T.; Balla, A.; Tounkara, F.; Man, L.; Zhou, H. M. Effect of hydrolysis time on nutritional, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from gingerbread plum (Neocarya macrophylla) seeds. *International Food Research Journal* **2013,** *20* (5), 2081-2090.
16. Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* **2010,** *4* (8), 118-126.
17. Wirasorn, K.; Klarod, K.; Hongsprabha, P.; Boonsiri, P. Oxidative Stress, Antioxidant and Cancer. *Srinagarind Med J* **2014,** *29*, 207-219.
18. Vermerris, W.; Nicholson, R. In *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer Science Business Media B.V: 2006; p 284.
19. Agbor, G. A.; Vinson, J. A.; Donnelly, P. E. Folin-Ciocalteau Reagent for Polyphenolic Assay. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics* **2014,** *3* (8), 147-156.
20. Sánchez, R. J. C.; Benavidesa, J.; Herediab, J. B.; Cisneros, Z. L.; Jacobo, V. D. A. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods* **2013,** *5*, 5990-5999.
21. Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005,** *53* (10), 4290-4302.
22. Brand, W. W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* **1995,** *28* (1), 25-30.

23. Thamnarathip, P.; Jangchud, K.; Nitisinprasert, S.; Vardhanabhuti, B. Identification of peptide molecular weight from rice bran protein hydrolysate with high antioxidant activity. *Journal of Cereal Science* **2016,** *69*, 329-335.
24. คณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี; คณะวิทยาศาสตร์; จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ตำราปฏิบัติการชีวเคมีเบื้องต้น. 2556; p 336.
25. Stanisavljević, N. S.; Vukotić, G. N.; Pastor, F. T.; Sužnjević, D.; Jovanović, Ž. S.; Strahinić, I. D.; Fira, Đ. A.; Radović, S. S. Antioxidant activity of pea protein hydrolysates produced by Batch fermentation with Lactic Acid Bacteria. *Arch. Biol. Sci.* **2015,** *67* (3), 1033-1042.
26. Lee, G., Spray-Drying of Proteins. In *Rational Design of Stable Protein Formulations: Theory and Practice*, Carpenter, J. F.; Manning, M. C., Eds. Springer US: Boston, MA, 2002; pp 135-158.
27. Aryal, S. Benedict's Test- Principle, Composition, Preparation, Procedure and Result Interpretation. http://www.microbiologyinfo.com/benedicts-test-principle-composition-preparation-procedure-and-result-interpretation/ (accessed 15 April 2017).
28. Elias, R. J.; Kellerby, S. S.; Decker, E. A. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2008,** *48* (5), 430-441.
29. Atmaca, G. Antioxidant Effects of Sulfur-Containing amino acids. *Yonsei Med J* **2004,** *45* (5), 776-788.

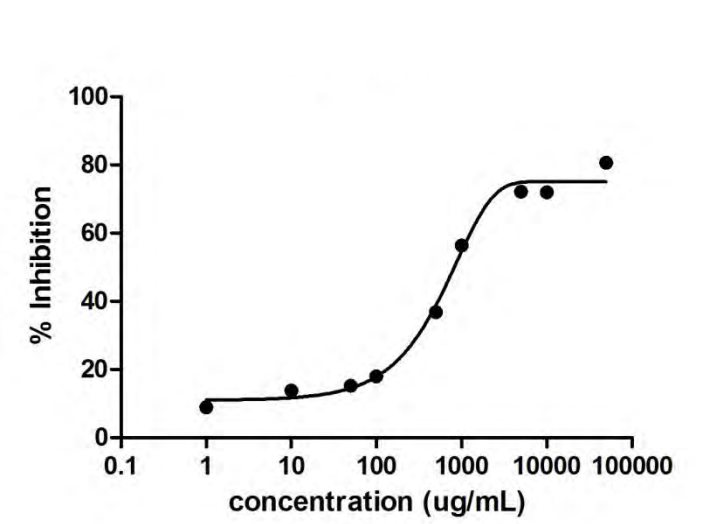
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

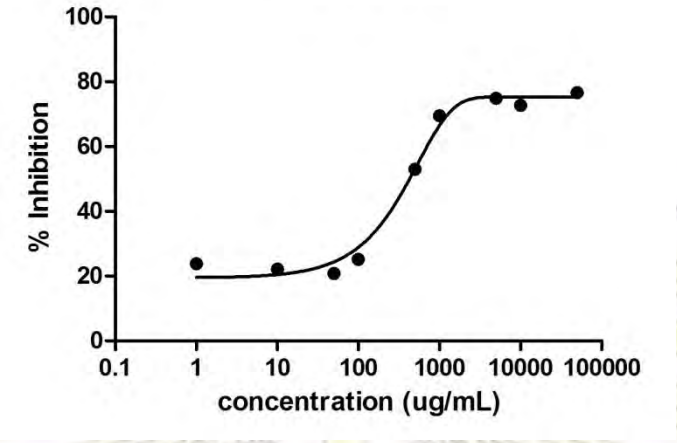
กราฟแสดงค่า IC_{50} ของโปรตีนที่สกัดได้



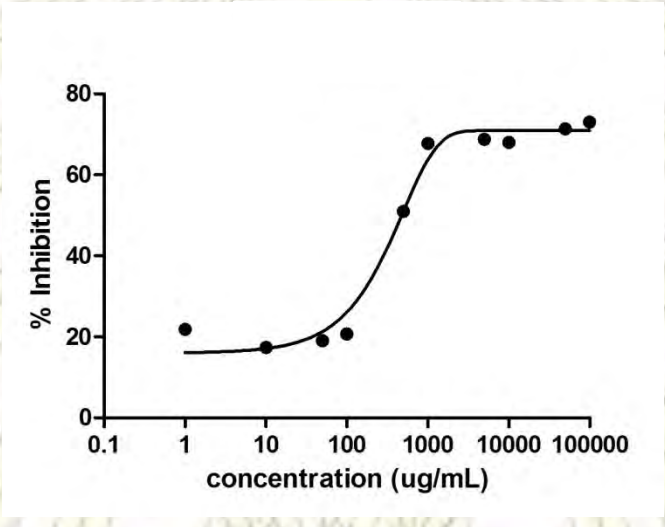
รูปภาพที่ ก-1 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ CP100



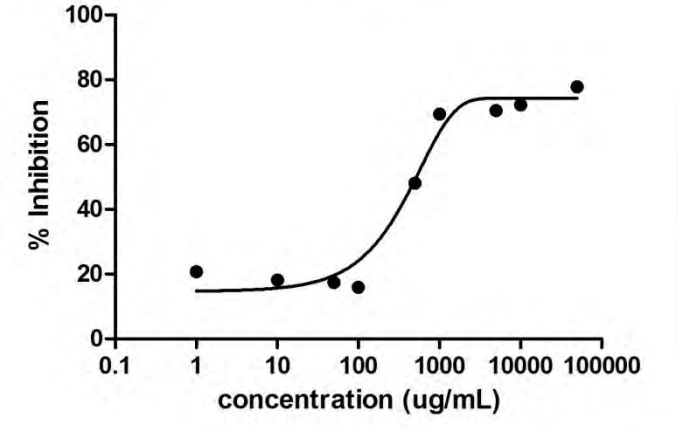
รูปภาพที่ ก-2 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ CP150



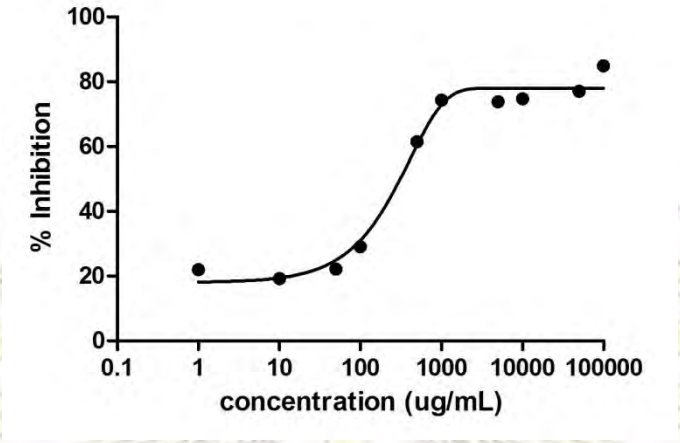
รูปภาพที่ ก-3 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ HD100/1h



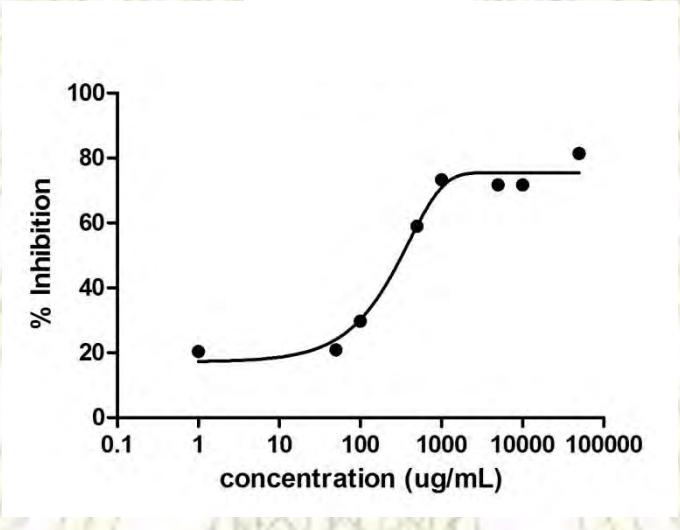
รูปภาพที่ ก-4 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ HD100/6h



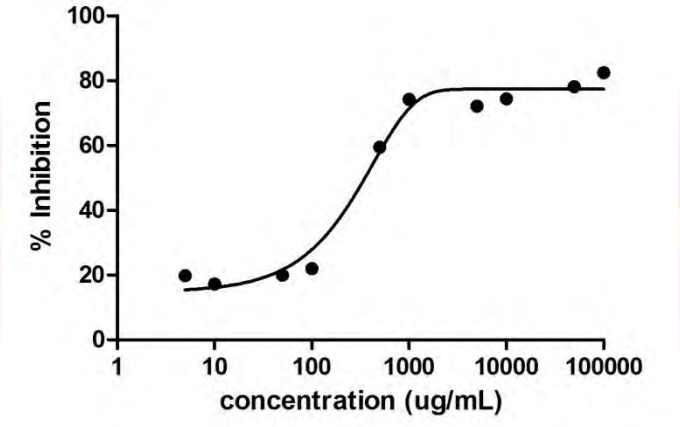
รูปภาพที่ ก-5 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ HD100/24h



รูปภาพที่ ก-6 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ HD150/1h



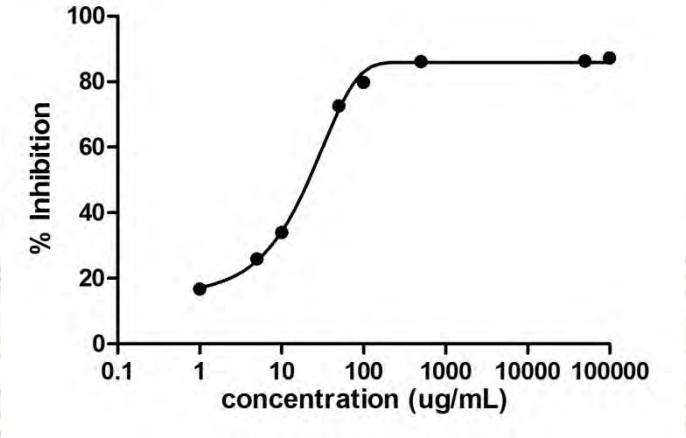
รูปภาพที่ ก-7 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ HD150/6h



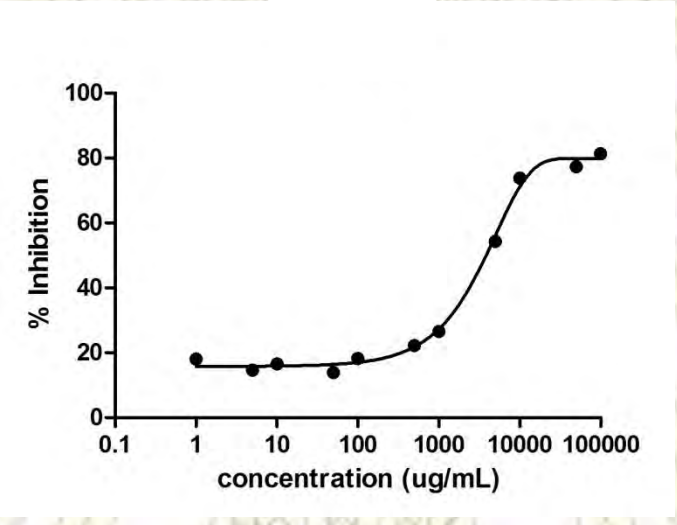
รูปภาพที่ ก-8 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ HD150/24h

ภาคผนวก ข

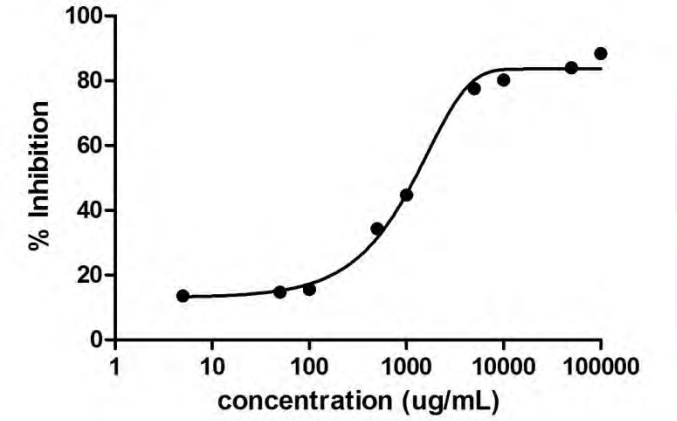
กราฟแสดงค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดแอสคอบิกและโปรตีนจากท้องตลาด



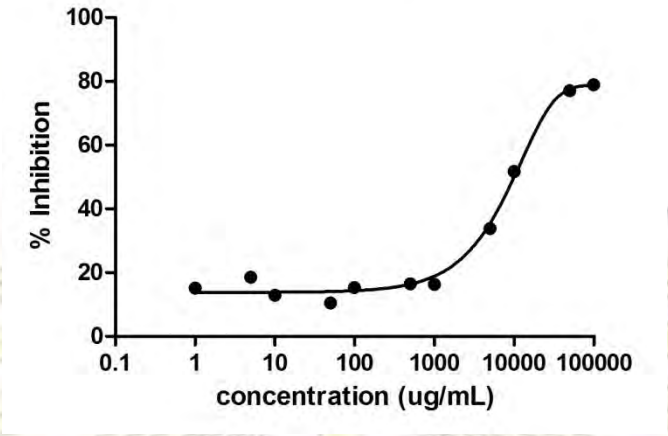
รูปภาพที่ ข-1 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของกรดแอสคอบิก (Ascorbic acid)



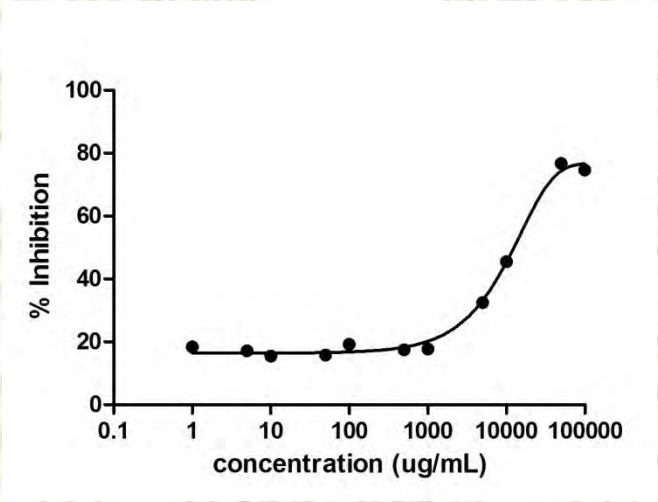
รูปภาพที่ ข-2 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ whey protein



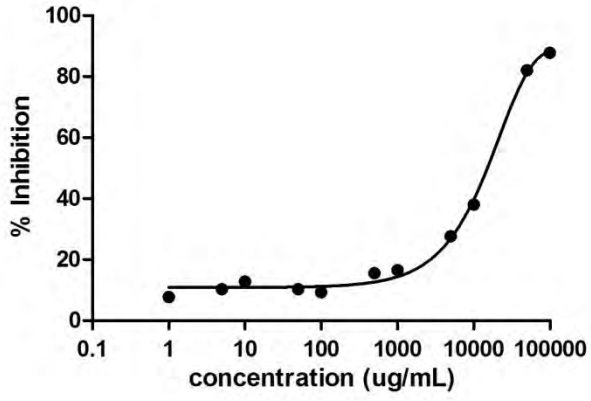
รูปภาพที่ ข-3 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ Hydrolyzed Rice Protein



รูปภาพที่ ข-4 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ Hydrolyzed Protein (Soy, Oat, Wheat, Maize Protein)



รูปภาพที่ ข-5 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ Hydrolyzed Silk Protein (Sericin)



รูปภาพที่ ข-6 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของ Hydrolyzed Milk (Casein) Protein

ประวัติผู้วิจัย

นางสาววรพิชชา ชมภูพื้น เกิดเมื่อวันที่ 22 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2537 ที่จังหวัดสระบุรี สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนสระบุรีวิทยาคม จังหวัดสระบุรี เมื่อปีการศึกษา 2555 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2556 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 50/2 หมู่ 8 ตำบลห้วยทราย อำเภอหนองแค จังหวัดสระบุรี รหัสไปรษณีย์ 18230 อีเมล vorapichcha@gmail.com