โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำข้าวสังข์หยดเพื่อการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริม
Extraction of protein hydrolysate from sangyod rice bran for supplementary food

ชื่อนิสิต นางสาวณัชชา ศรีเจริญ
ภาควิชา เคมี
ปีการศึกษา 2560

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำข้าวสังข์หยดเพื่อการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริม

Extraction of protein hydrolysate from sangyod rice bran for supplementary food

โดย

นางสาวณัชชา ศรีเจริญ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

โครงการ การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำข้าวสังข์หยดเพื่อการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริม

โดย นางสาวณัชชา ศรีเจริญ

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นวลพรรณ จันทรศิริ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เหมืองสิน)

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

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

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

วันที่ ..... เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2561

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ☑ ดีมาก ☐ ดี ☐ พอใช้

ชื่อโครงการ การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำข้าวสังข์หยดเพื่อการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริม
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวณัชชา ศรีเจริญ เลขประจำตัว 5733084223
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เหมืองสิน
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ ประไพรักษ์สิทธิ์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2560

บทคัดย่อ

รำข้าวเป็นของเสียจากกระบวนการสีข้าวซึ่งในรำข้าวนั้นมีปริมาณโปรตีนมากถึง 12 – 20% โดยข้าวสังข์หยดนั้นเป็นข้าว GI (Geographical Indications) ที่ปลูกในจังหวัดพัทลุง มีลักษณะเป็นสีม่วงแดง และมีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระและวิตามินที่สูง จึงทำให้งานวิจัยนี้สนใจในการนำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยดมาศึกษาในการทำเป็นอาหารเสริม โดยจะเตรียมโปรตีนสกัดจากรำข้าวสังข์หยดด้วยวิธีการสกัดด้วยเบสแล้วตกตะกอนด้วยกรดที่จุดไอโซอิเล็กทริก แล้วทำการไฮโดรไลซิสโปรตีนด้วยเอนไซม์ปาเปนที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำโปรตีนที่ได้ไปผสมกับโปรตีนตามท้องตลาดสองชนิดได้แก่ โปรตีนจากไข่ขาว และ เวย์โปรตีน ไอโซเลท เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนตามท้องตลาด โดยพบว่าการผสมโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยด 10% กับ เวย์โปรตีน ไอโซเลท เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด ที่ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงถึง 20.13 mg GAE / g sample และมีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่สูงโดยรายงานเป็นค่า IC_{50} เท่ากับ 271.1 µg/mL จึงทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมไฮน์โปรตีน นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนตามท้องตลาดทั่วไปอีก 6 ชนิด ดังนั้นไฮน์โปรตีนจึงเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนอีกหนึ่งทางเลือกที่ไม่เพียงแต่จะมีปริมาณโปรตีนที่สูงแต่ยังมีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่สูงอีกด้วยและยังเหมาะกับผู้ที่แพ้น้ำตาลแลคโตสและต้องการลดน้ำหนักเนื่องจากไฮน์โปรตีนนั้นไม่มีไขมันและไม่มีน้ำตาลแลคโตส

คำสำคัญ: รำข้าวสังข์หยด, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, โปรตีนไฮโดรไลเซต

Project Title Extraction of protein hydrolysate from sangyod rice bran for supplementary food
Student Name Miss Natcha Sricharoen Student ID 5733084223
Advisor Name Professor Nongnuj Muangsin, Ph.D.
Co-advisor Name Assistant Professor Narong Praphairaksi, Ph.D.
Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2017

Abstract

Rice bran is a massive waste from rice milling process with 12-20 % protein content, especially abundant in Sangyod rice bran. Sangyod is a GI rice (Geographical Indications) in Phatthalung province which has red-purple color, high antioxidant activity and high vitamins. In this research, rice bran protein hydrolysate (RBPH) from Sangyod rice bran has been studied for its potential as a supplementary food. RBPH was prepared by alkaline extraction followed by acidic precipitation at isoelectric point and hydrolysed by papain at pH 7.0 and at 37 ^{o}C. The RBPH from Sangyod rice bran was mixed with two commercially available protein supplements: albumin powder and whey protein Isolate. It was found that 10% of RBPH from Sangyod rice bran mixed with whey protein isolate was an optimal ratio containing a total phenolic content of 20.13 mg GAE/g sample and IC_{50} of 271.1 µg/mL, resulting in a commercial product called HEIN protein. Moreover, their antioxidant was higher than the other 6 proteins commercially available in the market. Therefore, HEIN protein is an alternative protein that not only has a high protein content but also high antioxidant activity. In addition, this product is suitable for people who are allergic to lactose or under weight control because the protein is fat free as well as lactose free.

Keywords: Sangyod rice bran, Antioxidant, Protein hydrolysate

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จและลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เหมืองสิน และรองศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ ประไพรักษ์สิทธิ์ ที่ให้คำปรึกษา และให้ข้อแนะนำเกี่ยวกับการทดลอง รวมถึงช่วยชี้แนะแนวทางในการแก้ไขปัญหา ตลอดการทดลอง

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นวลพรรณ จันทรศิริ และ รองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์ ในการให้ความอนุเคราะห์เป็นกรรมการประเมินโครงการวิจัยของข้าพเจ้าในครั้งนี้

ขอขอบคุณนางสาวอุฬาริกา ลือสกุล นิสิตปริญญาเอก และ พี่ ๆ นิสิตปริญญาโทและปริญญาเอกในกลุ่มวิจัยที่อยู่ในการดูแลของ ศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เหมืองสิน ที่คอยให้คำปรึกษา และช่วยเหลือตลอดมา

ขอขอบคุณ ชิดภิรมย์ ข้าวสังข์หยดพัทลุง ในการเอื้อเฟื้อรำข้าวสังข์หยดในการทดลองครั้งนี้

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยสำหรับทุนวิจัย (5,000 บาท) ในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ ประสบการณ์ และเทคนิคปฏิบัติการอันเป็นพื้นฐานในการทำงานวิจัยตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา และขอระลึกถึงกำลังใจและความช่วยเหลือจากครอบครัวและเพื่อน ๆ รวมถึงบุคคลที่ไม่ได้เอ่ยนามมา ณ ที่นี้ จนสามารถดำเนินงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญรูป	ญ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย	3
1.2.1 วัตถุประสงค์	3
1.2.2 ขอบเขตงานวิจัย	3
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
1.4 ทฤษฎีและความรู้ที่เกี่ยวข้อง	5
1.4.1 อนุมูลอิสระ (free radicals) และสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)	5
1.4.2 เอนไซม์ปาเปน	6
1.4.3 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล (Total Phenolic Content)	6
1.4.4 การหาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging activity)	8
1.4.5 เวย์ (Whey)	8
1.4.6 อัลบูมิน (Albimin)	9
1.4.7 โปรตีนไฮโดรไลเซต (Protein hydrolysate)	10
บทที่ 2 การทดลอง	11
2.1 สารเคมี	11
2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ	12
2.3 วิธีการทดลอง	13

2.3.1 การเตรียมรำข้าวสังข์หยด 13
2.3.2 การสกัดโปรตีนจากรำข้าวที่ผ่านการสกัดไขมันแล้วด้วยการสกัดด้วยเบสและตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก 13
2.3.3 การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ปาเปน 13
2.3.4 ตรวจสอบคุณสมบัติโปรตีนที่สกัดได้ 14
2.3.4.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร 14
2.3.4.2 การหาปริมาณโปรตีน และน้ำตาล 14
2.4 พัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนจากท้องตลาดโดยผสมโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยด 14
2.5 ตรวจสอบฤทธิ์ในการต่อต้านสารอนุมูลอิสระ 15
2.5.1 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล 15
2.5.2 การหาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging activity) 16
2.6 วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ 18
2.7 ออกแบบผลิตภัณฑ์ 18
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง 21
3.1 การสกัดโปรตีนจากรำข้าวด้วยวิธีการสกัดด้วยเบสและตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก 21
3.2 การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ปาเปน 22
3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีนที่สกัดได้ 23
3.3.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร 23
3.3.2 การหาปริมาณโปรตีน และน้ำตาล 25
3.4 พัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนจากท้องตลาดและตรวจสอบคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ 25
3.4.1 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล 25
3.4.2 การหาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระDPPH (DPPH radical scavenging activity) 28
3.5 ไฮน์โปรตีน (HEIN PROTEIN) 30

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง 33

เอกสารอ้างอิง 35

ภาคผนวก 39

ภาคผนวก ก รายงานผลการทดสอบปริมาณโปรตีน และค่าโภชนาการอื่น ๆ ในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำข้าวสังข์หยด 40

ภาคผนวก ข กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า %inhibition กับความเข้มข้นของสารตัวอย่างของโปรตีนชนิดต่าง ๆ 42

ประวัติผู้วิจัย 47

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารละลายที่ใช้เพื่อการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด 16

ตารางที่ 2.2 ปริมาณสารละลายที่ใช้เพื่อตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลาย อนุมูลอิสระDPPH 17

ตารางที่ 3.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนตัวอย่างและปริมาณสารประกอบฟีนอล 27

ตารางที่ 3.2 ความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของโปรตีน 29

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.1 โครงสร้างสารประกอบฟีนอล 7
รูปที่ 1.2 การเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนรอบวงแอโรมาติก 7
รูปที่ 1.3 การเกิดปฏิกิริยาของ DPPH Assay 8
รูปที่ 2.1 แผนภาพการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำข้าวสังข์หยด และการตรวจสอบสมบัติของโปรตีนที่สกัดได้ 19
รูปที่ 2.2 แผนภาพการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนตามท้องตลาด 20
รูปที่ 3.1 โครงสร้างกรดอะมิโน 21
รูปที่ 3.2 แผนภาพการเปลี่ยนแปลงประจุของกรดอะมิโนที่ pH ต่าง ๆ 21
รูปที่ 3.3 โครงสร้างกรดอะมิโน a) Tyrosine และ b) Tryptophan 23
รูปที่ 3.4 UV-Vis Spectra ของ a) crude protein และ b) Hydrolysate protein 24
รูปที่ 3.5 กราฟมาตรฐาน (Calibration curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร 26
รูปที่ 3.6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition กับ ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง 28
รูปที่ 3.7 รูปแบบผลิตภัณฑ์ไฮน์โปรตีน (HEIN PROTEIN) 30
รูปที่ 3.8 ฉลากผลิตภัณฑ์ไฮน์โปรตีน (HEIN PROTEIN) จากห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 31
รูปที่ 3.9 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของไฮน์โปรตีนกับผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนชนิดอื่น ๆ ตามท้องตลาด 32
รูปที่ ก-1 ผลการทดสอบปริมาณโปรตีน และ ปริมาณต่าง ๆ ในโปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยด 41
รูปที่ ข-1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition กับความเข้มข้นของ Albumin powder 43
รูปที่ ข-2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition กับความเข้มข้นของ hydrolysate protein (HD) จากรำข้าวสังข์หยด 43
รูปที่ ข-3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition กับความเข้มข้นของ whey protein isolate 44
รูปที่ ข-4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition กับความเข้มข้นของ 5% HD + albumin powder 44
รูปที่ ข-5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition กับความเข้มข้นของ 10% HD + albumin powder 45
รูปที่ ข-6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition กับความเข้มข้นของ 5% HD + whey protein Isolate 45

รูปที่ ข-7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition กับความเข้มข้นของ 10% HD + whey protein Isolate 46

รูปที่ ข-8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition กับความเข้มข้นของ Ascorbic acid 46

สัญลักษณ์และคำย่อ

mL	=	มิลลิลิตร
µL	=	ไมโครลิตร
N	=	นอร์มาลลิตี
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	=	มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกกรัมสารตัวอย่าง

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าว หรือ ชื่อทางวิทยาศาสตร์ Oryza sativa L. จัดเป็นพืชสายพันธุ์เดียวกันกับหญ้าที่มีความสำคัญต่อชีวิตความเป็นอยู่ของมนุษย์มาก โดยมีผู้คนมากกว่าครึ่งโลกที่บริโภคข้าวเป็นอาหารหลักรวมถึงประเทศไทยที่บริโภคข้าวเป็นอาหารหลักมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน โดยในปี 2556 – 2560 ความต้องการใช้ภายในประเทศเพื่อการบริโภค ทำเมล็ดพันธุ์ อาหารสัตว์และอุตสาหกรรมอื่น ๆ เพิ่มขึ้นจาก 15.63 ล้านตัน ข้าวเปลือกในปี 2556 เป็น 16.95 ล้านตันข้าวเปลือกในปี 2560 หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 2.09 ต่อปี นอกจากนี้ข้าวยังเป็นสินค้าส่งออกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทยอีกด้วย โดยในปี 2556–2560 ปริมาณและมูลค่าส่งออกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นร้อยละ 7.50 และร้อยละ 2.36 ต่อปี ตามลำดับ[1] เมื่อความต้องการข้าวของโลกสูงขึ้นจึงทำให้ในแต่ละปีมีปริมาณรำข้าวมากถึง 29.3 ล้านตันต่อปี โดยรำข้าวเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการขัดสีเมล็ดข้าวซึ่งมักจะถูกนำไปเป็นอาหารสัตว์หรือนำไปทิ้งเป็นของเสีย[2] ซึ่งแท้จริงแล้วรำข้าวนั้นมีประโยชน์และคุณค่าทางโภชนาการมากมาย นอกจากจะประกอบไปด้วย ไขมัน ใยอาหาร เถ้า วิตามินและเกลือแร่ต่าง ๆ แล้ว รำข้าวยังมีโปรตีนมากถึง 12-20% อีกด้วย[3] ซึ่งถ้าสามารถสกัดโปรตีนจากรำข้าวได้จะสามารถเพิ่มมูลค่าให้แก่รำข้าวได้อีก และยังเป็นการช่วยเหลือเกษตรกรอีกด้วย

ในปัจจุบันมีการสกัดโปรตีนทางเลือกจากแหล่งต่าง ๆ เพิ่มขึ้นมากมายเพื่อทดแทนการแพ้อาหารที่มีโปรตีนบางชนิด และเพื่อทดแทนโปรตีนจากสัตว์บางชนิดที่มีราคาแพงหรือมีจำกัด จึงทำให้โปรตีนจากพืชเริ่มเข้ามามีบทบาทมากขึ้น โดยเมื่อเปรียบเทียบโปรตีนจากรำข้าวกับโปรตีนจากสัตว์และจากพืชอื่น ๆ เช่น โปรตีนถั่วเหลือง พบว่าโปรตีนและกรดอะมิโนที่ได้จากรำข้าวมีคุณค่าทางโภชนาการมากกว่าโปรตีนถั่วเหลือง โปรตีนข้าว เวย์โปรตีน และ เคซีน[4]

การนำโปรตีนมาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด-เบส หรือ เอนไซม์ต่าง ๆ จะทำให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซต โดยโมเลกุลของโปรตีนจะถูกตัดพันธะให้มีขนาดเล็กลงซึ่งจะทำให้โปรตีนละลายและดูดซึมได้ดีขึ้น และยังช่วยลดการแพ้โปรตีนในอาหารได้อีกด้วย นอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเซตยังถูกใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารอีกมาก เช่น ซุป ขนมขบเคี้ยว รวมถึงผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ต่าง ๆ [5-6] และยังมีการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซตในการรักษาอีกด้วย[7] มีงานวิจัยอีกมากมายที่พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากพืชมีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ เช่น เปลือกถั่ววอลนัท[8] มะเขือเทศ[9] ผักกาดขาว[10] และข้าว[11] เป็นต้น

ถึงแม้ว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจะมีสมบัติที่ดีกว่าโปรตีนธรรมดามากมาย แต่ก็ควรระวังในกระบวนการไฮโดรไลซิสถ้าใช้เวลานานหรือทำหลายครั้งเกินไปอาจจะทำให้สูญเสียคุณค่าทางโภชนาการบางอย่างได้[12]

มีงานวิจัยพบว่าการที่ร่างกายมีอนุมูลอิสระ (Free radical) มากเกินไปจะส่งผลเสียต่อร่างกายโดยทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้มากมาย เช่น มะเร็ง โรคเรื้อรังชนิดต่างๆ โรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นต้น[13] ร่างกายจึงจำเป็นต้องผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ขึ้นมาเพื่อต่อต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย แต่บางครั้งร่างกายก็ไม่สามารถผลิตสารต้านอนุมูลอิสระได้เพียงพอ ดังนั้นจึงต้องรับประทานอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มเติมจากแหล่งอื่น ๆ เพื่อมาช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น

ข้าวสังข์หยด (Sangyod rice) เป็นข้าวที่ปลูกในพื้นที่จังหวัดพัทลุงมีลักษณะเป็นข้าวกล้องสีแดงม่วงที่ให้คุณค่าทางโภชนาการมากกว่าข้าวกล้องและข้าวซ้อมมือทั่วไป โดยประกอบไปด้วยแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) แกมมาโอไรซานอล (γ-Oryzanol) วิตามิน B1, B2, B3 (Niacin), B6 และแร่ธาตุสำคัญต่างๆ เช่น เหล็ก แคลเซียม ฟอสฟอรัส เป็นต้น และยังมีรงควัตถุที่เป็นองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารประกอบฟีนอลประเภทฟลาโวนอยด์ชนิดแอนโทไซยานิน ที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ และมีความสามารถในการรักษาอาการอักเสบ[14] จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระในข้าวมาจากกลุ่มสารประกอบฟีนอล (Phenolic acid derivatives) ที่พบได้มากในส่วนของรำข้าว และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับน้ำผลไม้พร้อมดื่มหรือน้ำชาเขียวยังพบว่ามีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเกือบ 100 เท่า[15] นอกจากนี้ข้าวสังข์หยดยังเป็นข้าวพันธุ์แรกของไทยที่ได้รับการขึ้นทะเบียนเป็นสินค้าบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ GI (Geographical Indications) ที่ผ่านระบบจัดการคุณภาพ GAP อีกด้วย[16] จึงทำให้ในปัจจุบันมีผู้ให้ความสนใจในการนำข้าวสังข์หยดมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มากขึ้น เช่น การนำข้าวสังข์หยดมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ขนมขบเคี้ยวและคุกกี้[17-18] การนำรำข้าวสังข์หยดใส่เป็นสารเติมแต่งสำหรับผลิตภัณฑ์มาการองเพื่อเพิ่มใยอาหาร[19] การสกัดน้ำมันจากรำข้าวสังข์หยดเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบในครีมหรือเจล[20] เป็นต้น แต่ยังไม่มีงานวิจัยที่นำรำข้าวสังข์หยดมาสกัดเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยวิธีสเปรย์ดราย (Spray Dried) และ ศึกษาฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนที่สกัดได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจการสกัดโปรตีนจากรำข้าวสังข์หยด และไฮโดรไลซิสโปรตีนที่สกัดได้ ด้วยเอนไซม์ปาเปนและทำให้แห้งเป็นผงโปรตีนด้วยวิธีสเปรย์ดราย เพื่อให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีปริมาณโปรตีนและมีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่สูงเพื่อสามารถนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนได้

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย

1.2.1 วัตถุประสงค์

สามารถสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำข้าวสังข์หยดที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระสูงเพื่อนำไปพัฒนาอาหารเสริมโปรตีนตามท้องตลาด และ เพิ่มมูลค่าให้กับรำข้าวสังข์หยดได้

1.2.2 ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการสกัดโปรตีนจากรำข้าวสังข์หยดโดยจะสกัดไขมันออกจากรำข้าวก่อนโดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซนในอัตราส่วนรำข้าวต่อเฮกเซน 1 : 3 หลังจากนั้นจะทำการสกัดโปรตีนด้วยเทคนิค alkaline extraction โดยใช้สารละลาย NaOH สกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50-55 ^{O}C แล้วตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริกด้วยสารละลาย HCl จะได้โปรตีนสกัดจากรำข้าวสังข์หยด (Crude protein) แล้วทำการไฮโดรไลซ์โปรตีนที่ได้ด้วยเอนไซม์ปาเปนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยด (Hydrolysate protein) โดยจะทำให้โปรตีนแห้งเป็นผงด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอยด้วยเครื่อง Mini Spray Dryer B-290 ที่อุณหภูมิ 150 ^{O}C จากนั้นจะทำการศึกษาและเปรียบเทียบสมบัติการผสมกันของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยดกับอาหารเสริมโปรตีนตามท้องตลาดสองชนิด ได้แก่ โปรตีนไข่ขาวผง และ เวย์โปรตีนไอโซเลท เพื่อแปรรูปและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีน และเพิ่มมูลค่าให้กับรำข้าวสังข์หยด โดยจะเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพ สมบัติการละลาย และ ทำการทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนที่พัฒนาขึ้นโดยการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลด้วยเทคนิค UV-vis spectroscopy และการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging activity)

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 2006 Theerakulkait และคณะ[21] ทำการสกัดโปรตีนจากรำข้าวโดยศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีน ได้แก่ การนำรำข้าวที่ผ่านการสกัดไขมันแล้วมาใช้งาน เวลาในการสกัดโปรตีน และความเร็วของเครื่องกวนสาร โดยพบว่ารำข้าวที่ผ่านการสกัดไขมันออกแล้วจะให้ปริมาณโปรตีนที่มากกว่ารำข้าวที่ไม่ผ่านการสกัดไขมัน โดยปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงเวลาการสกัด 10 – 45 นาที และพบว่าความเร็วของเครื่องกวนสารที่ 500 rpm เป็นความเร็วที่น้อยที่สุดที่จะให้ประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนได้ดีที่สุด

ในปี ค.ศ. 2008 Ghosh และคณะ[22] ทำการศึกษาการสกัดโปรตีนในรำข้าวจากประเทศอินเดีย และนำมาไฮโดรไลซิสด้วยเอมไซม์ปาเปนที่ได้จากมะละกอ โดยจะเริ่มจากการนำรำข้าวมากรองผ่านตะแกรงขนาด 80 mesh เพื่อศึกษาว่าการกรองมีผลต่อการสกัดหรือไม่ แล้วทำการสกัดโปรตีนด้วยเทคนิค alkaline extraction จากนั้นทำการตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริกที่ pH 4.0 โดยพบว่ารำข้าวที่ผ่านการกรองด้วยตะแกรงจะให้ปริมาณโปรตีนที่มากกว่า และยังพบว่าโปรตีนที่ผ่านการไฮโดรไลซิสนั้นมีคุณสมบัติที่ดีกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลซิสอีกด้วย

ในปี ค.ศ. 2013 Zhou และคณะ[23] ทำการศึกษาผลของเวลาในการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis time) โปรตีนที่สกัดจากเมล็ด Neocarya macrophylla โดยใช้เอนไซม์เปปซินในการไฮโดรไลซิสก่อนแล้วตามด้วยเอนไซม์ทริปซิน โดยทำการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและคุณค่าทางอาหารของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เวลา 5 ถึง 180 นาที พบว่าเมื่อเวลาในการไฮโดรไลซิสเพิ่มขึ้น โปรตีนจะมีคุณสมบัติทางกายภาพลดลงแต่จะมีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น และยังพบว่าเมื่อใช้เวลาในการไฮโดรไลซิสเพิ่มขึ้นจะทำให้พันธะเปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก (500-3000 Da) เพิ่มมากขึ้นอีกด้วย

ในปี ค.ศ. 2015 Cho และคณะ[4] ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการในโปรตีนจากรำข้าว กับ โปรตีนจากพืชอื่น ๆ และโปรตีนจากสัตว์ เนื่องจากโปรตีนจากสัตว์มีราคาแพง และ มีอย่างจำกัด จึงทำให้ผู้วิจัยนั้นสนใจที่จะนำโปรตีนจากรำข้าวมาใช้ทดแทนโปรตีนจากสัตว์ โดยพบว่าโปรตีนจากรำข้าวมีคุณค่าทางโภชการที่สูงเมื่อเทียบกับ โปรตีนถั่วเหลือง โปรตีนข้าว (ในส่วนที่เป็นเอนโดสเปิร์ม) เวย์โปรตีน และเคซีน

เนื่องจากข้าวสังข์หยดเป็นข้าวกล้อง สีแดง-ม่วง ที่มีคุณค่าทางอาหารสูง ประกอบไปด้วย แอนโทไซยานิน (Anthocyanin) แกมมาโอไรซานอล (γ-Oryzanol) วิตามิน B1 B2 B3 (Niacin) B6 และแร่ธาตุสำคัญ เช่น เหล็ก แคลเซียม ฟอสฟอรัส เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่สูง จึงทำให้มีผู้คนสนใจในการนำรำข้าวสังข์หยดไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่รำข้าว และ เป็นการนำผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลพลอยได้ที่เกิดจากกระบวนการสีข้าวมาทำให้เกิดประโยชน์

ในปี ค.ศ. 2013 Bunyasawat และ Bhoosem[19] ได้นำรำข้าวสังข์หยดมาเป็นสารเติมแต่งในผลิตภัณฑ์มาการองในอัตราส่วนร้อยละ 5, 10 และ 15 จากนั้นทดสอบคุณค่าทางโภชนาการพบว่าในด้านของรสชาติผู้ชิมให้ความยอมรับทั้ง 3 สูตร และเมื่อเพิ่มปริมาณรำข้าวมากขึ้นพบว่ามีคุณค่าทางโภชนาการเพิ่มขึ้นทั้งปริมาณพลังงาน โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรตและใยอาหาร

ในปี ค.ศ. 2016 ltharat และ คณะ[14] ทำการสกัดสารจากรำข้าวสังข์หยดเพื่อทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้านการอักเสบรวมถึงหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในรำข้าวสังข์หยด โดยพบว่าสารที่สกัดจากรำข้าวสังข์หยด

ด้วยเอทานอล 95% สามารถยับยั้งผลของ NO production ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบได้สูงที่สุด จึงทำให้เหมาะแก่การนำมารักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยสารสกัดนี้มีแกมมาโอไรซานอล และวิตามินอีในปริมาณที่สูง และยังพบอีกว่าในรำข้าวนั้นมีปริมาณของแกมมาโอโรซานอลมากกว่าจากข้าวสังข์หยดทั้งเมล็ดอีกด้วย นอกจากนี้การสกัดสารจากรำข้าวสังข์หยดด้วยน้ำเดือดจะมีปริมาณวิตามิน B1 และ วิตามิน B2 ในปริมาณที่สูงอีกด้วย

ในปี ค.ศ. 2016 Chompupuen [24] ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำข้าวสังข์หยด และฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนที่สกัดได้ โดยใช้วิธีการสกัดเบสและตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก แล้วทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ปาเปน โดยทำการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการสกัด ได้แก่ เวลาในการสกัดโปรตีน เวลาในการทำไฮโดรไลซิส และอุณหภูมิของการทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยจากการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสม คือ เวลาในการสกัดโปรตีน 2 ชั่วโมง เวลาในการไฮโดรไลซิส 1 ชั่วโมง และอุณหภูมิของการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่ 150 องศาเซลเซียส ซึ่งสภาวะดังกล่าวจะให้ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้สูงสุด และยังให้ฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่สูงอีกด้วย และยังพบว่าโปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยดนั้นไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ นอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยดยังมีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระมากกว่าโปรตีนจากท้องตลาดที่นำมาทดสอบอีก 5 ชนิด อีกด้วย

ในปี ค.ศ. 2017 Phantuwong และ คณะ[25] ได้ทำการศึกษาผลของการไฮโดรไลซิสรำข้าวสังข์หยดด้วยเอมไซน์ ที่ส่งผลต่อปริมาณบีตา-กลูแคน (β-Glucan) และ โปรตีน โดยพบว่าการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (Amyloglucosidase) แล้วตามด้วยเอนไซม์โปรตีเอส (Protease) ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5%v/w ทั้งสองชนิดที่ 60 นาที เป็นกระบวนการที่จะให้ปริมาณบีตา-กลูแคน และ โปรตีนมากที่สุด นอกจากนี้ยังให้คุณสมบัติในการต้านการอักเสบที่ดีอีกด้วย จึงทำให้เหมาะแก่การนำไปเป็นส่วนผสมในอาหารที่มีประโยชน์

1.4 ทฤษฎีและความรู้ที่เกี่ยวข้อง

1.4.1 อนุมูลอิสระ (Free radicals) และสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

อนุมูลอิสระ (Free radicals) คือ โมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอก ทำให้เกิดความไม่เสถียร และว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาซึ่งอาจเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่กับสารหรือโมเลกุลที่อยู่ในบริเวณข้างเคียงได้ ดังนั้นเมื่อเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายโมเลกุลต่าง ๆ เช่นเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ดีเอ็นเอ (DNA) ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) เป็นต้น จะถูกทำลาย โดยอนุมูลอิสระจะแย่งอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่น ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์และทำลายเซลล์ร่างกาย[26]

โดยเซลล์จะทำงานผิดปกติจนเกิดเป็นความเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ซึ่งเป็นภาวะที่ร่างกายไม่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระจำนวนมากที่เกิดขึ้นได้ โดยปกตินั้นร่างกายจะมีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระแต่อาจมีปัจจัยอื่น ๆ ที่ทำให้ร่างกายมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระลดลง ทำให้ร่างกายมีอนุมูลอิสระสะสมในปริมาณที่มาก จึงทำให้สามารถเกิดโรคต่าง ๆ ตามมาได้ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคเกี่ยวกับไขข้อ โรคเรื้อรังชนิดต่าง ๆ และการแก่ก่อนวัยอันควร เป็นต้น[13,27]

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) คือ โมเลกุลที่มีความเสถียรเพียงพอที่สามารถให้อิเล็กตรอนไปยังอนุมูลอิสระ เพื่อยุติปฏิกิริยาลูกโซ่ ลดการทำลายเซลล์ในร่างกาย ปกป้องเซลล์จากความเป็นพิษ และป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดนั้นร่างกายสามารถสร้างเองได้ แต่บางชนิดไม่สามารถสร้างเองได้จึงต้องรับประทานอาหารหรือผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เพิ่มเติม โดยสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม[13]

1) กลุ่มที่เป็นเอนไซม์ (Enzymatic antioxidants) เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) และ glutathione reductase เป็นต้น
2) กลุ่มที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Nonenzymatic antioxidants) เช่น glutathione, coenzyme Q10, Metal-chelating proteins, Vitamin E, Vitamin C, Carotenoid และ Flavonoids เป็นต้น

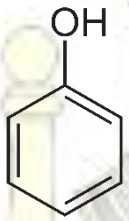
1.4.2 เอนไซม์ปาเปน

ปาเปน (Papain) เป็น cysteine protease ที่พบได้ในยางมะละกอ *(Carica papaya L.)* จัดเป็นเอนไซม์ธรรมชาติที่มีมวลโมเลกุล 23,406 ดาลตัน โดยสามารถย่อยโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ให้เล็กลงได้ ซึ่งมีช่วงการทำงานในสภาวะที่หลากหลาย และมีช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง pH 3.0 - 9.0 แต่เอนไซม์จะเกิดการเสียสภาพได้เมื่อมีอุณหภูมิสูงเกิน 80 องศา หรือ อยู่ในสภาวะที่ตัวทำละลายมีความเข้มข้นสูงเกินไป [28]

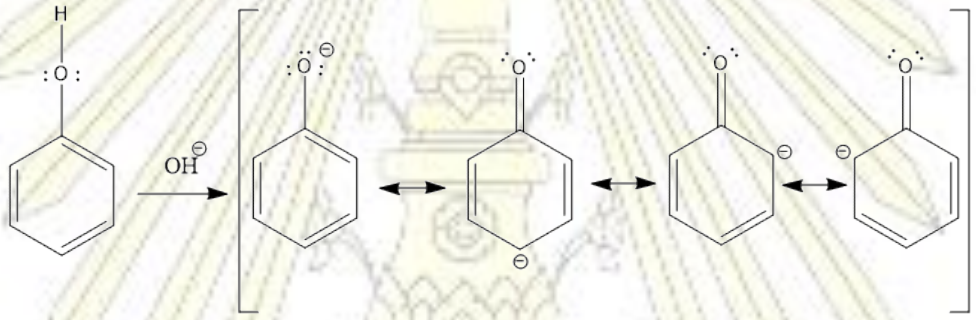
1.4.3 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล (Total Phenolic Content)

สารประกอบฟีนอล มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่เป็นอนุพันธ์ของวงแหวนเบนซีน และมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) อย่างน้อยหนึ่งหมู่ต่ออยู่ โดยสารประกอบฟีนอลพื้นฐาน คือ สารฟีนอล (Phenol) ดังรูปที่ 1.1 ซึ่งหมู่เกาะและจำนวนวงแอโรมาติกมีความหลากหลายตั้งแต่ขนาดเล็กไปจนถึงขนาดใหญ่ โดยสารประกอบฟีนอลมีสมบัติเป็นกรดอ่อนเนื่องจากวงแอโรมาติกจะทำให้

หมู่ไฮดรอกซิลนี้มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยจะให้โปรตอน (H^+) ได้ดังรูปที่ 1.2 ซึ่งสารประกอบนี้สามารถเกิดการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนได้ทั่วงแอโรมาติก ทำให้สารประกอบนี้มีความเสถียรโดยแอนไอออนที่เกิดขึ้น เรียกว่า ฟีโนเลตแอนไอออน เป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ [29] และเนื่องจากความสามารถในการให้โปรตอนได้นั้นจึงทำให้สารประกอบฟีนอลมีความสามารถในการเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)



รูปที่ 1.1 โครงสร้างสารประกอบฟีนอล



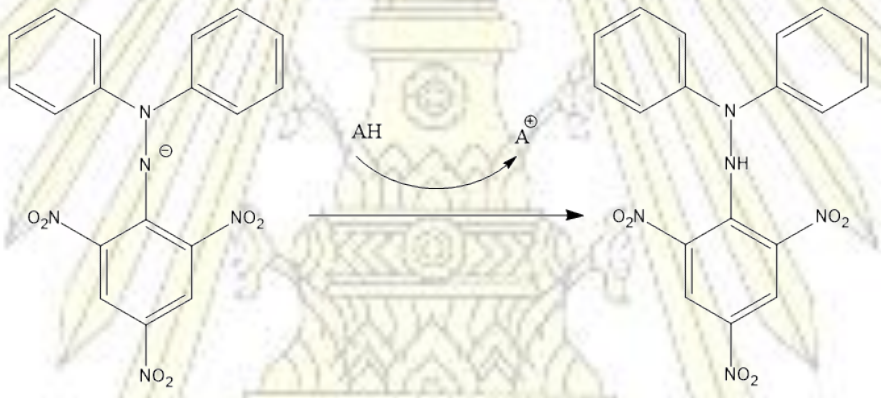
รูปที่ 1.2 การเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนรอบวงแอโรมาติก

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลสามารถทำได้โดยวิธีการ Folin - Ciocalteu assay [30] ซึ่งใช้รีเอเจนต์ Folin – Ciocalteu phenol โดยรีเอเจนต์นี้เป็นสารผสมที่ประกอบด้วย heteropoly acids, phosphomolybdic และ phosphotungstic acids ซึ่งจัดเป็นสารที่มีความเสถียร ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างรีเอเจนต์ Folin - Ciocalteau phenol กับสารประกอบ polyphenol ในผลิตภัณฑ์ จัดเป็นปฏิกิริยารีดอกซ์ โดย molybdenum และ tungsten มีเลขออกซิเดชัน (Oxidation State) เป็น +6 ทั้งคู่ ซึ่งสารละลายนี้จะมีสีเหลือง และเมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้ทั้งmolybdenum และ tungsten จะมีเลขออกซิเดชันอยู่ระหว่าง +5 และ +6 โดยสารนี้จะมีสีน้ำเงิน เมื่อนำสารละลายที่เกิดขึ้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร แล้วเทียบกับสารละลายมาตรฐาน จะสามารถคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลได้ โดยสารมาตรฐานที่นิยมใช้ คือ กรดแกลลิก (Gallic acid) และในการทำปฏิกิริยานั้นจะทำที่สภาวะเบส โดย

จะเติมสารละลาย โซเดียมคาร์บอเนตเพื่อให้สารประกอบโพลีฟีนอลเกิดการเสียโปรตอนเป็นฟีโนเลตแอนไอออน ซึ่ง แอนไอออนตัวนี้จะทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ [31]

1.4.4 การหาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging activity)

DPPH หรือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็นอนุมูลอิสระที่มีความเสถียรสูง ในสารละลายจะให้สีม่วงเข้มที่สังเกตง่าย (λ_{max} = 515 - 517 นาโนเมตร) ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้มาก เนื่องจากใช้งานง่ายเพียงละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสมก็สามารถใช้งานได้เลย ใช้เวลาไม่นานในการวิเคราะห์และใช้อุปกรณ์น้อย หลักการของการทดสอบด้วย DPPH คือ เป็นการศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ที่มีอยู่ในสารละลาย โดย DPPH ที่ลดลง สามารถวัดได้จากเทคนิคการตรวจวิเคราะห์โดยทำให้เกิดสีที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เพราะเมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ได้รับโปรตอนหรืออิเล็กตรอนจากสารใด ๆ (เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ) สารละลายจะเปลี่ยนไปเป็นสีเหลือง ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง [32,33]



รูปที่ 1.3 การเกิดปฏิกิริยาของ DPPH Assay[32,33]

1.4.5 เวย์ (Whey)

เวย์ (Whey) เป็นโปรตีนในน้ำนม (Milk) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพสูง ร่างกายสามารถย่อยและดูดซึมไปใช้ได้ง่ายและรวดเร็ว มีกรดแอมิโนที่จำเป็น (Essential amino acid) อยู่ครบ และมีกรดแอมิโนชนิด branched-chain amino acid (BCAA) ได้แก่ leucine, isoleucine และ valine นอกจากนี้ยังเป็นโปรตีนที่มีส่วนสำคัญในการเสริมสร้างกล้ามเนื้อ ซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ หรือ สร้างเนื้อเยื่อเพิ่มเติม โดยเวย์โปรตีนที่ผ่านกรรมวิธีแล้วจะมีหลายชนิด ซึ่งจะมีปริมาณองค์ประกอบของโปรตีนและคุณค่าทางโภชนาการที่แตกต่างกันไป แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ดังนี้ [34]

1) Whey protein concentrate (WPC)

ปริมาณโปรตีนที่อยู่ใน Whey protein concentrate อยู่ที่ประมาณร้อยละ 25 – 89 ซึ่งส่วนใหญ่จะประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 80 เป็นผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่พบในท้องตลาด เวย์โปรตีนชนิดนี้มีน้ำตาลแลคโตสค่อนข้างมาก (ร้อยละ 4 - 8) จึงอาจไม่เหมาะกับผู้ที่ขาดเอนไซม์แลคเตส (Lactase) ในการย่อยน้ำตาลแลคโตส

2) Whey protein isolate (WPI)

ประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 90 – 95 ซึ่งเป็นแหล่งที่ดีมากของโปรตีนรวมทั้งสำหรับผู้ที่แพ้น้ำตาลแลคโตสเพราะเวย์โปรตีนชนิดนี้มีแลคโตสในปริมาณที่น้อยมาก เวย์โปรตีนชนิดนี้มีราคาแพงเพราะมีความบริสุทธิ์สูงและมีปริมาณโปรตีนอยู่ค่อนข้างมาก

3) Hydrolyzed whey protein

เวย์โปรตีนชนิดนี้สายของโปรตีนขนาดยาวจะถูกย่อยให้เป็นสายเปปไทด์ขนาดสั้น ๆ ทำให้ดูดซึมได้ง่าย ลดโอกาสในการแพ้ มักใช้สำหรับทารก นักกีฬา และในทางการแพทย์ โดยการย่อยโปรตีนให้เป็นสายเปปไทด์สั้น ๆ นั้นไม่มีผลต่อคุณค่าทางโภชนาการของเวย์โปรตีน แต่ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบมีความแปรผันสูง และมีราคาแพง

1.4.6 อัลบูมิน (Albimin)

อัลบูมิน เป็น โปรตีนที่ทำหน้าที่ในการสร้างเม็ดเลือดและซ่อมแซมส่วนต่าง ๆ ของร่างกายให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น โดยแอลบูมินนั้น มีประมาน 50% ของโปรตีนที่พบในเลือดเลยทีเดียว นอกจากนี้ยังสามารถเสริมสร้างความแข็งแรงให้กับร่างกายเพื่อต่อต้านการติดเชื้อต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี ซึ่งอัลบูมินถูกสร้างขึ้นมาจากกรดอะมิโนที่ตับ ดังนั้นหากร่างกายได้รับกรดอะมิโนน้อยเกินไปหรือได้รับพลังงานจากอาหารไม่เพียงพอก็จะทำให้ระดับของอัลบูมินลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งก็เป็นผลให้ภูมิต้านทานต่ำ และเสี่ยงต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนง่ายขึ้นอีกด้วย โดยอัลบูมินพบในไข่ขาวอยู่มากถึง 50% ซึ่งเป็นแหล่งที่พบอัลบูมินมากที่สุด ดังนั้นไข่ขาวจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้ที่ต้องการเสริมสร้างโปรตีน เพราะนอกจากจะได้โปรตีนแล้วยังมีกรดอะมิโนอีกมากมายที่ให้ประโยชน์ในไข่ขาวอีกด้วย เช่น ไลซีน (Lysine) ซึ่งช่วยในการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันและสร้างเอมไซม์ต่าง ๆ ฮิสทิดีน (Histidine) ซึ่งช่วยเสริมการทำงานของระบบประสาทให้ดียิ่งขึ้น และลิวซีน (Leucine) ซึ่งช่วยกระตุ้นการหลั่ง Growth Hormone และช่วยให้การทำงานของสมองมีประสิทธิภาพมากกว่าเดิม เป็นต้น[35,36,37]

1.4.7 โปรตีนไฮโดรไลเซต (Protein hydrolysate)

โปรตีนไฮโดรไลเซต คือ ผลิตผลของโปรตีนที่ได้จากการไฮโดรไลซิสโปรตีนด้วยเอนไซม์ หรือกรด-เบส โดยโมเลกุลของโปรตีนจะถูกตัดพันธะให้มีขนาดเล็กลงเป็นเพปไทด์ หรือกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งจะทำให้ดูดซึมได้เร็วขึ้นและยังลดการแพ้จากโปรตีนในอาหารนั้น ๆ อีกด้วย [38]

บทที่ 2
การทดลอง

2.1 สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
3. เฮกเซน (C_6H_{14})
4. เอทานอล (C_2H_6O)
5. เอนไซม์ปาเปน (Papain enzyme)
6. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)
7. กรดแอสคอบิก (Ascobic acid)
8. โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
9. ไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)
10. Folin & Ciocalteu's phenol
11. กรดแกลลิก ($C_7H_6O_5$)
12. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
13. รำข้าวสังข์หยด
14. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนจากท้องตลาด
    - Whey protein isolate
    - Albumin powder

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. กระดาษวัดค่าพีเอช (pH indicator strips)
15. Mini Spray Dryer B-290 บริษัท BUCHI
16. Microplate readers บริษัท Biotek จำกัด รุ่น Powerwave XS2
17. Hot plate

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การเตรียมรำข้าวสังข์หยด

การสกัดโปรตีนจากรำข้าวสังข์หยดด้วยการสกัดเบสแล้วตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริกตามวิธีการสกัดของ Ghosh และคณะ[22] โดยใช้สภาวะในการสกัดตาม Chompupuen [24] โดยเริ่มจากการนำรำข้าวสังข์หยดมาร่อนผ่านตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร เพื่อให้ได้รำข้าวละเอียด และแยกดิน หรือ กรวดทราย ต่าง ๆ ที่ติดมาจากโรงสีออกจากรำข้าว จากนั้นทำการสกัดไขมันออกจากรำข้าวด้วยตัวทำละลายเฮกเซนในอัตราส่วนรำข้าว ต่อ เฮกเซน 1 ต่อ 3 คนสารผสมทิ้งไว้เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วทำการแยกตัวทำละลายออกจากรำข้าว ผึ่งรำข้าวที่ถูกสกัดไขมันออกแล้วบนถาดอลูมิเนียมที่อุณหภูมิห้องและทิ้งไว้ข้ามคืน เก็บรำข้าวที่แห้งแล้วในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้แน่น เก็บในที่มืดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

2.3.2 การสกัดโปรตีนจากรำข้าวที่ผ่านการสกัดไขมันแล้วด้วยการสกัดด้วยเบสและตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก

ทำการผสมรำข้าวสังข์หยดที่ผ่านการสกัดไขมันแล้วกับน้ำ DI (Deionized water) ในอัตราส่วนรำข้าว ต่อ น้ำ DI 1 ต่อ 4 แล้วปรับสารผสมให้มี pH 10 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 5 N จากนั้นคนสารผสมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 - 55 องศาเซลเซียส แล้วนำมากรองผ่านผ้าไนล่อน และนำสารละลายมาปรับให้ได้ pH 4.0 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก (HCl) 2 N คนสารผสมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 - 55 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายที่มีตะกอนโปรตีนมาทำให้แห้งโดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอยด้วยเครื่อง Mini Spray Dryer B-290 ที่อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้า 150 องศาเซลเซียส จะได้โปรตีนสกัดจากรำข้าวสังข์หยด (Crude protein : CP) เก็บสารในถุงพอลีเอทิลีนสีชาทึบ เก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

2.3.3 การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ปาเปน

นำโปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยด 10 กรัม มาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.02 mM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับ pH ของสารละลายให้ใกล้เคียง 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2.0 N แล้วเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.02 mM อีก 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับสารละลายให้ได้ pH 7.0 โดยใช้กระดาษวัดค่าพีเอช (pH indicator strips) และปรับอุณหภูมิของสารละลายให้ได้ 37 องศาเซลเซียส โดยคนสารตลอด

การทดลอง เมื่อควบคุมสภาวะได้แล้วทำการเติมเอนไซม์ปาเปน (Papain enzyme) ปริมาณ 0.01 กรัม โดยใช้เวลาในการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis time) 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วให้หยุดปฏิกิริยาโดยการทำลายการทำงานของเอนไซม์ปาเปน โดยการนำบีกเกอร์สารละลายแช่ในอ่างน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่ไม่ละลายออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ทิ้งตะกอนแล้วนำสารละลายด้านบนมาทำให้แห้งโดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอยด้วยเครื่อง Mini Spray Dryer B-290 ที่อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้า 150 องศาเซลเซียส จะได้โปรตีนไฮโดรไลเซต (Hydrolysate protein : HD) เก็บสารในถุงพอลีเอทิลีน สีชาทึบ แล้วเก็บรักษาในตู้เย็น อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

2.3.4 ตรวจสอบคุณสมบัติโปรตีนที่สกัดได้

2.3.4.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

นำโปรตีนที่สกัดได้ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบ ต่อ นาที นาน 10 นาที แล้วใช้สารละลายส่วนบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 200 - 750 นาโนเมตร

2.3.4.2 การหาปริมาณโปรตีน และน้ำตาล

ส่งโปรตีนที่สกัดได้ไปทดสอบหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีคเจลดาห์ล (Kjeldahl method: AOAC(2012), 991.20) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์หาโปรตีนในอาหาร โดยการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ และทดสอบหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดได้แก่ ฟรักโทส (Fructose) กลูโคส (Glucose) ซูโครส(Sucrose) มอลโทส (Maltose) และแล็กโทส (Lactose) ด้วยวิธีอ้างอิงตาม AOAC(2016), 982.14 ที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ชั้น 16

2.4 พัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนจากท้องตลาดโดยผสมโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยด

ผสมโปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำข้าวสังข์หยด ในปริมาณ 5% และ 10% กับอาหารเสริมโปรตีนจากท้องตลาด ได้แก่ โปรตีนไข่ขาวผง (Albumin powder) และ เวย์โปรตีนไอโซเลท (Whey protein isolate)

2.5 ตรวจสอบฤทธิ์ในการต่อต้านสารอนุมูลอิสระ

ทำการตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยดและโปรตีนอาหารเสริมจากท้องตลาด 2 ชนิด ได้แก่ โปรตีนไข่ขาวผง (Albumin powder) และ เวย์โปรตีนไอโซเลท (Whey protein isolate) รวมถึงผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่ทำการพัฒนา โดยทำการตรวจสอบ 2 วิธี ได้แก่

2.5.1 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (Total phenolic content : TPC) ถูกวิเคราะห์ด้วย Folin-Ciocalteu method ตามวิธีการทดลองของ Thamnarathip และคณะ[11] ซึ่งต้องใช้สารดังต่อไปนี้

1) รีเอเจนต์ Folin & Ciocalteu ความเข้มข้นเจือจาง (1:10 v/v)
   - ปิเปตรีเอเจนต์ Folin & Ciocalteu ความเข้มข้น 2 N ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ จากนั้นปิเปตน้ำปราศจากไอออน 9 มิลลิลิตร แล้วคนให้สารละลายเข้ากัน
2) โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.0% (w/v)
   - ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 3.5 กรัม ละลายสารด้วยน้ำปราศจากไอออนในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร
3) สารละลายกรดแกลลิคความเข้มข้น 0.6 mg/mL
   - ชั่งกรดแกลลิก 0.03 กรัม ละลายสารด้วยน้ำปราศจากไอออนในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 50 ขนาด มิลลิลิตร
4) การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ที่ความเข้มข้น 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 และ 0.06 mg/mL โดยปิเปตสาร ดังตารางที่ 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

เมื่อเตรียมสารละลายที่ต้องใช้ครบแล้วให้ทำการทดสอบดังนี้

1) ผสมสารละลายโปรตีนตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร เข้ากับรีเอเจนต์ Folin & Ciocalteu เจือจาง (1:10 v/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.0% (w/v) 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 โดยรายงานค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดแสดงในหน่วย mg gallic acid equivalent (GAE)/g sample

2.5.2 การทดสอบความสามารถในการต่อต้านสารอนุมูลอิสระ โดยเทคนิคการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging activity)

ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของโปรตีนตัวอย่างในสาร 2,2-diphenyl-1picrylhydrazyl (DPPH) ตามวิธีการของ Stanisavljević และ คณะ[39] โดยมีการปรับเปลี่ยนเล็กน้อย ซึ่งสารที่ต้องเตรียมมีดังนี้

1) สารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในน้ำปราศจากไอออน ได้แก่ $1x10^5$, $1x10^4$, $1x\ 10^3$, $1x10^2$, 10, 1, 0.1 และ 0.01 µg/mL โดยใช้หลักการ Serial Dilutions จากการชั่งสาร 0.1 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน 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 ตรวจวัดพีเอชด้วยกระดาษวัดค่าพีเอช ถ้าพีเอชไม่ตรงให้ ปรับด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริก

3) สารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 mM

- ชั่ง DPPH 0.0015 กรัม ละลายสารด้วยเอทานอลในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร

เมื่อเตรียมสารละลายที่ต้องใช้ครบแล้ว ให้เริ่มการทดสอบโดยปิเปตสารต่าง ๆ ตามตารางที่ 2.2 จากนั้นบ่ม สารละลายไว้ในที่มืดนาน 30 นาที เนื่องจากสารละลายตกตะกอนเมื่อเวลาผ่านไป 20 นาที จึงนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วจึงนำสารละลายด้านบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความ ยาวคลื่น 517 nm

ตารางที่ 2.2 ปริมาณสารละลายที่ใช้เพื่อตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช

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

โดยค่า scavenging activity สามารถคำนวณได้จากสมการด้านล่าง แล้วนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารตัวอย่างกับความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) ที่คำนวณได้ จะได้ค่า half inhibition concentration (IC_{50})

กำหนดให้

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ประกอบด้วยสารตัวอย่างและสารละลาย DPPH

$A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ประกอบด้วยสารตัวอย่างและเอทานอล

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ประกอบด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และสารละลาย DPPH

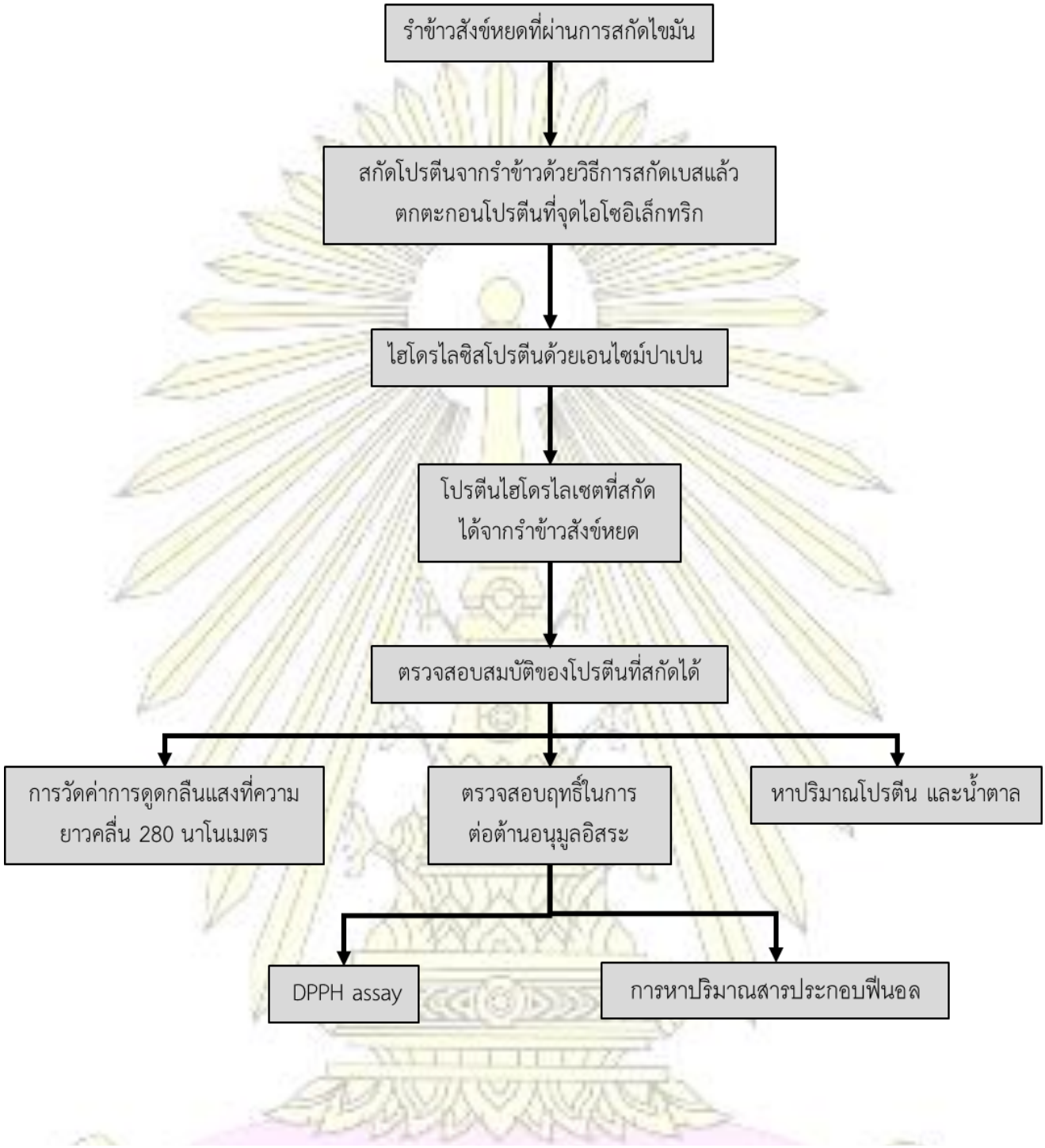
$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{blank} - (A_{sample} - A_{control})}{A_{blank}} \times 100\ \%$$

2.6 วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ

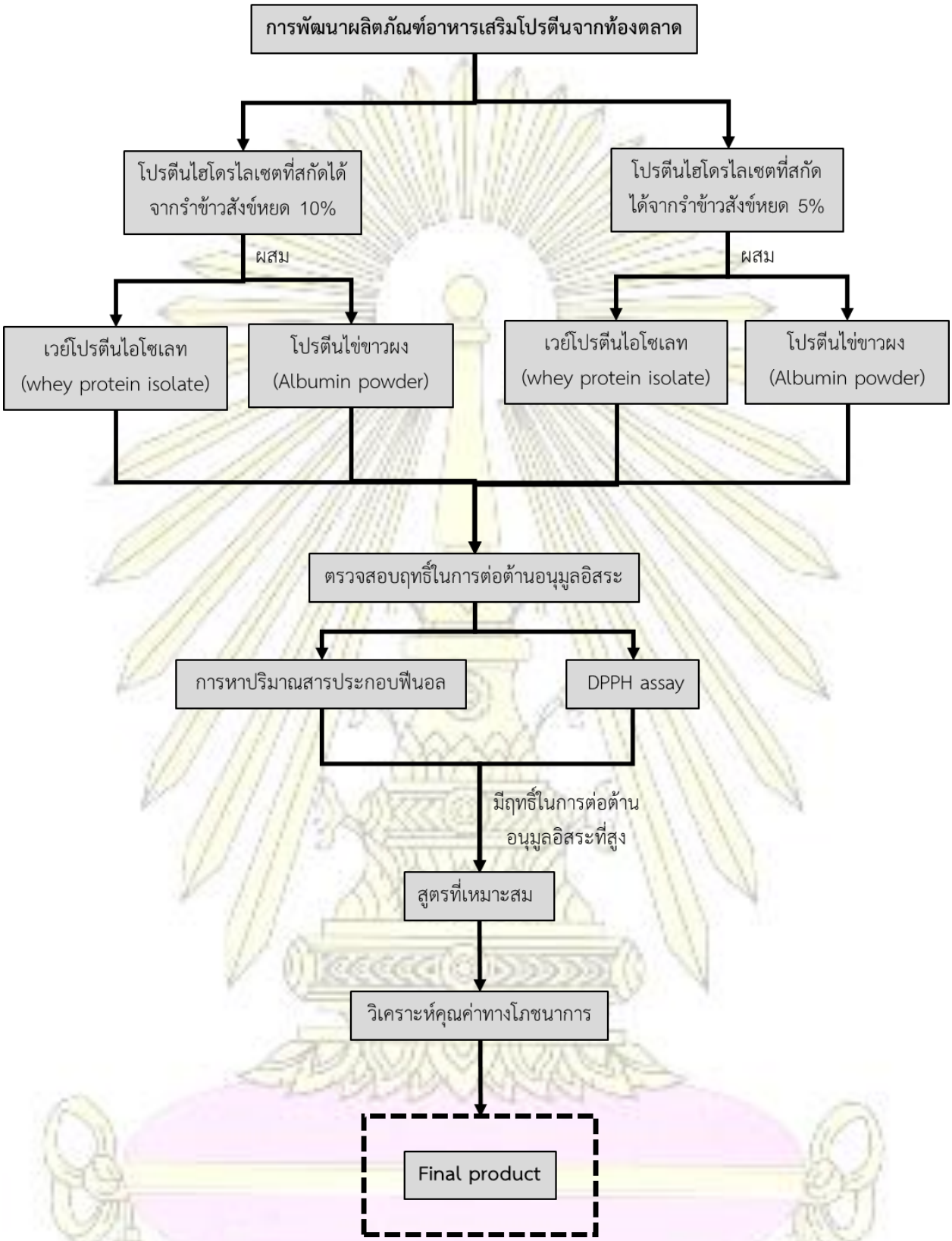
นำผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนที่ทำการพัฒนาสูตรที่เหมาะสมส่งไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ชั้น 16

2.7 ออกแบบผลิตภัณฑ์

โดยใช้โปรแกรม Adobe Illustrator CC



รูปที่ 2.1 แผนภาพการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำข้าวสังข์หยด และการตรวจสอบสมบัติของโปรตีนที่สกัดได้

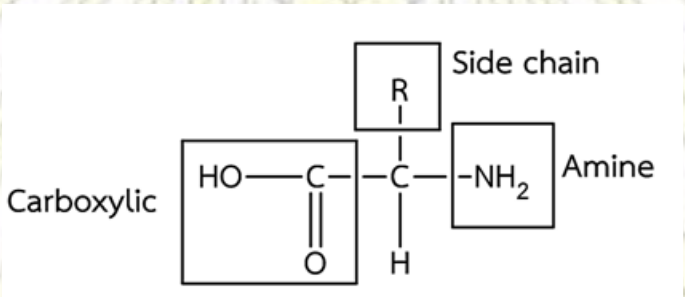


รูปที่ 2.2 แผนภาพการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนตามท้องตลาด

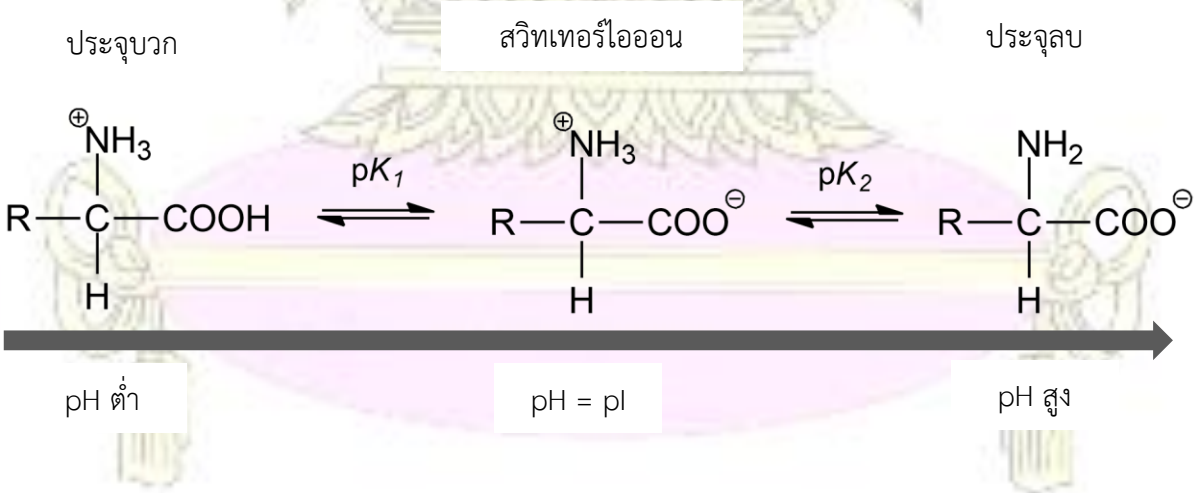
บทที่ 3
ผลการทดลองและการอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การสกัดโปรตีนจากรำข้าวด้วยวิธีการสกัดด้วยเบสและตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก

ในการทดลองนี้ได้ทำการสกัดโปรตีนจากรำข้าวสังข์หยดด้วยวิธีการสกัดด้วยเบส โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ในการปรับสภาวะของสารละลายให้เป็นเบสเพื่อให้โปรตีนในรำข้าวนั้นละลายออกมา เนื่องจากในโปรตีนนั้นประกอบไปด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดที่มีโครงสร้างดังรูปที่ 3.1 ซึ่งจะประกอบไปด้วยหมู่เอมีนที่เป็นเบสและหมู่คาร์บอกซิลิกที่เป็นกรด โดยจะมีหมู่โซ่ข้าง (Side chain : R) ที่เป็นส่วนที่ทำให้กรดอะมิโนมีความแตกต่างกันไป เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง pH และ ค่า pH สูงกว่าจุดไอโซอิเล็กทริก ซึ่งอยู่ในสภาวะที่เป็นเบส หมู่คาร์บอกซิลิกจะเสียโปรตอน ทำให้ประจุรวมกลายเป็น – 1 ดังรูปที่ 3.2 ซึ่งจะเกิดการผลักกัน (Charge repulsion) ของกรดอะมิโน ทำให้แต่ละโมเลกุลของโปรตีนนั้นจะใช้ประจุทำอันตรกิริยากับโมเลกุลของน้ำที่อยู่ล้อมรอบได้ดี ทำให้โปรตีนสามารถละลายน้ำได้ [40]



รูปที่ 3.1 โครงสร้างกรดอะมิโน



รูปที่ 3.2 แผนภาพการเปลี่ยนแปลงประจุของกรดอะมิโนที่ pH ต่าง ๆ

นำสารผสมที่ได้มากรองผ่านผ้าไนล่อนเพื่อทำการแยกกากรำข้าวออกจากสารละลาย และนำสารละลายมาปรับให้ได้ pH 4.0 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก (HCl) ซึ่งที่ pH 4.0 นั้นเป็นจุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point : pI) ของโปรตีน โดยในสภาวะที่ค่า pH เท่ากับจุดไอโซอิเล็กทริกนั้น กรดอะมิโนจะมีโครงสร้างเป็นสวิทเทอร์ไอออน (Zwitterion) ทำให้กรดอะมิโนมีประจุสุทธิเป็น 0 และเนื่องจากมีทั้งประจุบวกและประจุลบอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน จึงทำให้กรดอะมิโนดึงดูดกับโมเลกุลข้างเคียงทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอน (Precipitation) จากนั้นนำสารละลายที่มีตะกอนโปรตีนมาทำให้แห้งโดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอยด้วยเครื่อง Mini Spray Dryer B-290 ที่อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้า 150 องศาเซลเซียส จะได้ผงโปรตีนที่มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลอ่อน โดยน้ำหนักโปรตีน (Crude protein : CP) ที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยด 350 กรัม คือ 91.15 กรัม คิดเป็น % recovery เท่ากับ 26.0 %

3.2 การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ปาเปน

ในขั้นตอนนี้จะเป็นการไฮโดรไลซิสโปรตีนที่สกัดได้จากขั้นตอนแรกด้วยเอนไซม์ปาเปนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยจะนำโปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยด (Crude protein) มาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 และปรับอุณหภูมิให้ได้ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้สภาวะเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แล้วจึงค่อยใส่เอนไซม์ปาเปน เมื่อครบเวลาในการไฮโดรไลซิส 1 ชั่วโมงแล้ว จะทำการหยุดการทำงานของเอนไซม์ปาเปน โดยการนำบีกเกอร์มาให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายที่ถูกไฮโดรไลซิสแล้วไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่ไม่ละลายออก จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาทำให้แห้งโดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอยด้วยเครื่อง Mini Spray Dryer B-290 ที่อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้า 150 องศาเซลเซียส จะได้โปรตีนไฮโดรไลเซต (Hydrolysate protein : HD) ที่มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลอ่อน โดยมีน้ำหนักโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ทำการไฮโดรไลซิสโปรตีนสกัดจากรำข้าวสังข์หยด 10.47 กรัม เท่ากับ 4.60 กรัม คิดเป็น % recovery เท่ากับ 43.9 %

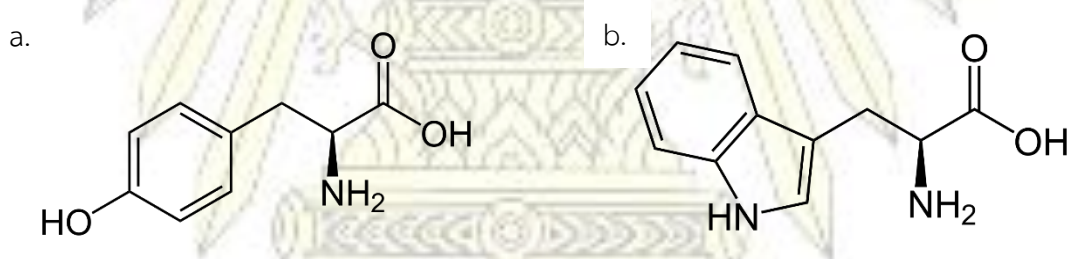
โดยในกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์นั้น โมเลกุลของโปรตีนจะถูกตัดพันธะทำให้โปรตีนมีขนาดเล็กลงเป็นเพปไทด์ขนาดต่าง ๆ กัน หรือ เป็นกรดอะมิโนอิสระ จึงทำให้โปรตีนที่ถูกไฮโดรไลซิสนั้นจะดูดซึมได้ง่ายกว่าโปรตีนทั่วไป และยังพบว่าการไฮโดรไลซิสโปรตีนนั้นยังทำให้การละลายดีขึ้นอีกด้วย

3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีนที่สกัดได้

3.3.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

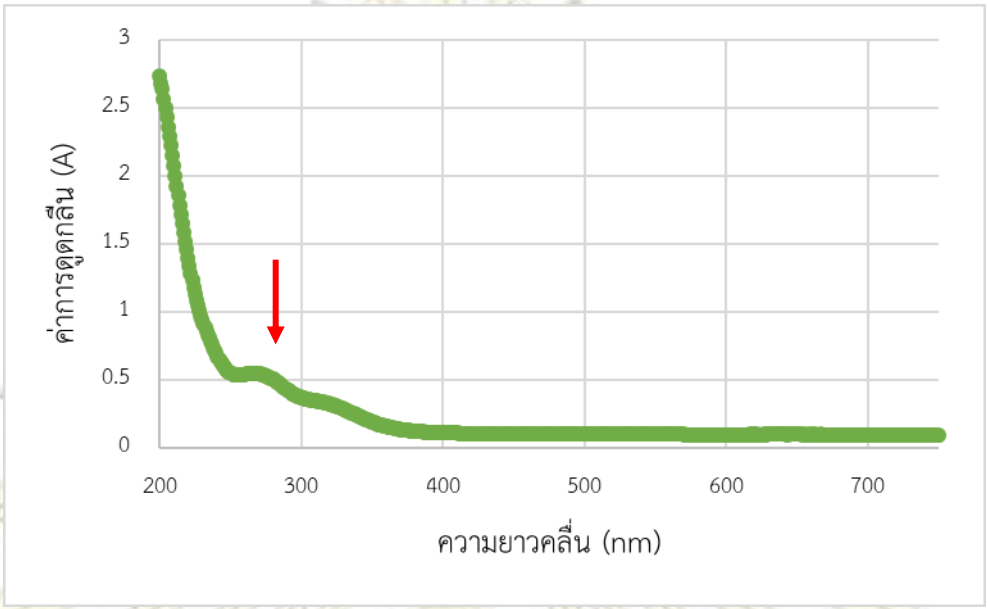
นำโปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยด ทั้ง crude protein และ โปรตีนที่ถูกไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ปาเปน (Hydrolysate protein) มาละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบ ต่อ นาที นาน 10 นาที แล้วนำสารละลายส่วนบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 200 - 750 นาโนเมตร ด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโคปี (UV-VIS Spectroscopy) เพื่อเป็นการยืนยันว่าสารที่สกัดได้นั้นเป็นโปรตีน โดยวิธีนี้ยัง ง่าย สะดวก และ รวดเร็วอีกด้วย เพราะไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีอื่น ๆ แต่ใช้เพียงตัวอย่างโปรตีนที่ต้องการทดสอบเท่านั้น

การวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลตนั้นเป็นสมบัติการดูดกลืนของกรดอะมิโนสองชนิด ได้แก่ Tyrosine และ Tryptophan ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 3.3 ซึ่งจะดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 275 และ 280 นาโนเมตร ตามลำดับ และเนื่องจากสัดส่วนโดยปริมาณของกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดนี้ค่อนข้างจะคงที่ในโปรตีนส่วนใหญ่ ดังนั้นปริมาณโปรตีนจึงเป็นปฏิภาคโดยตรงกับค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร [40] โดยจากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.4 จะเห็นว่ามีพีคขนาดเล็กปรากฏขึ้นที่ความยาวคลื่นประมาณ 280 นาโนเมตร จึงทำให้สรุปได้ว่าสารที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยดนั้นทั้ง crude protein และ hydrolysate protein เป็นโปรตีน

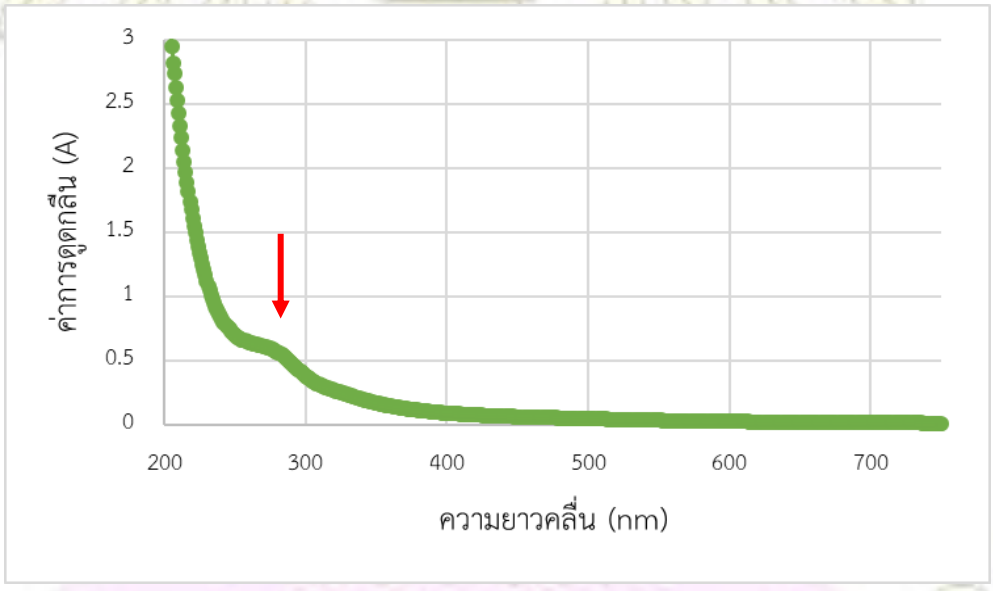


รูปที่ 3.3 โครงสร้างกรดอะมิโน a) Tyrosine และ b) Tryptophan

a.



b.



รูปที่ 3.4 UV-Vis Spectra ของ a) crude protein และ b) Hydrolysate protein

3.3.2 การหาปริมาณโปรตีน และน้ำตาล

ทำการส่งโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยดไปทดสอบหาปริมาณโปรตีนและน้ำตาลที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ชั้น 16 พบว่าจากการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีคเจลดาห์ล (Kjeldahl method: AOAC(2012), 991.20) โดยการย่อยสลายโปรตีนที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน (amino acid) ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งในการย่อยสลายโปรตีนจะปลดปล่อยไนโตรเจนออกมาและจะถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย จากนั้นทำการไทเทรตเพื่อหาปริมาณไนโตรเจน และนำปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดมาคูณกับ Kjeldahl factor ซึ่งอาหารแต่ละชนิดก็จะมีแฟกเตอร์แตกต่างกันออกไป[41] โดยจากการทดลองจะได้ว่ามีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 7.66 กรัม ใน 100 กรัมของสารตัวอย่าง และจากการทดสอบหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดได้แก่ ฟรักโทส (Fructose) กลูโคส (Glucose) ซูโครส(Sucrose) มอลโทส (Maltose) และแล็กโทส (Lactose) ด้วยวิธีอ้างอิงตาม AOAC(2016), 982.14 พบว่ามีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 9.68 กรัม ใน 100 กรัม ของสารตัวอย่าง แต่ไม่พบน้ำตาลแลคโตสทำให้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยดนั้น เป็นโปรตีนอีกหนึ่งทางเลือกที่เหมาะสำหรับผู้ที่แพ้น้ำตาลแลคโตส หรือที่เรียกว่าLactose Intolerance

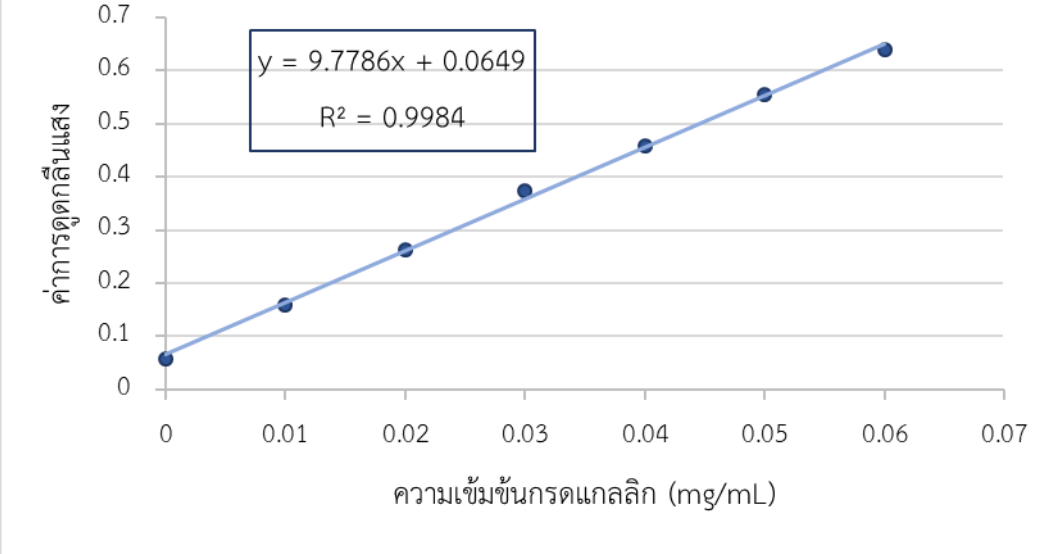
3.4 พัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนจากท้องตลาดและตรวจสอบคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์

ทำการผสมโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยด ในปริมาณ 5% และ 10% กับอาหารเสริมโปรตีนจากท้องตลาด 2 ชนิด ได้แก่ โปรตีนไข่ขาวผง (Albumin powder) และ เวย์โปรตีนไอโซเลท (Whey protein isolate) เพื่อศึกษาหาสูตรที่เหมาะสมที่ให้โปรตีน และฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่สูงไปพร้อมกัน โดยจะทำการตรวจสอบคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เพื่อหาสูตรที่เหมาะสม ด้วยการหาปริมาณสารประกอบฟีนอล และ การทดสอบความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging activity)

3.4.1 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล

ทำการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลตามวิธีการ Folin-Ciocalteu method โดยอาศัยหลักการที่ฟีนอลมีสมบัติเป็นกรดอ่อน เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นเบสจะแตกตัวให้ฟีโนเลตแอนไอออน ซึ่งจะมีความสามารถในการรีดิวซ์สารละลายรีเอเจนต์ Folin & Ciocalteu’s phenol จึงทำให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน โดยสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโคปี (UV-VIS Spectroscopy) ซึ่งจะหาปริมาณสารประกอบฟีนอลในสารละลายโปรตีนตัวอย่างได้จากการสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) กรดแกลลิกที่ความ

เข้มข้น 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 และ 0.06 mg/mL ซึ่งจากผลการทดลองจะได้กราฟดังรูปที่ 3.5 โดยจะได้สมการจากกราฟมาตรฐานคือ y = 9.7786x + 0.0649 ที่มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9984



รูปที่ 3.5 กราฟมาตรฐาน (Calibration curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

จากนั้นนำสารละลายโปรตีนตัวอย่างทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ hydrolysate protein จากรำข้าวสังข์หยด, โปรตีนไข่ขาวผง (Albumin powder), เวย์โปรตีน ไอโซเลท (Whey protein isolate), 5% HD + albumin powder, 10% HD + albumin powder, 5% HD + whey protein isolate, 10% HD + whey protein isolate มาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง และทำการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลในสารละลายตัวอย่างซึ่งได้ผลตามตารางที่ 3.1 ซึ่งจะรายงานปริมาณสารประกอบฟีนอลในหน่วยของ mg gallic acid equivalents (GAE) / g sample

ตารางที่ 3.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนตัวอย่างและปริมาณสารประกอบฟีนอล

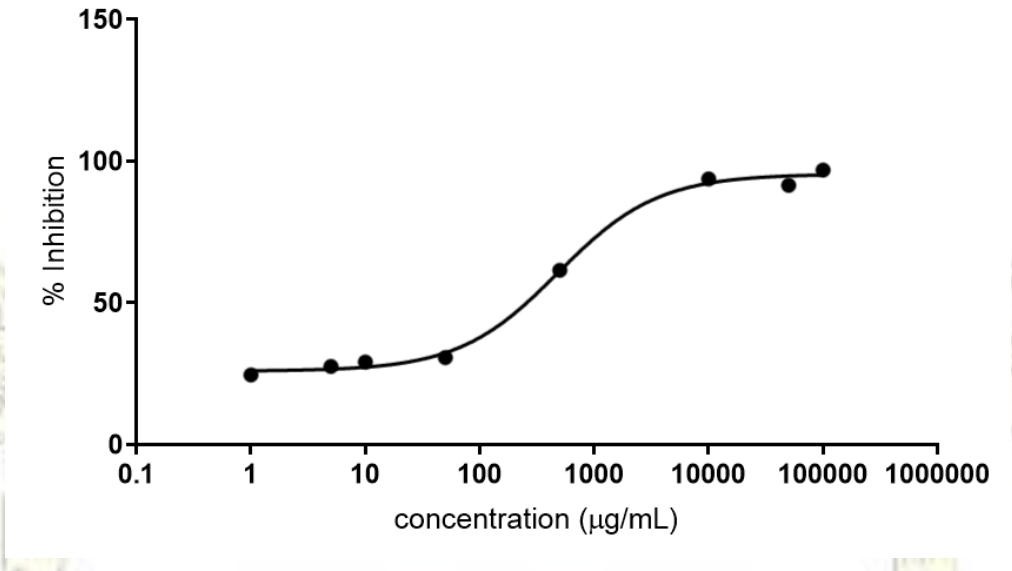
ความเข้มข้น	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm	mg gallic acid equivalents (GAE) / g sample
hydrolysate protein จากรำข้าวสังข์หยด (HD)	0.463	33.37
albumin powder	0.297	17.72
whey protein isolate	0.242	13.93
5% HD + albumin powder	0.319	17.67
10% HD + albumin powder	0.305	17.54
5% HD + whey protein Isolate	0.3115	18.28
10% HD + whey protein Isolate	0.3385	20.13

เนื่องจากสารประกอบฟีนอลมีสมบัติเป็นกรดอ่อนเพราะมีวงแอโรมาติก ทำให้หมู่ไฮดรอกซิลมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาโดยสามารถให้โปรตอนได้ ซึ่งจากความสามารถในการให้โปรตอนนี้จึงทำให้สารประกอบฟีนอลมีความสามารถในการเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) โดยจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยดนั้นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลมากที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 33.37 mg GAE / g sample ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่มากเมื่อเทียบกับโปรตีนจากท้องตลาดสองชนิด ได้แก่ โปรตีนไข่ขาวผง (Albumin powder) และ เวย์โปรตีน ไอโซเลท (Whey protein Isolate) จากนั้นนำมาผสมกับโปรตีนจากท้องตลาดทั้ง 2 ชนิด ข้างต้นในอัตราส่วน โปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำข้าวสังข์หยด 5% และ 10% จะพบว่าการนำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยด 10 % มาผสมกับเวย์โปรตีนไอโซเลทนั้น มีปริมาณฟีนอลเท่ากับ 20.13 mg GAE / g sample ซึ่งให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลมากที่สุดเมื่อเทียบกับสูตรผสมอื่น ๆ

3.4.2 การทดสอบความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging activity)

DPPH assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และง่ายต่อการวิเคราะห์ ทำให้มีความถูกต้องและแม่นยำสูง โดยอนุมูลอิสระ DPPH เป็น radical ที่เสถียร เมื่อละลายในเอทานอลจะได้สารละลายสีม่วงเข้ม ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยเมื่อสารนี้รับโปรตอนจะเกิดเป็นสารประกอบที่มีสีเหลือง ซึ่งถ้าสารตัวอย่างมีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงจะลดลง ซึ่งในที่นี้จะทำชุด control ไปด้วยเนื่องจากว่าสารตัวอย่างสามารถดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรได้ด้วยเช่นกัน ทำให้ต้องลบค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างออกไป

โดยจะเริ่มจากการชั่งสาร 0.1 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน 1 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง $1x10^5$ µg/mL แล้วเตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยการเจือจางตามลำดับ ได้แก่ $1x10^4$, $1x10^3$, $1x10^2$, 10, 1, 0.1 และ 0.01 µg/mL โดยที่แต่ละค่าความเข้มข้นนั้นจะให้ค่า %inhibition ที่แตกต่างกัน โดยจะใช้วิตามินซี (Ascorbic acid) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ซึ่งเมื่อนำมาสร้างกราฟการกระจายตัวระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับ %inhibition จะได้กราฟรูปตัวเอส (S curve) ซึ่งจะทำให้สามารถหาค่า half inhibition concentration (IC_{50}) ได้ ซึ่งค่า IC_{50} นี้ยิ่งมีค่าน้อยจะยิ่งแสดงถึงความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี โดยลักษณะกราฟที่ได้ แสดงดังตัวอย่างในรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

โดยค่า IC_{50} ที่ได้ มาจากการคำนวณด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 7 ซึ่งค่า IC_{50} ของโปรตีนตัวอย่างจะแสดงในตารางที่ 3.2 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยดจะมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับโปรตีนจากท้องตลาดทั้งสองชนิด ได้แก่ โปรตีนไข่ขาวผง (Albumin powder) และ เวย์โปรตีน ไอโซเลท (Whey protein Isolate) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 213.5 µg/mL จากนั้นนำมาผสมกับโปรตีนจากท้องตลาดทั้ง 2 ชนิด ข้างต้น ในอัตราส่วน โปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำข้าวสังข์หยด 5% และ 10% จะพบว่า เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยด 10% มาผสมกับเวย์โปรตีน ไอโซเลท จะพบว่ามีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสูตรผสมอื่น ๆ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 271.1 µg/mL

ตารางที่ 3.2 ความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของโปรตีน

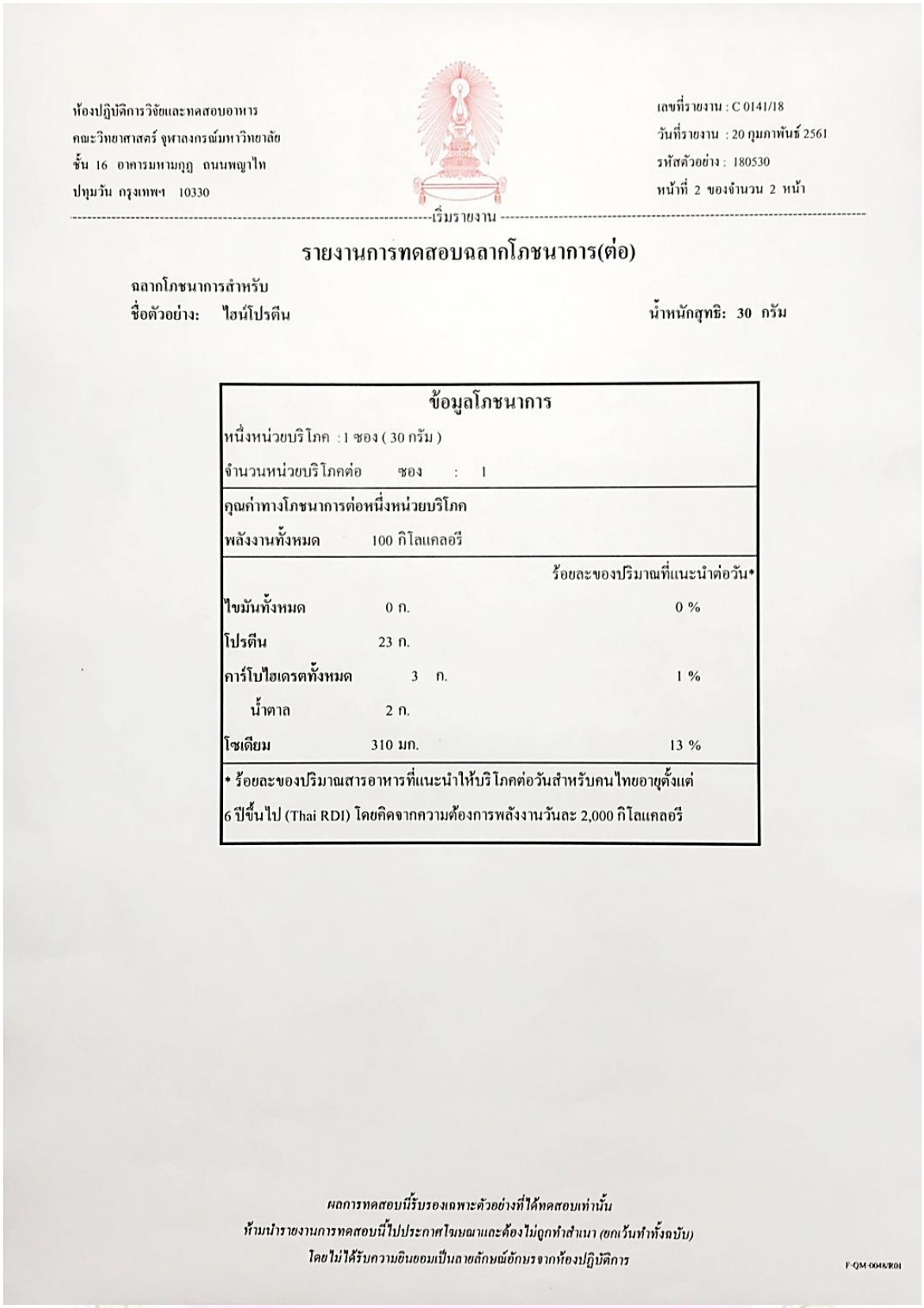
ตัวอย่าง	**IC_{50} (µg/mL)**
Ascorbic acid	8.4
hydrolysate protein จากรำข้าวสังข์หยด (HD)	213.5
albumin powder	482.9
whey protein isolate	3412.0
5% HD + albumin powder	458.7
10% HD + albumin powder	365.9
5% HD + whey protein Isolate	482.1
10% HD + whey protein Isolate	271.1

จากผลการตรวจสอบสมบัติของผลิตภัณฑ์เพื่อหาสูตรที่เหมาะสม โดยทำการตรวจสอบจากการหาปริมาณสารประกอบฟีนอล และความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระโดยการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ทำให้ผู้วิจัยสรุปได้ว่าสูตรที่เหมาะสม คือ การนำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยด 10% มาผสมกับ เวย์โปรตีน ไอโซเลท เพราะนอกจากจะให้ฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่สูงแล้ว ก็ยังได้โปรตีนในปริมาณที่สูงจากเวย์โปรตีน ไอโซเลท นอกจากนี้โปรตีนสูตรดังกล่าวยังละลายได้ง่ายเมื่อเทียบกับการนำไปผสมกับโปรตีนจากไข่ขาวอีกด้วย

3.5 ไฮน์โปรตีน (HEIN PROTEIN)

ไฮน์โปรตีนเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนที่มีส่วนผสมของโปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยดโดยทำการนำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยด 10% มาผสมกับเวย์โปรตีน ไอโซเลท เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่มีปริมาณโปรตีนที่สูง และมีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่สูงด้วย ดังรูปที่ 3.7 นอกจากนี้ไฮน์โปรตีนยังดูดซึมได้เร็ว ไม่มีไขมัน และยังเหมาะสำหรับผู้ที่แพ้น้ำตาลแลคโตสอีกด้วย จากนั้นนำไฮน์โปรตีนส่งไปวิเคราะห์ข้อมูลทางโภชนาการที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและการทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ชั้น 16 พบว่า ในโปรตีนตัวอย่าง 30 กรัม จะให้พลังงานทั้งหมดเท่ากับ 100 กิโลแคลอรี ไขมัน 0 กรัม โปรตีน 23 กรัม คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด 3 กรัม น้ำตาล 2 กรัม และ โซเดียม 310 มิลลิกรัมดังรูปที่ 3.8

รูปที่ 3.7 รูปแบบผลิตภัณฑ์ไฮน์โปรตีน (HEIN PROTEIN)



ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ชั้น 16 อาคารมหามกุฏ ถนนพญาไท
ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

เลขที่รายงาน : C 0141/18
วันที่รายงาน : 20 กุมภาพันธ์ 2561
รหัสตัวอย่าง : 180530
หน้าที่ 2 ของจำนวน 2 หน้า

เริ่มรายงาน

รายงานการทดสอบฉลากโภชนาการ(ต่อ)

ฉลากโภชนาการสำหรับ
ชื่อตัวอย่าง: ไฮน์โปรตีน

น้ำหนักสุทธิ: 30 กรัม

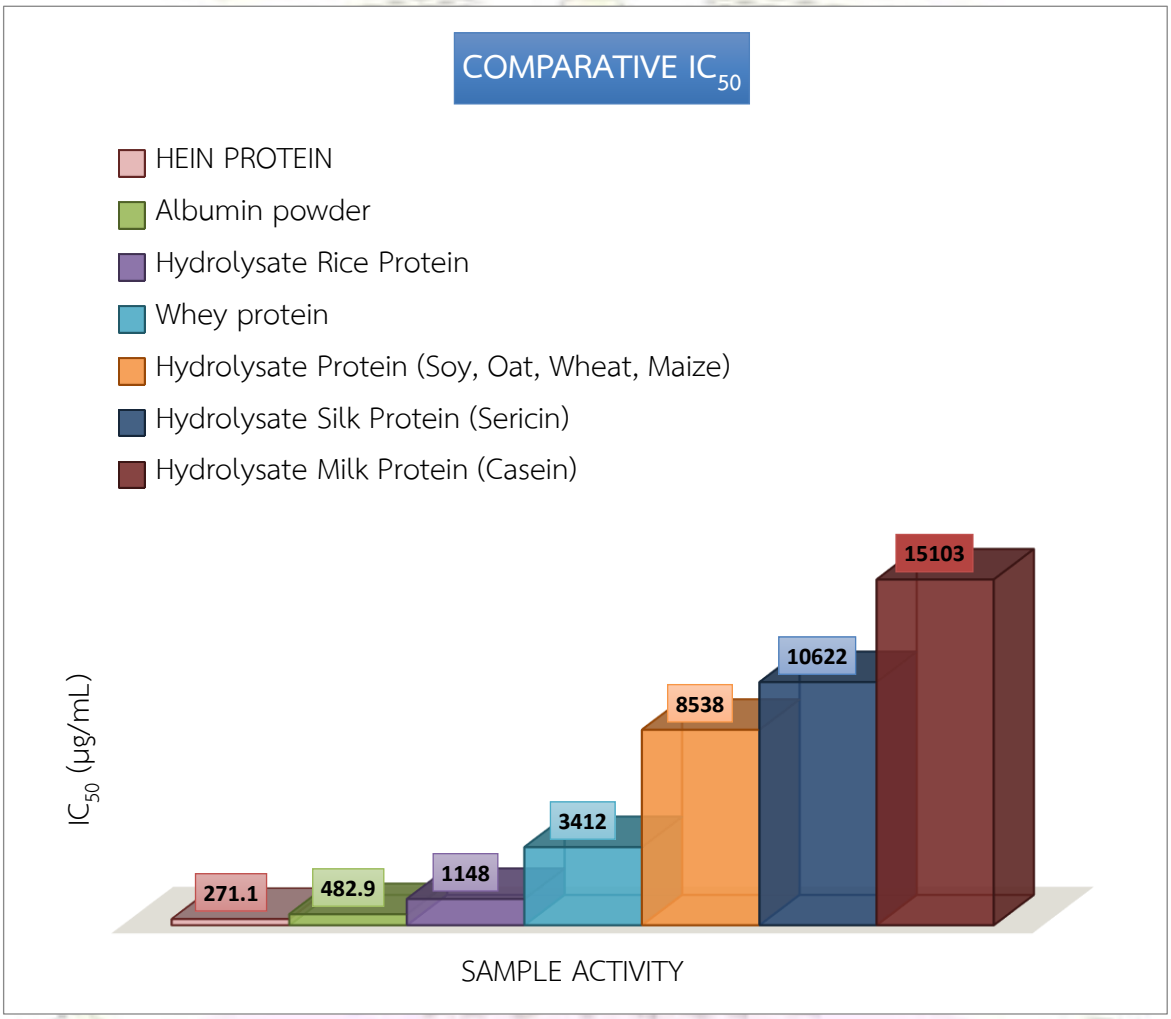
ข้อมูลโภชนาการ		
หนึ่งหน่วยบริโภค : 1 ซอง (30 กรัม)		
จำนวนหน่วยบริโภคต่อ ซอง : 1		
คุณค่าทางโภชนาการต่อหนึ่งหน่วยบริโภค		
พลังงานทั้งหมด	100 กิโลแคลอรี	
		ร้อยละของปริมาณที่แนะนำต่อวัน*
ไขมันทั้งหมด	0 ก.	0 %
โปรตีน	23 ก.	
คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	3 ก.	1 %
น้ำตาล	2 ก.	
โซเดียม	310 มก.	13 %
* ร้อยละของปริมาณสารอาหารที่แนะนำให้บริโภคต่อวันสำหรับคนไทยอายุตั้งแต่ 6 ปีขึ้นไป (Thai RDI) โดยคิดจากความต้องการพลังงานวันละ 2,000 กิโลแคลอรี		

ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น
ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศโฆษณาและต้องไม่ถูกทำสำเนา (ยกเว้นทำทั้งฉบับ)
โดยไม่ได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากห้องปฏิบัติการ

F-QM-004&/R01

รูปที่ 3.8 ฉลากผลิตภัณฑ์ไฮน์โปรตีน (HEIN PROTEIN) จากห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อนำไฮน์โปรตีน (HEIN PROTEIN) มาเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนตามท้องตลาด 6 ชนิด ได้แก่ โปรตีนจากไข่ขาว (Albumin powder) โปรตีนที่ได้จากเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าว (Hydrolyzed Rice Protein) โปรตีนผสมของธัญพืชชนิด ต่าง ๆ (Hydro Protein; Soy, Oat, Wheat, Maize Protein) โปรตีนเคซีน (Hydrolyzed Milk; Casein) โปรตีนจากไหม (Protein Hydrolyzed Silk Protein; Sericin) ตามรูปที่ 3.9 จะพบว่าไฮน์โปรตีนนั้นมีคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด เมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์อาหารเสริมอื่น ๆ ตามท้องตลาด[24]



รูปที่ 3.9 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของไฮน์โปรตีนกับผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนชนิดอื่น ๆ ตามท้องตลาด

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำข้าวสังข์หยดโดยการสกัดด้วยเบสแล้วตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก แล้วทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ปาเปน โดยจะทำให้แห้งเป็นผงโปรตีนโดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอยด้วยเครื่อง Mini Spray Dryer B-290 จากนั้นนำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้ส่งไปทดสอบที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ชั้น 16 เพื่อตรวจสอบปริมาณโปรตีน และปริมาณน้ำตาล จากรายงานการทดสอบพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยดนั้น มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 7.66 กรัม ต่อ ปริมาณสารตัวอย่าง 100 กรัม และยังไม่พบน้ำตาลแลคโตสอีกด้วย ดังนั้นจึงเป็นแหล่งโปรตีนทางเลือกใหม่สำหรับผู้ที่แพ้น้ำตาลแลคโตส ต่อมาได้นำไปทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) โดยจะทำการหาปริมาณสารประกอบฟีนอล และ ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging activity) โดยพบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลเท่ากับ 33.37 mg GAE / g sample และมีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระโดยการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH โดยรายงานค่าเป็น IC_{50} มีค่าเท่ากับ 213.5 µg/mL

นำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยดมาผสมกับผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนตามท้องตลาดสองชนิด ได้แก่ โปรตีนไข่ขาวผง (Albumin powder) และ เวย์โปรตีน ไอโซเลท (Whey protein Isolate) เพื่อทำการหาสูตรที่เหมาะสมที่จะให้ฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด และพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนตามท้องตลาด โดยจากการทดลองจะพบว่าการผสมโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยดในปริมาณ 10 % กับ เวย์โปรตีน ไอโซเลท จะให้ฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีปริมาณฟีนอลเท่ากับ 20.13 mg GAE / g sample และค่า IC_{50} เท่ากับ 271.1 µg/mL

ผลิตภัณฑ์ไฮน์โปรตีน (HEIN PROTEIN) เป็นอาหารเสริมโปรตีนที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยดในปริมาณ 10 % กับ เวย์โปรตีน ไอโซเลท และจากการนำไฮน์โปรตีนส่งไปวิเคราะห์ข้อมูลทางโภชนาการที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและการทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ชั้น 16 พบว่า ในโปรตีนตัวอย่าง 30 กรัม จะให้พลังงานทั้งหมดเท่ากับ 100 กิโลแคลอรี ไขมัน 0 กรัม โปรตีน 23 กรัม คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด 3 กรัม น้ำตาล 2 กรัม และ โซเดียม 310 มิลลิกรัม นอกจากนี้เมื่อนำไฮน์โปรตีนมาเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระกับผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนตามท้องตลาด 6 ชนิด ได้แก่ โปรตีนจากไข่ขาว (albumin powder) โปรตีนที่ได้จากเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าว (Hydrolyzed Rice Protein) โปรตีนผสมของธัญพืชชนิด ต่าง ๆ (Hydro Protein; Soy, Oat, Wheat, Maize Protein)

โปรตีนเคซีน (Hydrolyzed Milk; Casein) โปรตีนจากไหม (Protein Hydrolyzed Silk Protein; Sericin) ยังพบว่าไฮน์โปรตีนนั้นมีคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด เมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์อาหารเสริมอื่น ๆ ตามท้องตลาด

ดังนั้นไฮน์โปรตีนจึงเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนทางเลือกใหม่ที่ไม่เพียงแต่จะมีปริมาณโปรตีนที่เทียบเท่ากับอาหารเสริมโปรตีนทั่วไปแต่ยังมีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่สูง และยังเหมาะสำหรับผู้ที่แพ้น้ำตาลแลคโตส และต้องการควบคุมน้ำหนักอีกด้วย เพราะไฮน์โปรตีนนั้นไม่มีไขมัน และไม่มีน้ำตาลแลคโตส

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2561. http://www.oae.go.th (accessed 17 February 2018).
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*, 807-816.
3. Saunder, R. M. The Properties of Rice Bran as a Foodstuff. *Cereal Foods World.* **1990**, *35,* 632-636.
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. Giese, J. Protein as Ingredients: Types, Functions, Applications. *Food Technol*. **1994**, *48*, 50-60.
6. Weir, G. S. D. Protein Hydrolysates as Flavorings in Development in Food Protein. Elsevier. London, U.K., **1986**, 175-217.
7. Clemente, A. Enzymatic Protein Hydrolysates in Human Nutrition. *Trends in Food Science & Technology*. **2000**, *11*, 254-262
8. 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.
9. 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*, 478-485.
10. 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.
11. 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.
12. Kuehler, C. A.; Stine, C. M. Effect of Enzymatic Hydrolysis on Some Functional Properties of Whey Protein. *Journal of Food Science*. **1974**, *39*, 379-382.
13. Pham, H. L. A.; He, H.; Pham, H. C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. International. *International Journal of Biomedical Science*. **2008**, *4*, 89-96.

14. 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 2 6 4 .7 Murine Macrophage Cells. *Medicinal and Aromatic Plants*. **2016**, *5*, 244.
15. ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าวและหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว http://dna.kps.ku.ac.th/index.php (accessed 20 February 2018).
16. ข้าวสังข์หยดพัทลุง https://sites.google.com/a/wanthawee.com/www/khaw-sang-yod-red-rice (accessed 18 February 2018).
17. สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ. การพัฒนาผลิตภัณฑ์คุกกี้ข้าวสังข์หยดเพื่อสุขภาพ. จากหนังสือองค์ความรู้และนวัตกรรมด้านเกษตรอินทรีย์ ปี พ.ศ.2552-2553, 2554; หน้า 62
18. ข้าวสังข์หยดอบกรอบ by Richy Rice. www.facebook.com/Richy-Rice-House (accessed 20 February 2018)
19. Bunyasawat, J.; Bhoosem, C. Supplementation of Fiber in Macaron Product with Sangyod Rice Bran. Department of Food and Nutrition, Rajamangala University of Technology Phra Nakhon. **2013**
20. Rattanapiboon, N.; Jinda, N., Antioxidants in Rice Bran Oil from Sangyod Breeding Rice and Application in Cream-Gel. ResearchGate, **2012**.
21. Theerakulkait, C.; Chaiseri, S.; Mongkolkanchanasiri, S. Extraction and Some Functional Properties of Protein Extract from Rice Bran. *Kasetsart Journal (Natural Science)*. **2006**, *40*, 209-214.
22. Bandyopadhyay, K.; Misra, G.; Ghosh, S. Preparation and Characterisation of Protein Hydrolysates from Indian Defatted Rice Bran Meal. *Journal of Oleo Science*. **2 0 0 8**, *57 (1),* 47-52.
23. 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.
24. Chompupuen, V. B.A. Senior project, Chulalongkorn university, 2016

25. Phantuwong, N.; Thongraung, C.; Yupanqui, C. T. Effect of Enzymatic Hydrolysis Processes on Protein and β-glucan Content of Sang-yod Rice Bran Hydrolysates and their Anti-inflammatory Activity by RAW 264.7 Cells. *Functional Foods in Health and Disease.* **2017**, *7(22),* 2160-3855.
26. 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.
27. Wirasorn, K.; Klarod, K.; Hongsprabha, P.; Boonsiri, P. Oxidative Stress, Antioxidant and Cancer. *Srinagarind Medical Journal*. **2014**, *29*, 207-219.
28. Amri, E.; Mamboya, F. Papain, a Plant Enzyme of Biological Importance. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. **2012**, *8(2)*, 99-104.
29. Vermerris, W.; Nicholson, R. In *Phenolic Compound Biochemistry*, Springer Science Business Media B.V: 2006; p 284.
30. 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.
31. 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. *Analytical Methods*. **2013**, *5,* 5990-5999.
32. 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.
33. 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.
34. Sirisamut, T. Whey Protein: Nutritional and Medical Benefits. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*. **2015**, *10 (2)*, 75-80.
35. Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K. Crystal Structure of Human Serum Albumin at 2.5 A Resolution. *Protein Engineering.* **1999**, *12 (6)*, 439-460.
36. He, X. M.; Carter, D. C. Atomic Structure and Chemistry of Human Serum Albumin. *Nature*. **1992**, *358*, 209-215.
37. Haefliger, D. N.; Moskaitis, J. E.; Schoenberg, D. R.; Wahli W. Amphibian Albumins as Members of The Albumin, Alpha-fetoprotein, Vitamin D-binding Protein Multigene Family. *Journal of Molecular Evolution.* **1989**, *29 (4),* 344-354.

38. Manninen, A. H. Protein Hydrolysates in Sports Nutrition. *Nutrition & Metabolism.* **2009**, *6*, 1743-7075.

39. 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. *Archives of Biological Sciences*. **2015**, *67 (3)*, 1033-1042.

40. คณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี; คณะวิทยาศาสตร์; จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ตำราปฏิบัติการ ชีวเคมีเบื้องต้น. 2556; p 130-158.

41. Kjeldahl method (วิธีคเจลดาห์ล) http://www.foodnetworksolution.com (accessed 5 May 2018).

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

รายงานผลการทดสอบปริมาณโปรตีน และค่าทางโภชนาการอื่น ๆ ในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำข้าวสังข์หยด

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ชั้น 16 อาคารมหามกุฎ ถนนพญาไท
ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

เลขที่รายงาน : C 0638/17
วันที่รายงาน : 17 พฤศจิกายน 2560
รหัสตัวอย่าง : 173668
หน้าที่ 1 ของจำนวน 1 หน้า

เริ่มรายงาน

รายงานการทดสอบ

ชื่อผู้ขอรับบริการ : ภาควิชาเคมี
ที่อยู่ผู้ขอรับบริการ : ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
254 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
ชื่อตัวอย่าง/ รายละเอียดตัวอย่าง : โปรตีนสกัดจากรำข้าวสังข์หยด / ผงละเอียดสีน้ำตาล บรรจุในถุงพลาสติกซิปล็อคสีชา น้ำหนักรวม 50 กรัม
ผู้สุ่มตัวอย่าง : ผู้ส่งตัวอย่างเป็นผู้สุ่มตัวอย่าง
วันที่รับตัวอย่าง : 9 พฤศจิกายน 2560
วันที่เริ่มทดสอบ : 11 พฤศจิกายน 2560

ผลการทดสอบ

รายการทดสอบ	ผล	วิธีทดสอบ	Limit of detection
Calories	200.78 kcal/100g	Compendium of methods for food analysis (2003) p.2-18	-
Carbohydrate	37.00 g/100g	Compendium of methods for food analysis (2003) p.2-9	-
Moisture	11.11 g/100g	AOAC (2012), 925.10	-
Ash	41.77 g/100g	AOAC (2012), 923.03	-
Total Fat	2.46 g/100g	AOAC (2012), 922.06	-
Protein (N x 6.25)	7.66 g/100g	In-house method T 058 based on AOAC (2012), 991.20	-
Total Sugar	9.68 g/100g	In-house method T 082 based on AOAC (2016), 982.14	-
Fructose	1.04 g/100g		-
Glucose	1.51 g/100g		-
Sucrose	7.13 g/100g		-
Maltose	Not detected		0.10 g/100g
Lactose	Not detected		0.10 g/100g

หมายเหตุ : -

สิ้นสุดรายงาน

อนุมัติ โดย

ลงชื่อ ..... ลงชื่อ ..... ลงชื่อ .....
(นางวิไล ประยูรหงษ์) (รองศาสตราจารย์ ดร.สุมธ ตันตระเธียร) (ศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ก๊กผล)
ผู้จัดการด้านวิชาการ รองผู้อำนวยการ ผู้อำนวยการ
ห้องปฏิบัติการเคมี

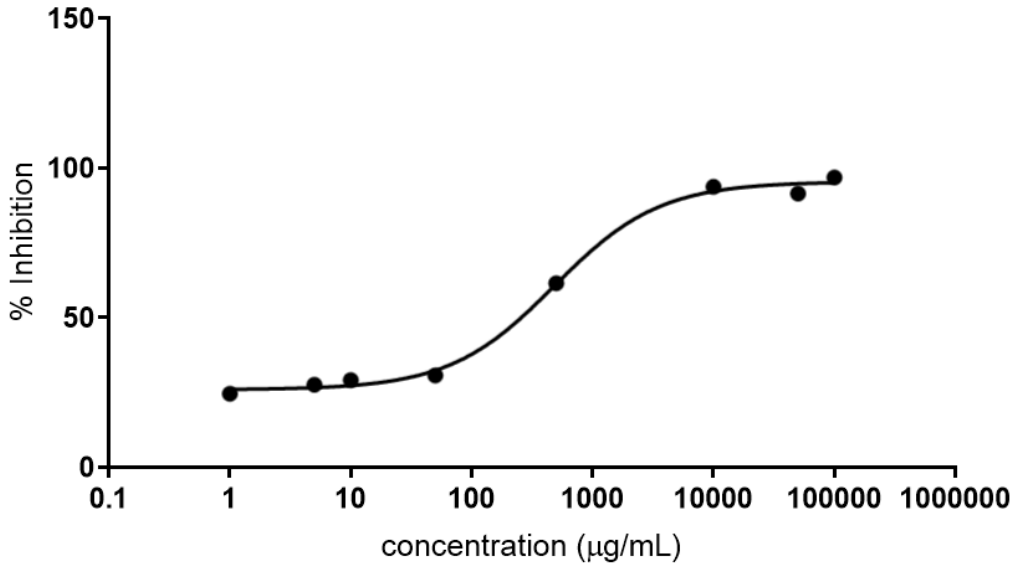
ผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทดสอบเท่านั้น
ห้ามนำรายงานการทดสอบนี้ไปประกาศโฆษณาและต้องไม่ถูกทำสำเนา (ยกเว้นทำทั้งฉบับ)
โดยไม่ได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากห้องปฏิบัติการ

F-QM-0031/R03

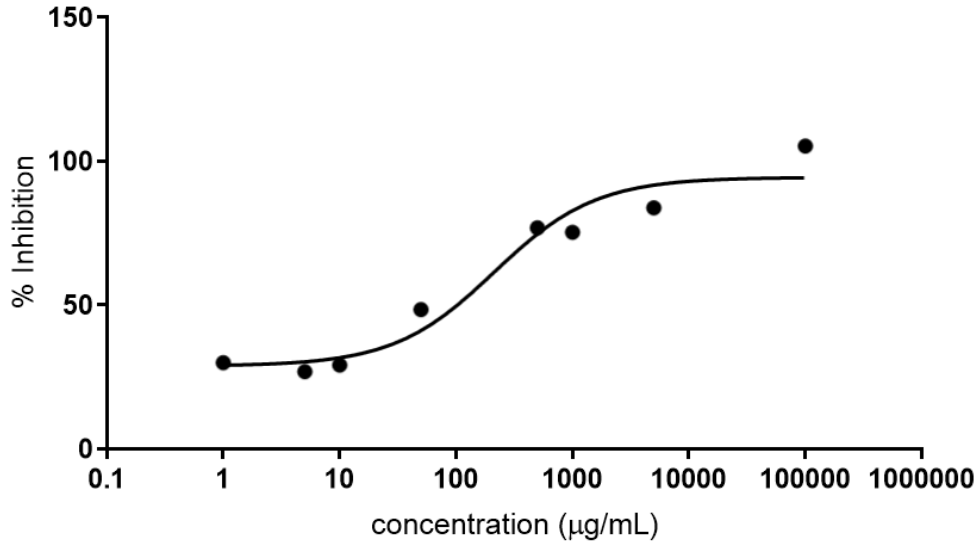
รูปที่ ก-1 ผลการทดสอบปริมาณโปรตีน และปริมาณต่าง ๆ ในโปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าวสังข์หยด

ภาคผนวก ข

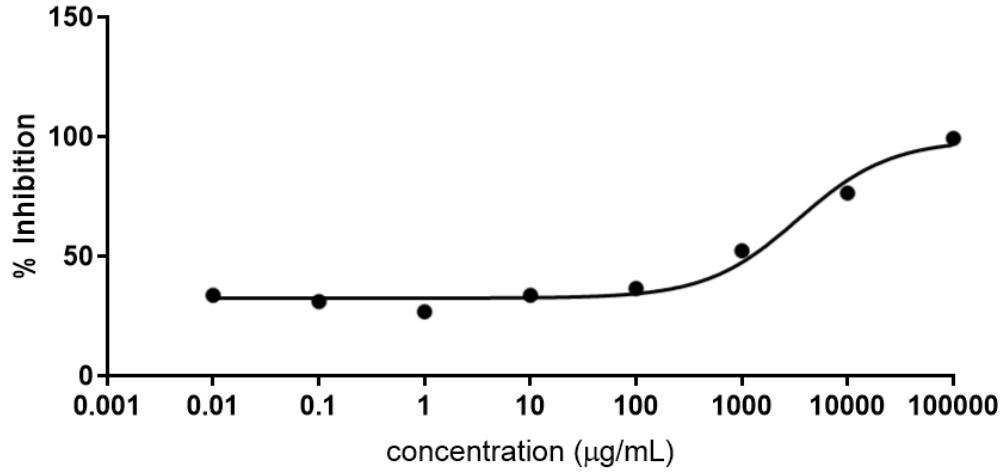
กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition กับความเข้มข้นของสารตัวอย่างของโปรตีนชนิดต่าง ๆ



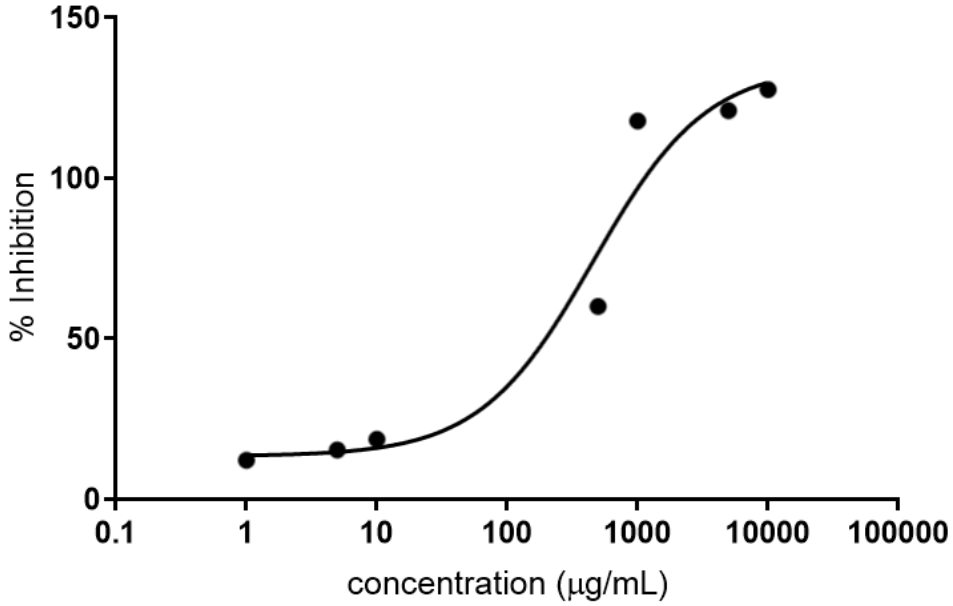
รูปที่ ข-1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition กับความเข้มข้นของ Albumin powder



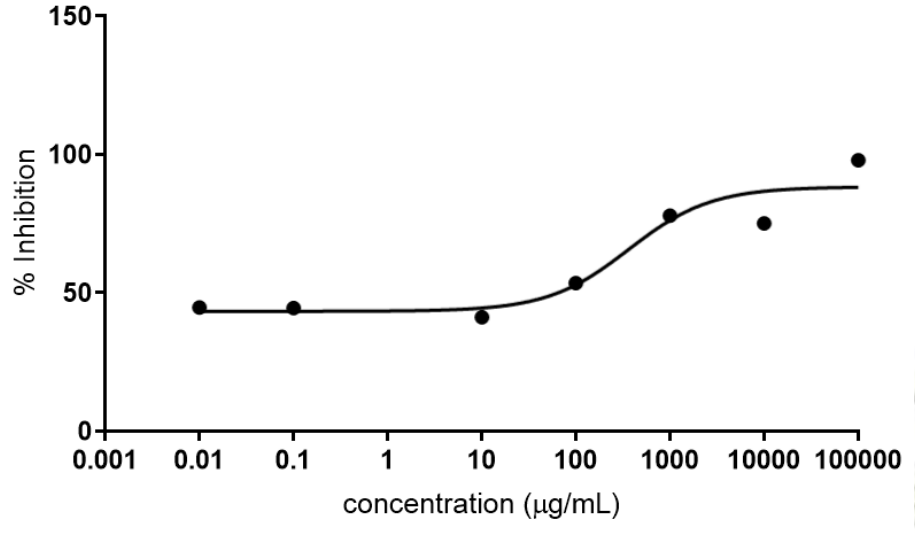
รูปที่ ข-2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition กับความเข้มข้นของ hydrolysate protein (HD) จากรำข้าวสังข์หยด



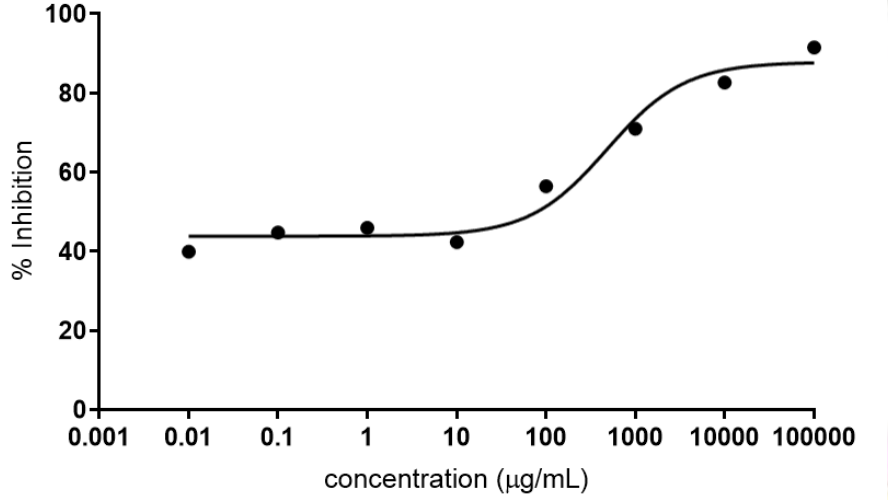
รูปที่ ข-3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition กับความเข้มข้นของ whey protein isolate



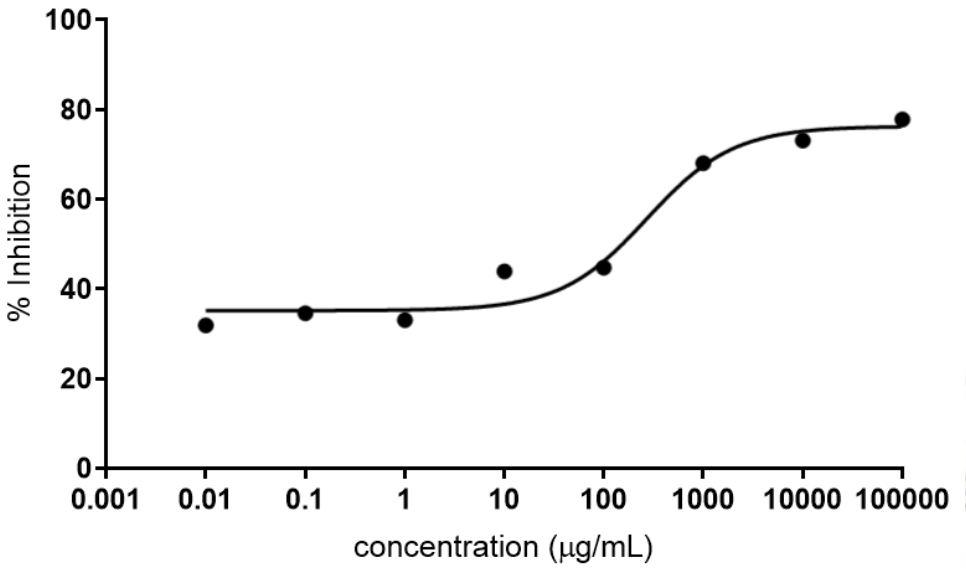
รูปที่ ข-4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition กับความเข้มข้นของ 5% HD + albumin powder



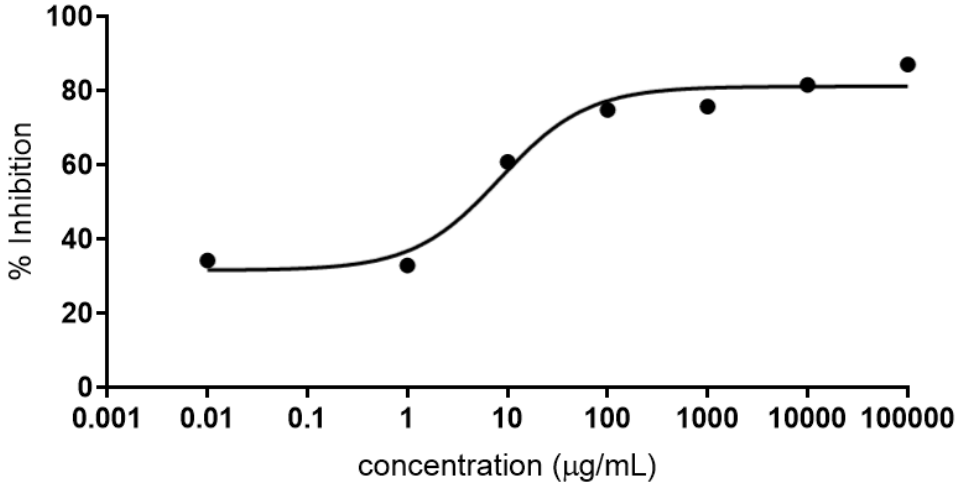
รูปที่ ข-5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition กับความเข้มข้นของ 10% HD + albumin powder



รูปที่ ข-6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition กับความเข้มข้นของ 5% HD + whey protein Isolate



รูปที่ ข-7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition กับความเข้มข้นของ 10% HD + whey protein Isolate



รูปที่ ข-8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition กับความเข้มข้นของ Ascorbic acid

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวณัชชา ศรีเจริญ เกิดเมื่อวันที่ 7 เดือนมกราคม พ.ศ. 2539 ที่จังหวัดสมุทราปราการ สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจาก โรงเรียนอัสสัมชัญสมุทรปราการ จังหวัดสมุทรปราการ เมื่อปีการศึกษา 2556 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2557 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 250/545 ตำบลบางปลา อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทราปราการ รหัสไปรษณีย์ 10540 อีเมล Natcha.Sricharoen@gmail.com