

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวเป็นธัญพืชอาหารที่สำคัญของคนไทย คนเอเชีย รวมไปถึงประชากรอีกหลายชนชาติบนโลกใบนี้ ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการปลูกข้าวเป็นอันดับต้นๆของโลกและเป็นผู้ส่งออกข้าวรายใหญ่ของตลาดโลกโดยข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่ทำรายได้ให้ประเทศปีละไม่ต่ำกว่า 65,000 ล้านบาท โดยการส่งออกข้าวของไทยตลอด 10 ปีที่ผ่านมา มีแนวโน้มสูงขึ้นจาก 6.37 ล้านตันข้าวสาร ในปี พ.ศ. 2541 เป็น 10.01 ล้านตันข้าวสาร ในปี พ.ศ. 2551 สำหรับปริมาณการส่งออกข้าวในปี 2554 ปริมาณการส่งออกข้าวไทยมีจำนวน 10.67 ล้านตันข้าวสาร คิดเป็นมูลค่า 192,956 ล้านบาท (สมพร อิศวิลานนท์ และ ประพทย์ สันติธรรมรักษ์ 2555) ข้าวหอมมะลิเป็นสายพันธุ์ข้าวที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย จัดเป็นข้าวนาปี นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายทั้งในและต่างประเทศ เป็นพันธุ์ข้าวที่ทำให้ข้าวไทยเป็นสินค้าส่งออกที่รู้จักไปทั่วโลก ปลูกได้คุณภาพดีเฉพาะในประเทศไทย ผลผลิตข้าวหอมมะลิของไทยในปี 2549 มีพื้นที่เพาะปลูก 19.30 ล้านไร่ และมีปริมาณผลผลิต 6.49 ล้านตันข้าวเปลือก (ตลาดสินค้าล่วงหน้าแห่งประเทศไทย 2551) ในกระบวนการแปรรูปข้าวผลิตผลพลอยได้จากการขัดสีข้าวเปลือกที่สำคัญ คือ รำข้าว เป็นส่วนที่ได้จากการขัดข้าวกล้องให้เป็นข้าวสาร ประกอบด้วยชั้นเยื่อหุ้มเมล็ดและคัพภะเป็นส่วนใหญ่ โดยทั่วไปจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ รำหยาบ (bran) ซึ่งได้จากการขัดผิวเมล็ดข้าวกล้อง และรำละเอียด (polish) ได้จากการขัดขาวและขัดมัน โดยข้าวเปลือกเมื่อผ่านการขัดสีจะให้รำข้าวประมาณร้อยละ 10 ของข้าวเปลือกทั้งหมด (วันชัย 2541 อ้างใน อรอนงค์ 2547) ซึ่งมีปริมาณโปรตีนสูงถึงร้อยละ 11.3–14.9 (จารุดา วิเศษสรโรช 2545) ซึ่งในปี 2553 มีรำข้าวเป็นผลผลิตพลอยได้จากการขัดสีข้าวประมาณ 3.2 แสนตัน ดังนั้นมีปริมาณโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณ 3.6–4.8 หมื่นตัน การนำรำข้าวมาใช้ประโยชน์โดยเฉพาะการผลิตน้ำมันรำข้าวทำให้เกิดส่วนกากที่เหลือจากการสกัดหรือบิบน้ำมันซึ่งยังมีโปรตีนอยู่สูงถึงร้อยละ 15.86 (สุนันทา วงศ์ปิยชน และ วชิร สุขวิวัฒน์ 2542) หากสามารถเพิ่มมูลค่าของโปรตีนจากรำข้าวโดยการนำมาแปรรูปจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการแปรรูปข้าว

การย่อยอาหารประเภทโปรตีนด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) เป็นกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีองค์ประกอบของเปปไทด์ที่แสดงกิจกรรมทางชีวภาพต่างๆ เรียกว่า “ไบโอแอคทีฟเปปไทด์” (bioactive peptides) ซึ่งมีคุณสมบัติสำคัญ ได้แก่ การลดความดันเลือด การต้านออกซิเดชัน การต้านจุลินทรีย์ ความสามารถในการลดคอเลสเตอรอล การแข็งตัวของหลอดเลือด เสริมการดูดซึมแร่ธาตุ และเป็นสารช่วยลดความเจ็บปวด เป็นต้น อัตราการตายด้วยโรคความดันเลือดสูงของคนไทยมีแนวโน้มสูงขึ้น ปัจจุบันมียาสังเคราะห์หลายตัวสามารถยับยั้งเอนไซม์เอซีอี (angiotensin converting enzyme, ACE) ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดความดันเลือดสูง อย่างไรก็ตามยาเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งได้เพียงระยะสั้น อาจมีผลข้างเคียงและทำลายไตในขั้นตอนการขับถ่ายออกจากร่างกาย ความดันเลือดต่ำในผู้ป่วยบางราย และ

ระดับโพแทสเซียมในเลือดสูงขึ้น จนเป็นสาเหตุที่ต้องทำให้หยุดการใช้ยา (Li และคณะ 2005) โปรตีนไฮโดรไลเซสที่มีคุณสมบัติลดความดันได้จากการย่อยโปรตีนในอาหารจึงมีความปลอดภัยและไม่มีผลข้างเคียง

เปปไทด์ที่ได้จากกระบวนการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรตีนเนส (proteinase) มีคุณสมบัติยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เอซีอี (ACE) ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากมีศักยภาพในการรักษาโรคความดันเลือดสูง (hypertension) (Li และคณะ 2004) จากการศึกษาของ หทัยกาญจน์ กนกแก้ว (2550) ในการผลิตเปปไทด์จากรำข้าวหอมมะลิของไทย พบว่าสามารถผลิตเปปไทด์จากโปรตีนรำข้าวหอมมะลิโดยการผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซสซึ่งได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ ได้เปปไทด์จากโปรตีนรำข้าวหอมมะลิที่มีคุณสมบัติต้านไบโอแอคทีฟเปปไทด์โดยช่วยยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เอซีอี ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดความดันเลือดสูงและการต้านอนุมูลอิสระ สรญา ชิมาชัย (2554) ได้ศึกษาผลของการย่อยโปรตีนรำข้าวหอมมะลิด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวและกรองด้วยเทคนิคไมโครฟิลเทรชันต่อคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเซส พบว่าเปปไทด์ที่มีขนาดน้อยกว่า 50 กิโลดาลตัน (< 10 kDa และ 10–50 kDa) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) และ ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ความสามารถในการจับเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) และคุณสมบัติการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี ดีกว่าเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ (ไม่แยกส่วน และ > 50 kDa)

ในปัจจุบันผู้บริโภคเริ่มใส่ใจดูแลสุขภาพมากขึ้นซึ่งเปปไทด์ที่ได้จากโปรตีนรำข้าวหอมมะลิสามารถเติมลงในอาหารเพื่อประโยชน์ด้านสุขภาพ อย่างไรก็ตามการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารจำเป็นต้องผ่านกระบวนการแปรรูป และ/หรือเติมส่วนผสมต่างๆ เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพตามความต้องการ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้อาจมีผลต่อความคงตัวของเปปไทด์รำข้าวที่เติมลงในผลิตภัณฑ์ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความคงตัวของไบโอแอคทีฟเปปไทด์จากรำข้าวหอมมะลิโดยการผสมลงในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำผลไม้เพื่อเป็นการพัฒนาโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเซสให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงในการผลิตเชิงพาณิชย์ โดยศึกษาถึงผลของความร้อน ปริมาณน้ำตาล และความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งล้วนมีผลต่อความคงตัวในการแสดงคุณสมบัติการเป็นสารช่วยลดความดันเลือดสูงและด้านการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซสจากรำข้าวหอมมะลิ โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อความคงตัวของไบโอแอคทีฟเปปไทด์ในครั้งนี้จะเป็ประโยชน์ในการนำโปรตีนรำข้าวหอมมะลิไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่เป็นประโยชน์ทางด้านสุขภาพสำหรับผู้บริโภคต่อไป

2. วัตถุประสงค์

- 2.1 เพื่อศึกษองศ์ประกอบทางเคมีของกากรำข้าวและโปรตีนสกัดจากกากรำข้าว
- 2.2 เพื่อศึกษาผลของการแยกส่วนด้วยเทคนิคอัลตราฟิลเทรชันและความร้อนต่อความคงตัวของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเซสพลงในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองแบบขง
- 2.3 เพื่อศึกษาผลของปริมาณน้ำตาล ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความร้อน ต่อความคงตัวของ

โปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงที่ไม่ผ่านและผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชันในผลิตภัณฑ์ เครื่องดื่มจำลองแบบซง

3. ขอบเขตและข้อจำกัดของการวิจัย

3.1 ทำการผลิตเปปไทด์ผงจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่ผ่านกระบวนการบีบน้ำมันแบบเย็น โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนทางการค้า (Protease G6) ใช้สภาวะการผลิตที่ได้วิจัยมาแล้ว

3.2 ทำการผลิตเปปไทด์จากรำข้าวผง 2 ขนาด คือ ไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชัน ศึกษาความคงตัวของเปปไทด์รำข้าวเมื่อเติมลงในเครื่องดื่มจำลองที่มีการแปรปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ขนาดของเปปไทด์ ปริมาณน้ำตาล (0-15%) ความเป็นกรด – ด่าง (pH 3.5 4.5 และ 7) และความร้อน (น้ำอุณหภูมิห้อง (~30°C) และน้ำร้อนอุณหภูมิ 95°C)

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

4.1 ทราบผลของสภาวะการแปรรูปต่อคุณสมบัติการยับยั้งเอนไซม์เอซีอีและการต้านออกซิเดชันของเปปไทด์รำข้าว

4.2 สามารถผลิตผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพที่เติมเปปไทด์รำข้าวที่มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์เอซีอีและการต้านออกซิเดชันได้ดี

4.3 เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไปเพื่อเพิ่มศักยภาพของการแข่งขันของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสทจากแหล่งอื่นที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากอุตสาหกรรมต่างๆ นำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์เพื่อเป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของไบโอแอคติฟเปปไทด์

เปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลสที่ผลิตได้จากแหล่งอาหารชนิดต่างๆ สามารถพัฒนาไปเป็นอาหารเพื่อสุขภาพต่อไป บทบาทที่สำคัญของเปปไทด์ คือ มีคุณสมบัติด้านไบโอแอคติฟโดยสามารถลดความดันเลือดสูงได้จากการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เอซีอี ยับยั้งจุลินทรีย์ และด้านการเกิดออกซิเดชัน เป็นต้น เปปไทด์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวสามารถแยกได้จากแหล่งโปรตีนหลายชนิด ได้แก่ โปรตีนเวย์ เคซีน ปลาทูน่า เห็ด โปรตีนสกัดจากดอกทานตะวัน โปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วแดง เป็นต้น (Li and others 2004) ส่วนงานวิจัยที่ศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนข้าวในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เอซีอีนั้น มีการศึกษาโดยใช้แหล่งวัตถุดิบแตกต่างกัน เช่น ข้าวทั้งเมล็ด รำข้าว ผลผลิตพลอยได้ของตะกอนหรือกากข้าว (rice dregs) จากการผลิตสาเก (sake lee) ไวน์ข้าว (rice wine) โมโนโซเดียมกลูตาเมต หรือกลูโคส ตัวอย่าง เช่น มีการย่อยโปรตีนเข้มข้นจากข้าวคั่วด้วยเอนไซม์อัลคาเลส จากนั้นนำโปรตีนไฮโดรไลสมาแยกส่วนด้วยเทคนิคอัลตราฟิลเตรชันเมมเบรนขนาด 10 และ 5 กิโลดาลตัน พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสที่มีเปปไทด์น้ำหนักโมเลกุลต่ำมีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์เอซีอีและช่วยลดจำนวนของสารอนุมูลอิสระ (Aluko and Monu 2004)

1. กระบวนการแปรรูปด้วยความร้อน (Heat treatment)

กระบวนการแปรรูปด้วยความร้อนเป็นวิธีการดั้งเดิมที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น กระบวนการทำให้สุก การเซ็ทเจล ไล้กรอกและขนมปัง เป็นต้น ซึ่งส่งผลกระทบต่อ การเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางโภชนาการขึ้นอยู่กับปริมาณความร้อนที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้การแปรรูปด้วยความร้อนสามารถใช้ปรับปรุงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ เช่น ความสามารถในการอุ้มน้ำและการเกิดอิมัลชัน แต่ความร้อนมีผลทำให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนลดลง เนื่องจากโปรตีนเกิดการตกตะกอน เช่น กระบวนการฆ่าเชื้อนมโดยความร้อนแบบพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 15 วินาที พบว่าไม่มีผลกระทบต่อกิจกรรมทางชีวภาพของโปรตีนเวย์ ส่วนการใช้ความร้อนสูงทำให้โปรตีนเสียสภาพแบบผันกลับไม่ได้ เช่น แอลฟาแลคตัลบูมิน (alpha-lactalbumin) แต่บางครั้งสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงแบบผันกลับได้เมื่อใช้ค่าความเป็นกรดต่ำหรือสูงกว่า 3.3 ซึ่งความสามารถในการเปลี่ยนแปลงแบบผันกลับได้ขึ้นอยู่กับปริมาณแคลเซียม นอกจากนี้ความร้อนยังทำให้เกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล (maillard reaction) หรือการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลโดยไม่ใช้เอนไซม์ (non enzymatic reaction) ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ระหว่างกรดอะมิโนไลซีนกับน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ที่พบในคาร์โบไฮเดรตและเป็นส่วนประกอบของอาหาร อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์นมมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล เนื่องจากมีน้ำตาลแลคโตส (lactose)

และกรดอะมิโนไลซีนอยู่เป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตามเมื่อผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนแบบพาสเจอร์ไรส์ ความร้อนไม่สามารถทำลายโครงสร้างของกรดอะมิโนไลซีนได้ แต่ส่งผลกระทบต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสและลดคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ รวมถึงทำให้เกิดผลเสียต่อเซลล์ในร่างกาย และนำไปสู่สาเหตุของการเกิดโรคในร่างกาย (Korhonen and Pihlanto 2006)

Wu and Ding (2002) พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเซตที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส หลังจากนำสารละลายเปปไทด์ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาผ่านกระบวนการให้ความร้อนโดยใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 20 40 60 80 และ 100 °C นาน 2 ชั่วโมง พบว่าการใช้อุณหภูมิและระยะเวลาในการให้ความร้อนแตกต่างกันไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yoshie-Stark and others (2006) ได้นำเมล็ดลูปิน (lupin seed) ผ่านเครื่องบดแบบแห้ง (dry mill) แยกเปลือกและเมล็ด และนำส่วนของเมล็ดมาบดละเอียดด้วยเครื่องบดแบบลูกกลิ้ง (roll mill) นำไปสกัดไขมันออกโดยใช้เฮกเซน (hexane) ก่อนนำมาสกัดโปรตีน โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยกรด นำสารละลายแขวนลอยของโปรตีนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 หลังจากนั้นนำมาให้ความร้อนแบบพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 65 85 และ 125 °C นาน 10 100 และ 1000 วินาที ส่วนสารละลายแขวนลอยของโปรตีนที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิง พบว่าสารละลายแขวนลอยของโปรตีนที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนมีกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์เอซีอีคิดเป็นร้อยละ 11.5 ส่วนร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์เอซีอีเมื่อผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 85 และ 125 °C อยู่ในช่วงร้อยละ 14-17.7, 10.5 -14.3 และ 0 -2.72 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการเปรียบเทียบกับสารละลายแคปโตพริล (captopril) ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสามารถยับยั้งเอนไซม์เอซีอีได้ร้อยละ 46 ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า สารละลายแขวนลอยของโปรตีนที่ไม่ผ่านและผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 และ 85 °C มีร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์เอซีอีไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) อย่างไรก็ตามการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 125 °C ทำให้ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์เอซีอีลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ($p\leq 0.05$) ส่วนระยะเวลาในการให้ความร้อนไม่มีผลต่อร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ ดังนั้นการพาสเจอร์ไรส์โดยใช้ความร้อนสูงทำให้ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์เอซีอีลดลงอย่างเห็นได้ชัด Rivas and others (2007) ได้ทดสอบความคงตัวของเปปไทด์ยับยั้งเอนไซม์เอซีอีจากการหมักโปรตีนเวย์และเติมลงในเครื่องคั้นนมผสมน้ำส้มที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 75 °C นาน 1 นาที และค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.99 หลังจากนั้นบรรจุเครื่องคั้นปริมาตร 150 มิลลิลิตรในถุงโพลีเอทิลีน (polyethylene bag) นำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 84 และ 95 °C นาน 140 วินาที พบว่าเครื่องคั้นนมผสมน้ำส้มที่ผ่านการให้ความร้อนทั้ง 2 อุณหภูมิ มีอัตราส่วนของการยับยั้งเอนไซม์เอซีอีไม่แตกต่างกัน ส่วนระยะเวลาการให้ความร้อนไม่มีผลต่ออัตราส่วนของ การยับยั้งเอนไซม์เอซีอี (ACE) นอกจากนี้ Hwang (2010) ได้ศึกษาผลของกระบวนการแปรรูปต่อความคงตัวของเปปไทด์ โดยใช้สารละลายโอลิโกเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยน้ำคั้นพว้านด้วยเอนไซม์โอเรียนเทส ที่มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 204-265 ดาลตัน หลังจากนั้นนำสารละลายโอลิโกเปปไทด์ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ

20 40 60 80 และ 100 °ซ นาน 2 ชั่วโมง พบว่าการใช้อุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนแตกต่างกัน ไม่มีผลต่อร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี Contreras and others (2011) ได้ศึกษาความคงตัวของ เปปไทด์จากเคซีน (RYLGY และ AYFYPEL) ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน นำมาผ่าน กระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งระเหิดและแบบพ่นฝอย (อุณหภูมิเข้า 140 °ซ ขาออก 75-100 °ซ) พบว่ากระบวนการทำแห้งทั้ง 2 วิธีไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณและกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี ของเปปไทด์ ($p > 0.05$) และเมื่อเติมเปปไทด์ทั้งสองชนิดลงในโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่ผ่านกระบวนการโฮโมจีไนซ์และการพาสเจอร์ไรซ์ที่ 2 สภาวะ ได้แก่ ที่ 180 บาร์ อุณหภูมิ 95 °ซ นาน 7 นาที และ 50 บาร์ อุณหภูมิ 90 °ซ นาน 30 วินาที แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า เปปไทด์ 2 ชนิด มีความคงตัวต่อกระบวนการโฮโมจีไนซ์และการพาสเจอร์ไรซ์ โดยไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเปปไทด์

2. ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

จากการรายงานของ Hwang (2010) พบว่า สารละลายโอลิโกเปปไทด์จากน้ำต้มหนูที่ความเป็นกรด-ด่าง 2 4 6 8 และ 10 มีความคงตัวที่ดี มีกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์เอซีอีและปริมาณของเปปไทด์เหลืออยู่สูงหลังผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 °ซ นาน 2 ชั่วโมง สอดคล้องกับการศึกษาของ Wu and Ding (2002) โดยการบ่มเปปไทด์จากโปรตีนถั่วเหลือง (ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่มีสมบัติยับยั้งเอนไซม์เอซีอี ความเป็นกรด-ด่าง 2 – 10 (อุณหภูมิ 40 °ซ) ซึ่งไม่พบการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์เอซีอีของเปปไทด์จากโปรตีนถั่วเหลืองเมื่อใช้ความเป็นกรด-ด่างและสภาวะในการให้ความร้อนเดียวกัน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง มีผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่โดยการตัดแปลงกรดอะมิโนหนึ่งชนิดหรือมากกว่าหนึ่งชนิด เช่น ในสภาวะกรดทำลายกรดอะมิโนกลูตามีนและแอสพาราจिन ส่วนการใช้ด่างทำลายกรดอะมิโนเซรีน ฮิสทีดีน ทรีโอนีน นอกจากนี้ยังทำให้เกิดไลซิโนะลาโนนและเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโน แต่พบการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเปปไทด์เพียงเล็กน้อยหลังผ่านกระบวนการดังกล่าว (Wu and Ding 2002)

3. ความเป็นกรด-ด่าง ร่วมกับการให้ความร้อน

จากการศึกษาของ Reunanen and Saris (2004) พบว่าไนซิน (Nisin) ที่เป็นเปปไทด์ยับยั้งจุลินทรีย์ ที่ได้จาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ในไส้กรอกมีความทนทานต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 70 °ซ Davies and others (1998) ได้ศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อความคงตัวของสารละลายไนซิน โดยนำสารละลายไนซินความเข้มข้น 10000 IU ml⁻¹ มาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 1 – 5 จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการใช้อุณหภูมิสูงภายใต้ความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 115 °ซ เป็นเวลา 20 นาที และอุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่ากิจกรรมไนซิน (residual nisin activity) และเก็บไว้เป็นเวลา 2 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าสารละลายไนซินมีความคงตัวมากที่สุดที่ค่าความเป็น

กรด-ด่างเท่ากับ 3 ทั้งการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 115 °ซ (20 นาที) และการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121°ซ (15 นาที) โดยที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่าและสูงกว่า 3 มีปริมาณในซินลดลง ซึ่งจะเห็นว่าการให้อุณหภูมิทั้งสองสภาวะมีปริมาณในซินสูญเสียเหมือนกัน โดยที่อุณหภูมิสูงมาก (121°ซ) มีผลทำให้ปริมาณในซินสูญเสียไปบางส่วน แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างที่ใช้ด้วย

Korhonen and others (2006) รายงานว่ากระบวนการแปรรูปกรดอะมิโนอะลานีน ซีสเทอีน และฟอสโฟเซอรีน ด้วยความร้อนในสภาวะด่างหรือใช้อุณหภูมิสูงกว่า 200 °ซ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 นำไปสู่การเกิดปฏิกิริยาดีไฮโดรอะลานีน (dehydroalanine) และทำให้เกิดไลซีนอะลานีน (lysinoalanine ; LAL) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนไลซีน อาร์จินีน และซีสเทอีน กระบวนการแปรรูปด้วยความร้อนในสภาวะด่าง นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโน เช่น อาร์จินีน ซีรีน ทรีโอนีน และไลซีน เช่น การสลายตัวของกรดอะมิโนอาร์จินีนทำให้เกิดออร์นิทีน (ornithine) เป็นต้น และเกิดการเปลี่ยนโครงสร้างของกรดอะมิโนแบบแอล (L-amino) เปลี่ยนเป็นแบบดี (D-amino) โดยเฉพาะกรดอะมิโนที่มีหมู่โซ่ข้างที่มีประจุในโครงสร้างของโปรตีน เช่น แอสพาราจีน ซีรีน ซีสเทอีน กลูตามีน ฟีนิลอะลานีน แอสพาราจีน และไทโรซีน

4. ผลของสภาวะการเก็บรักษาต่อความคงตัวของเปปไทด์

อาหารต่างๆมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางเคมีและชีวภาพในระหว่างการเก็บรักษา วัตถุประสงค์ของการเก็บรักษาต้องการควบคุมตัวแปรต่างๆ ซึ่งทำให้ปฏิกิริยาต่างๆ เกิดขึ้นอย่างเหมาะสม เพื่อให้ได้คุณภาพของผลิตภัณฑ์ตามที่ผู้บริโภคต้องการ เช่น คุณค่าทางอาหาร คุณภาพทางประสาทสัมผัส อายุการเก็บ ความสะดวก เป็นต้น ดังนั้นระยะเวลาในการเก็บรักษาเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความคงตัวของเปปไทด์ ซึ่งส่งผลกระทบต่อการใช้ประโยชน์ของโปรตีนเข้าสู่ร่างกาย Rivas and others (2007) ได้ศึกษาความคงตัวของเปปไทด์ยับยั้งเอนไซม์เอซีอีจากการหมักโปรตีนเวย์และเติมลงในเครื่องดื่มผสมน้ำส้ม แล้วนำมาให้ความร้อนระดับพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 84°ซ นาน 140 วินาที พบว่าเมื่อนำตัวอย่างไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 81 วัน กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ ACE ไม่แตกต่างกันในทุกตัวอย่าง Thiansilakul and others (2007) ได้ศึกษาความคงตัวของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากปลาทุแอกครีบยาว (round scad) ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ฟเลเวอร์ไรซ์ (Flavourzyme) พบว่าค่าดัชนีการละลายของไนโตรเจน (Nitrogen solubility index, NSI) เริ่มต้นมีค่าร้อยละ 99 แต่เมื่อเก็บรักษาโปรตีนไฮโดรไลเสทที่อุณหภูมิ 25 และ 4 °ซ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสททั้งสองสภาวะลดลงเล็กน้อย โดยอธิบายว่าสาเหตุที่ทำให้การละลายลดลงเนื่องจากการรวมตัวกันของเปปไทด์

สำหรับค่ากิจกรรมการจับอนุมูล DPPH ค่าความสามารถในการรีดิวซ์ (reducing power) และความสามารถในการจับโลหะ (Fe^{2+}) มีค่าร้อยละ 59.9, 1.01 และ 58.2 ตามลำดับ แต่เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 25 °ซ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ากิจกรรมการจับอนุมูล DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเสท

ลดลงเล็กน้อยในช่วงสัปดาห์แรกและหลังจากระยะเวลาการเก็บ 1 สัปดาห์พบการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งทั้งสองสภาวะมีค่ากิจกรรมการจับอนุมูล DPPH ไม่แตกต่างกัน สำหรับการเปลี่ยนแปลงค่าความสามารถในการรีดิวซ์ พบว่าลดลงเล็กน้อยเมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้นแต่ทั้งสองสภาวะมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์ไม่แตกต่างกัน และสำหรับการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการจับโลหะ (Fe^{2+}) ของโปรตีนไฮโดรไลสพบว่ามีค่าลดลงที่เห็นได้อย่างชัดเจนในช่วงเวลา 2 – 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นก็มีค่าคงตัว สาเหตุที่ค่ากิจกรรมการต้านออกซิเดชันลดลงเนื่องจากการทำลายสารประกอบต้านออกซิเดชันเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นทำให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมการต้านออกซิเดชันอย่างไรก็ตามแม้ว่ากิจกรรมการต้านออกซิเดชันจะลดลงเล็กน้อยแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

สำหรับการเปลี่ยนแปลงค่าสีของโปรตีนไฮโดรไลสทในระหว่างการเก็บรักษา พบว่าสีของโปรตีนไฮโดรไลสทที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งระเหิดมีสีเหลืองอมน้ำตาล ($L^* = 58.00$, $a^* = 8.38$ และ $b^* = 28.32$) แต่เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่า L^* , a^* และ b^* ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลสท ในขณะที่ที่อุณหภูมิ 25°C พบว่าค่า L^* ลดลง แต่ค่า b^* เพิ่มขึ้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่าตัวอย่างมีสีคล้ำขึ้น แสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงของค่าสีเกิดขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น สาเหตุที่โปรตีนไฮโดรไลสทมีสีคล้ำเนื่องจากเกิดการรวมตัวกันของสีน้ำตาลจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลโดยไม่ใช้เอนไซม์ที่ทำให้เกิดความคล้ำในผลิตภัณฑ์อาหาร

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 วัตถุดิบ

ตัวอย่างรำข้าวพันธุ์หอมดอกมะลิ 105 (รำละเอียด) ที่เหลือจากการบีบน้ำมันแบบเย็นได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มวิสาหกิจชุมชนเกษตรอินทรีย์ จังหวัดลพบุรี นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น ไขมัน และโปรตีน (AOAC 2000) นำมาสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์ทางการค้า Protease G6 (Bacterial alkaline protease ซึ่งผลิตจาก *Bacillus licheniformis*, Genencor, USA)

1.2 สารเคมี เกรดสำหรับการวิเคราะห์

- 1.2.1 กรดแกลลิก (Gallic acid) Ar-Grade ผลิตโดยบริษัท Fluka ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.2.2 กรดซิตริก (Citric acid) ผลิตโดยบริษัท Ajax Finechem Pty Ltd ประเทศออสเตรเลีย
- 1.2.3 กรดบอริก (Boric acid) Ar-Grade ผลิตโดยบริษัท Ajax Finechem Pty Ltd ประเทศออสเตรเลีย
- 1.2.4 กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) Ar-Grade ผลิตโดยบริษัท Merck KGaA ประเทศเยอรมัน
- 1.2.5 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ผลิตโดยบริษัท Merck KGaA ประเทศเยอรมัน
- 1.2.6 เกลือเฮฟส์โซเดียม (HEPES sodium salt) ผลิตโดยบริษัท Bio Basic, Inc. ประเทศแคนาดา
- 1.2.7 คอปเปอร์ซัลเฟต ($Cu_2SO_4 \cdot 5H_2O$) ผลิตโดยบริษัท Ajax Finechem Pty Ltd ประเทศออสเตรเลีย
- 1.2.8 ควิโนลีน (Quinoline) ผลิตโดยบริษัท Sigma-Aldrich Chemicals ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.2.9 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ผลิตโดยบริษัท Asia Pacific Speciality Chemicals ประเทศออสเตรเลีย
- 1.2.10 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ผลิตโดยบริษัท Ajax finechem Pty Ltd ประเทศออสเตรเลีย
- 1.2.11 โซเดียมซิเตรต ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$) ผลิตโดยบริษัท Ajax Finechem Pty Ltd ประเทศออสเตรเลีย
- 1.2.12 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ผลิตโดยบริษัท RIC Labscan ประเทศไทย
- 1.2.13 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) ผลิตโดยบริษัท Ajax Finechem Pty Ltd ประเทศออสเตรเลีย

- 1.2.14 สารมาตรฐาน 2,2'-ไดฟีนิล-1-ไพคริลไฮดราซิด (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH) ผลิตโดยบริษัท Sigma-Aldrich Chemicals ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.2.15 สารมาตรฐาน โทรลอกซ์ (6-hydroxy-2,5,7,8 tetramethyl-chloroman-2-carboxylic acid; Trolox) ผลิตโดยบริษัท Sigma-Aldrich Chemicals ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.2.16 เบนซีนซัลโฟนิลคลอไรด์ (Benzene sulfonyl chloride; BSC) ผลิตโดยบริษัท Sigma-Aldrich Chemicals ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.2.17 โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumine) ผลิตโดยบริษัท Sigma-Aldrich Chemicals ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.2.18 ปีโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) Ar-Grade ผลิตโดยบริษัท RCI Labscan ประเทศอินเดีย
- 1.2.19 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ผลิตโดยบริษัท Ajax Finechem Pty Ltd ประเทศออสเตรเลีย
- 1.2.20 โพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) ผลิตโดยบริษัท Ajax Finechem Pty Ltd ประเทศออสเตรเลีย
- 1.2.21 โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) ผลิตโดยบริษัท Ajax Finechem Pty Ltd ประเทศออสเตรเลีย
- 1.2.22 โฟลินฟีนอล (folin-Ciocalteu' phenol reagent) ผลิตโดยบริษัท Carlo Erba Reactifs SA ประเทศฝรั่งเศส
- 1.2.23 เฟอโรซีน (3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4'-4''-disulfonic acid) ผลิตโดยบริษัท Sigma-Aldrich Chemicals ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.2.24 เมทานอล (Methanol) ผลิตโดยบริษัท Merck KGaA ประเทศเยอรมัน
- 1.2.25 เมทิลเรด (Methylred) Ar-Grade ผลิตโดยบริษัท Merck KGaA ประเทศเยอรมัน
- 1.2.26 เอทานอล (Ethanol) ผลิตโดยบริษัท Merck KGaA ประเทศเยอรมัน
- 1.2.27 เอนไซม์ย่อยแองจิโอเทนซิน I (Angiotensin I-converting enzyme; EC 3.4.15.1 from rabbit lung) ผลิตโดยบริษัท Sigma-Aldrich Chemicals ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.2.28 ฮิปพิวริล-แอล-ฮิสทิดิล-แอล-ลิวซีน (Hippury-L-histidyl-L-Leucine; HHL) ผลิตโดยบริษัท Sigma science ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.2.29 สารมาตรฐาน 2,2'-เอซินิกิโนบิส (3-เอซิลเบนโซไทโซลิโน-6-ซัลโฟนิคแอซิด) (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid; ABTS) ผลิตโดยบริษัท Sigma-Aldrich Chemicals ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.2.30 ไอรอน (II) คลอไรด์ (Iron (II) Chloride) ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ผลิตโดยบริษัท BHD ประเทศอังกฤษ

- 1.2.31 สารมาตรฐาน เอธิลีนไดเอมีนเตตระอะซีติกแอซิด (Ethylene diamine tetraacetic acid; EDTA) ผลิตโดยบริษัท BHD ประเทศอังกฤษ
- 1.2.32 มอลโตเดกซ์ตริน (Maltodextrin ; DE 10) ผลิตโดยบริษัท Abbra Corporation Limited

1.3 อุปกรณ์

- 1.3.1 เครื่องชั่งละเอียด (Analytical Balance) รุ่น AB 104 ทศนิยม 4 ตำแหน่ง บริษัท Meter toledo ประเทศ สวิสเซอร์แลนด์
- 1.3.2 เครื่องชั่งละเอียด (Analytical Balance) รุ่น PB 303 ทศนิยม 3 ตำแหน่ง บริษัท Meter toledo ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- 1.3.3 เครื่องบดอาหาร รุ่น warning commercial บริษัท New Hartford ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.3.4 เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกสาร (centrifuge) ยี่ห้อ Thermofisher scientific รุ่น sorvall legend mach 1.6 R ประเทศเยอรมัน
- 1.3.5 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง รุ่น FiveEasyTMFE20-I บริษัท mettler Toledo group ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- 1.3.6 เครื่องวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน รุ่น Kjeltac system 1026 Distilling unit บริษัท Tecator ประเทศสวีเดน
- 1.3.7 เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (extraction unit) รุ่น Soxtec system HT1043 บริษัท Tecator ประเทศสวีเดน
- 1.3.8 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น perkin elmer precisely lambda 25 uv/vis บริษัท Perkin Elmer Instrument spectrophotometer ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.3.9 เตาให้ความร้อน (Hot plate) รุ่น HC 502 บริษัท Bibby ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.3.10 โถดูดความชื้น
- 1.3.11 ตู้อบลมร้อน (Cabinet Dryer) รุ่น F1079712 บริษัท Hanna ประเทศเยอรมัน
- 1.3.12 เครื่องปิดผนึกแบบสุญญากาศ
- 1.3.13 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Haak D10 บริษัท United instrument ประเทศเยอรมัน
- 1.3.14 อัลตราฟิลเทรชัน รุ่น Kwick Start cassettes บริษัท GE Healthcare ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.3.15 ถังปฏิมากรณ์ (Fermenter) รุ่น Bosstech model CB-1 บริษัท B. Braun Biotech International
- 1.3.16 อุปกรณ์เครื่องแก้วเพื่อใช้ในการทดลอง

2. วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำการำข้าวหลังผ่านการบีบน้ำมันแบบเย็น (cold press) มาบรรจุแบบสุญญากาศในถุงโพลีเอทิลีนขนาดบรรจุ 1 กิโลกรัม เก็บที่อุณหภูมิ -20°C จากนั้นแบ่งตัวอย่างการำข้าวออกมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ปริมาณความชื้น (AOAC 2000) ปริมาณไขมันโดยวิธี Soxhlet extraction (AOAC 2000) ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl (AOAC 2000)

2.2 การสกัดโปรตีนจากการำข้าวหอมมะลิ

ทำการสกัดโปรตีนจากการำข้าวโดยนำการำข้าวมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดอาหาร (blender) เพื่อให้มีขนาดอนุภาคเล็กลง จากนั้นทำการละลายโปรตีนที่สภาวะต่างและตกตะกอนที่จุดไอโซอิเล็กทริก (Gnanasambandam และ Hettiarachchy 1995) โดยใช้อัตราส่วนของการำข้าวต่อน้ำ 1 : 5 ปรับสภาวะส่วนผสมไปที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 11.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.0 นอร์มัล ใช้ระยะเวลาในการสกัด 45 นาที (Jiamyangyuen และคณะ 2005) จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกสารละลายที่ $5,000 \times g$ นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C นำส่วนสารละลายมาตกตะกอนที่จุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric pH : pI = 4.5) ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.0 นอร์มัล จากนั้นเหวี่ยงแยกตะกอนโปรตีนที่ $10,000 \times g$ นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C นำตะกอนโปรตีนเก็บในภาชนะพลาสติก เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -30°C ไม่เกิน 1 สัปดาห์ ก่อนนำไปผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท จากนั้นหาปริมาณผลผลิตและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนสกัดจากการำข้าว ได้แก่ ปริมาณความชื้น (AOAC 2000) ปริมาณไขมันโดยวิธี Soxhlet extraction (AOAC 2000) และปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl (AOAC 2000)

2.3 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากโปรตีนการำข้าว

นำโปรตีนสกัดจากการำข้าวในข้อ 2.2 ไปผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีนทางการค้า Protease G6 (endopeptidase) โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (หัตถกาญจน์ กกแก้ว 2550 มีการดัดแปลงเล็กน้อย) โดยใช้เอนไซม์ร้อยละ 3 (ของโปรตีนสกัดโดยน้ำหนักแห้ง) และอัตราส่วนโปรตีนสกัดต่อน้ำ 1 : 7 โดยสภาวะการย่อยที่เหมาะสมของเอนไซม์ Protease G6 คือ ที่อุณหภูมิ 55°C ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.0 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซิสเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 หรือ 2 นอร์มัล เพื่อควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ให้คงที่ในระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซิส หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิส โดยนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85°C นาน 15 นาที (Sathivel และคณะ 2003) ทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 30 นาที (ใช้น้ำหล่อเย็นร่วมด้วย) นำไปเหวี่ยงแยกสารละลายที่ความเร็ว $10,000 \times g$ นาน 10 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4°C นำตัวอย่างที่ได้เติมมอลโตเดกซ์ตริน (DE 10) ในอัตราส่วนมอลโตเดกซ์ตรินต่อปริมาณโปรตีน (Lowry

และคณะ 1951) เท่ากับ 1:1 จากนั้นนำตัวอย่างไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งระเหิด (freeze drying)

2.4 การแยกส่วนโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลสด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชัน

นำสารละลายโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลสที่ผลิตได้จากข้อ 2.3 มาแยกส่วน (fractionation) ด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชันขนาด 50 กิโลดาลตัน เนื่องจากเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 50 กิโลดาลตัน (< 10 kDa และ $10 - 50$ kDa) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล DPPH ABTS ความสามารถในการจับเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) และคุณสมบัติการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี ดีกว่าเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ (ไม่แยกส่วน และ > 50 kDa) (สรญา ธิมาชัย 2554) จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชันเติมมอลโตเดกซ์ตริน (DE 10) ในอัตราส่วนมอลโตเดกซ์ตรินต่อปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ 1955) เท่ากับ 1:1 จากนั้นนำตัวอย่างไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งระเหิด (freeze drying)

2.5 เพื่อศึกษาผลของการแยกส่วนด้วยเทคนิคอัลตราฟิลเทรชันและความร้อนต่อความคงตัวของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลสผงในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองแบบขง

ศึกษาขนาดของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลสหรือเปปไทด์ซึ่งไม่ผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชัน (Rice bran protein hydrolysate, RBPH) และผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชัน (< 50 RBPH) หลังการเติมน้ำร้อนอุณหภูมิ $95^{\circ}C$ ที่สภาวะความเป็นกรด-ด่าง เป็นกลาง (pH 7.0) ปริมาณน้ำตาลร้อยละ 0

เตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองแบบขง ดังนี้

2.5.1 เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ความเป็นกรด-ด่าง 7.0) ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ $30^{\circ}C$) และแบ่งส่วนหนึ่งนำไปให้ความร้อนจนกระทั่งได้อุณหภูมิ $95^{\circ}C$

2.5.2 เติมสารละลายบัฟเฟอร์ (อุณหภูมิห้องและ $95^{\circ}C$) ลงในโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลสผง (RBPH และ < 50 RBPH) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 0.25 ของปริมาตรสุดท้าย (คำนวณน้ำหนักโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลสผงโดยใช้ปริมาณโปรตีนเป็นฐาน) คนส่วนผสมให้ละลายเข้ากันนาน 2 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2.5.3 นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองไปวิเคราะห์ ดังนี้

- (1) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (Total soluble solids, TSS) (Ruck 1963) (ภาคผนวก)
- (2) วัดค่าร้อยละของแสงที่ส่องผ่าน (% Transmittance) ความยาวคลื่น 660 nm (Ishii และ Yokotsuka 1972) (ภาคผนวก)
- (3) ปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ 1951) (ภาคผนวก)

(4) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) (Maisuthisakul และคณะ 2007) (ภาคผนวก)

(5) ความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS radical-scavenging activity) (Yin และคณะ 2005) (ภาคผนวก)

(6) ความสามารถในการจับกับเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+} chelating ability) (Yin และคณะ 2005) (ภาคผนวก)

(7) กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี (Li และคณะ 2005) (ภาคผนวก)

จัดการทดลองแบบ 2 x 2 Symmetric Factorial ในแผนการทดลอง Randomized Complete Block Design (RCBD) ปัจจัยที่ 1 คือ โปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสท 2 ชนิด (RBPH และ < 50 RBPH) และ ปัจจัยที่ 2 อุณหภูมิ 2 ระดับ (น้ำอุณหภูมิห้อง ~30 °ซ และ น้ำร้อน 95 °ซ) กำหนดให้วันที่สุ่มตัวอย่างมา ทดลองเป็นบล็อก ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลและทดสอบความแตกต่าง ของค่าเฉลี่ยทรีตเมนต์โดยใช้ DMRT (Duncan's New Multiple Range Test) โดยการใช้โปรแกรม สำเร็จรูป SPSS for windows version 17.0

2.6 การศึกษาผลของปริมาณน้ำตาล ความเป็นกรด-ด่าง และความร้อนต่อความคงตัวของ โปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทที่ไม่ผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชันในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม จาลองแบบขง

เตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจาลองแบบขง ดังนี้

2.6.1 นำโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทที่ไม่ผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชัน (crude rice bran protein hydrolysate, RBPH) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ของปริมาณสุดท้าย (คำนวณ น้ำหนักโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทโดยใช้ปริมาณโปรตีนเป็นฐาน) ผสมกับน้ำตาลซูโครส 3 ระดับ ความเข้มข้น คือ ร้อยละ 0 7 และ 15

2.6.2 เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ซีเตรทความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 และ 4.5 และบัฟเฟอร์ฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 °ซ) แบ่งส่วนหนึ่งนำไปให้ความร้อนจนกระทั่งได้อุณหภูมิ 95 °ซ

2.6.3 เติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ความเป็นกรด-ด่าง ต่างๆ ลงในส่วนผสมข้อ 2.6.1 คน ส่วนผสมให้ละลายเข้ากันนาน 2 นาที ตัวอย่างที่เติมสารละลายบัฟเฟอร์อุณหภูมิ 95 °ซ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่ อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปวิเคราะห์

2.6.4 นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจาลองแบบขง ไปวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.5

จัดการทดลองแบบ 2 x 3 x 3 Asymmetric Factorial ในแผนการทดลอง Randomized Complete Block Design (RCBD) ปัจจัยที่ 1 คือ อุณหภูมิ 2 ระดับ (น้ำอุณหภูมิห้อง 30^oซ และน้ำร้อน 95^oซ) ปัจจัยที่ 2 คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 3 ระดับ (ร้อยละ 0 7 และ 15) และปัจจัยที่ 3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3 ระดับ (pH 3.5 4.5 และ 7.0) กำหนดให้วันที่สุ่มตัวอย่างมาทดลองเป็นบล็อก ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลและทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทรีดเมนต์โดยใช้ DMRT (Duncan's New Multiple Range Test) โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows version 17.0

2.7 การศึกษาผลของปริมาณน้ำตาล ความเป็นกรด-ด่าง และความร้อน ต่อความคงตัวของโปรตีน ราข้าวไฮโดรไลเสทผงที่ผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชันในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองแบบชง

เตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองแบบชง ดังนี้

2.7.1 นำโปรตีนราข้าวไฮโดรไลเสทผงที่ผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชัน (< 50 RBPH) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ของปริมาตรสุดท้าย (คำนวณน้ำหนักโปรตีนราข้าวไฮโดรไลเสทผงโดยใช้ปริมาณโปรตีนเป็นฐาน) ผสมกับน้ำตาลซูโครส 3 ระดับความเข้มข้น คือ ร้อยละ 0 7 และ 15

2.7.2 เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ซีเตรทความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 และ 4.5 และบัฟเฟอร์ฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30^oซ) แบ่งส่วนหนึ่งนำไปให้ความร้อนจนกระทั่งได้อุณหภูมิ 95^oซ

2.7.3 เติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ความเป็นกรด-ด่าง ต่างๆ ลงในส่วนผสมข้อ 2.6.1 คนส่วนผสมให้ละลายเข้ากันนาน 2 นาที ตัวอย่างที่เติมสารละลายบัฟเฟอร์อุณหภูมิ 95^oซ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปวิเคราะห์

2.7.4 นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองแบบชงไปวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.5

จัดการทดลองแบบ 2 x 3 x 3 Asymmetric Factorial ในแผนการทดลอง Randomized Complete Block Design (RCBD) ปัจจัยที่ 1 คือ อุณหภูมิ 2 ระดับ (น้ำอุณหภูมิห้อง ~30^oซ และน้ำร้อน 95^oซ) ปัจจัยที่ 2 คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 3 ระดับ (ร้อยละ 0 7 และ 15) และปัจจัยที่ 3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3 ระดับ (pH 3.5 4.5 และ 7.0) กำหนดให้วันที่สุ่มตัวอย่างมาทดลองเป็นบล็อก ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลและทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทรีดเมนต์โดยใช้ DMRT (Duncan's New Multiple Range Test) โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows version 17.0

หมายเหตุ :

1) ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 3 ระดับ คือ ร้อยละ 0 7 และ 15 เพื่อจำลองสถานะของเครื่องดื่มในท้องตลาดที่ไม่มีน้ำตาล มีน้ำตาลน้อย และมีน้ำตาลสูงปานกลาง

2) การกำหนดความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.5 4.5 และ 7.0 เพื่อจำลองสถานะของเครื่องดื่มลักษณะต่างๆ ดังนี้

2.1) ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.5 จำลองสถานะของเครื่องดื่มที่มีความเป็นกรด (เปรี้ยวมาก) ได้แก่ น้ำผลไม้ เช่น สับปะรด ส้ม หรือน้ำผักที่มีรสเปรี้ยว เช่น มะเขือเทศ กระเจี๊ยบแดง เป็นต้น

2.2) ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 จำลองสถานะของเครื่องดื่มที่มีความเป็นกรดต่ำ (เปรี้ยวเล็กน้อย) เช่น นมเปรี้ยว

2.3) ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 จำลองสถานะของเครื่องดื่มที่มีความเป็นกรด-ด่างปานกลาง เช่น นมสดพาสเจอร์ไรซ์ นานมถั่วเหลือง เป็นต้น

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. องค์ประกอบทางเคมีของกากรำข้าวและโปรตีนสกัดจากกากรำข้าว

ตัวอย่างรำข้าวพันธุ์หอมดอกมะลิ 105 (รำละเอียด) ที่เหลือจากการบีบน้ำมันแบบเย็นจากกลุ่มวิสาหกิจชุมชนเกษตรอินทรีย์ จังหวัดลพบุรี นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่ามีองค์ประกอบในรำข้าวสกัดไขมัน ได้แก่ โปรตีน ไขมัน และความชื้น เท่ากับร้อยละ 12.96 13.23 และ 10.13 (โดยน้ำหนักเปียก) ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ในขณะที่สรุณา ธิมาชัย (2554) รายงานปริมาณโปรตีน ไขมัน และความชื้นของกากรำข้าวที่ผ่านการบีบน้ำมันแบบเย็นเท่ากับร้อยละ 13.24 8.54 และ 6.77 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับรำข้าวที่ยังไม่ผ่านการบีบน้ำมันมีปริมาณโปรตีนและไขมันเท่ากับร้อยละ 11.3 – 14.9 และ 15.0 – 19.7 (โดยน้ำหนักเปียก) ตามลำดับ (องอนงค์ นัยวิกุล 2550) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Prakash (1991) พบว่ารำข้าวที่มีไขมันเต็มมีองค์ประกอบพื้นฐานทางเคมีที่สำคัญได้แก่ โปรตีนและไขมัน ร้อยละ 14.1 และ 20.9 (โดยน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ และเมื่อสกัดน้ำมันออก (เฮกเซน) แล้วพบว่ามีปริมาณโปรตีนและไขมันร้อยละ 18.20 และ 1.60 (โดยน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ จารุดา วิเศษสรโรช (2545) รายงานว่ารำข้าวที่ผ่านการสกัดน้ำมันมีปริมาณโปรตีน ไขมัน และความชื้น เท่ากับร้อยละ 15.46 2.72 และ 6.69 (โดยน้ำหนักเปียก) ตามลำดับ นอกจากนี้ สุภวรรณ ถาวรชินสมบัติ และหทัยกาญจน์ กนกแก้ว (2551) ได้รายงานว่ากากรำข้าวหอมมะลิที่ผ่านการสกัดน้ำมันด้วยเฮกเซนที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เครื่อง solid – liquid extraction มีปริมาณโปรตีน ไขมัน และความชื้น เท่ากับร้อยละ 12.64 2.82 และ 10.66 (โดยน้ำหนักเปียก) ตามลำดับ จะเห็นว่ากากรำข้าวที่เหลือจากการบีบน้ำมันแบบเย็นที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีปริมาณไขมันที่สูงกว่าการสกัดน้ำมันโดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน

เมื่อนำกากรำข้าวที่เหลือจากการบีบน้ำมันแล้วมาสกัดโปรตีนที่สภาวะต่าง (ปรับสภาวะที่ pH 11.0) โดยใช้ระยะเวลาในการสกัด 45 นาที ตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก (pI 4.5) และศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนจากกากรำข้าวในด้านองค์ประกอบทางเคมี (ตารางที่ 1) พบว่ามีปริมาณโปรตีน ไขมัน และความชื้น เท่ากับร้อยละ 14.33 6.49 และ 76.24 (โดยน้ำหนักเปียก) ตามลำดับ โดยมีปริมาณโปรตีนเท่ากับร้อยละ 61.82 (โดยน้ำหนักแห้ง) และมีปริมาณผลผลิตเท่ากับร้อยละ 17.80 จากงานวิจัยของ สรุณา ธิมาชัย (2554) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนสกัดจากกากรำข้าวที่สภาวะเดียวกัน พบว่ามีปริมาณโปรตีน ไขมัน และความชื้น เท่ากับร้อยละ 11.80 8.05 และ 79.04 (โดยน้ำหนักเปียก) ตามลำดับ โดยมีปริมาณโปรตีนเท่ากับร้อยละ 56.19 (โดยน้ำหนักแห้ง) และมีปริมาณผลผลิตเท่ากับร้อยละ 16.43 (โดยน้ำหนักแห้ง) โปรตีนที่สกัดได้มีสีคล้ำซึ่งเกิดจากสารประกอบโพลีฟีนอลิก (polyphenolic compounds) เช่น กรดไซริงิก (syringic acid) กรดคูมาริก (coumaric acid) กรดคาเฟอิก (caffeic acid) กรดซินาปิก (sinapic acid) และวานิลลิน (vanillin) ที่เกิดการออกซิเดชันโดยปฏิกิริยาฟีนอลออกซิเดชัน (phenoloxidation) ดังนั้นโปรตีนที่สกัดได้จึงมีสีน้ำตาลเข้ม โดยสารประกอบเหล่านี้เกิดสารประกอบ

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของกากรำข้าวและโปรตีนสกัดจากกากรำข้าวที่เหลือจากการบีบน้ำมันแบบเย็น

ตัวอย่าง	องค์ประกอบทางเคมี (ร้อยละโดยน้ำหนักเปียก)		
	โปรตีน	ไขมัน	ความชื้น
1. กากรำข้าว	12.96±0.42	13.23±0.02	10.13±1.91
2. โปรตีนสกัดจากกากรำข้าว	14.33±0.24	6.49±2.85	76.24±2.62

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ของ 2 ซ้ำการทดลอง (replication)

เชิงซ้อนกับโปรตีนด้วยพันธะไฮโดรเจน พันธะโคเวเลนต์ แรงไฮโดรโฟบิก และพันธะไอออนิก ซึ่งแยกออกจากกันยาก โดยปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับสารประกอบโพลีฟีนอลิกเกิดขึ้นจากสภาวะการสกัด คือ pH ก๊าซออกซิเจน เวลา และอุณหภูมิ ซึ่งสารฟีนอลิกเหล่านี้จะส่งผลให้คุณสมบัติทางชีวภาพของโปรตีนและความสามารถในการย่อยสลาย (Salcedo-Chaves และคณะ 2002)

2. การศึกษาผลของการแยกส่วนด้วยเทคนิคอัลตราฟิลเตรชันและความร้อนต่อความคงตัวของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองแบบขง

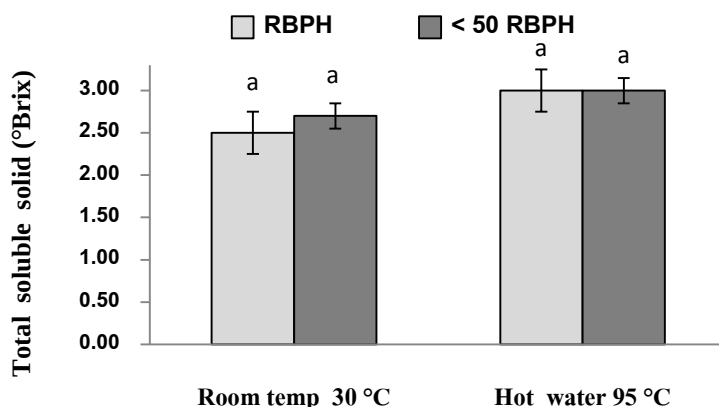
โปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงที่ไม่ผ่าน (RBPH) และผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชันขนาด 50 กิโลดาลตัน (< 50 RBPH) นำมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิ 2 ระดับ คือ อุณหภูมิห้อง (~30°C) และ 95°C ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ของปริมาตรสุดท้าย เพื่อเปรียบเทียบความคงตัวของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงทั้งสองขนาดต่อความร้อน เมื่อนำผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองแบบขงไปวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆ ได้ผลการทดลอง ดังนี้

2.1 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solid, TSS)

ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองที่เติมโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผง RBPH และ < 50 RBPH เมื่อละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 2 สภาวะ คือ อุณหภูมิห้อง (~30°C) และ 95°C ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 พบว่ามีปริมาณของแข็งที่ละลายได้อยู่ในช่วง 2.50 – 3.00 องศาบริกซ์ (°Brix) ในขณะที่ความร้อนและขนาดของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผง RBPH และ < 50 RBPH ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ($p > 0.05$) (ภาพที่ 1)

2.2 ร้อยละของแสงที่ส่องผ่าน (% Transmittance)

ร้อยละของแสงที่ส่องผ่าน คือ สัดส่วนของความเข้มของแสงที่ผ่านเข้าไปในตัวอย่างต่อความเข้มของแสงที่ผ่านออกมา ในการศึกษาการวัดค่าร้อยละของแสงที่ส่องผ่านเป็นการวัดความใส (Clarification) ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองเติมโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงทั้ง 2 ขนาด คือ ที่ไม่ผ่านและผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชัน (RBPH และ < 50 RBPH) ที่ความเข้มข้นร้อยละ



ภาพที่ 1 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองเดิมโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชัน (pH 7.0)

หมายเหตุ RBPH และ < 50 RBPH คือ โปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชันขนาด 50 กิโลดาลตัน

^a ตัวอักษรที่เหมือนกันบนแท่งกราฟแสดงถึงทรีทเมนต์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

0.25 ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน ตารางที่ 2 แสดงผลการศึกษาร้อยละของแสงที่ส่องผ่านของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงที่เดิมในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลอง พบว่าการแยกส่วนด้วยอัลตราฟิลเตรชันมีผลต่อค่าร้อยละของแสงที่ส่องผ่านอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสท RBPH และ < 50 RBPH มีค่าร้อยละของแสงที่ส่องผ่านเท่ากับ 0.15 และ 93.97 – 95.42 ตามลำดับ ในขณะที่ความร้อน (95°C) ไม่มีผลต่อค่าร้อยละของแสงที่ส่องผ่าน ($p > 0.05$) แสดงให้เห็นว่า RBPH มีสารประกอบที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า 50 kDa และไม่สามารถละลายได้ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ทั้งสองอุณหภูมิ ผลิตภัณฑ์จึงมีความข้นสูง (ค่าการส่องผ่านของแสงต่ำ) ซึ่งอาจเป็นสารที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนหรือเปปไทด์และสารประกอบพอลิฟีนอล สารประกอบทั้งสองจะรวมตัวกันเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้น และมีความสามารถในการละลายลดลง สามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์จากธัญพืช หรือ ผลไม้ เช่น เบียร์ ไวน์ น้ำผลไม้ (ประพันธ์ ปิ่นศิริโรคม 2535)

2.3 ปริมาณโปรตีน

โปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสท RBPH และ < 50 RBPH มีปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันเล็กน้อย ($p \leq 0.05$) คือ มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.270 และ 0.321–0.338 กรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการศึกษาด้วยเทคนิค Tricine SDS-PAGE ของ สรญา ธิมาชัย (2554) พบว่าโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทจากกากรำข้าวบิบน้ำมันแบบเย็นที่ผลิตโดยใช้สภาวะเดียวกับงานวิจัยนี้ พบเปปไทด์ขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 20 กิโลดาลตัน เป็นส่วนใหญ่ ดังนั้น การแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชันขนาด 50 กิโล

ตารางที่ 2 ร้อยละของแสงที่ส่องผ่านของผลิตภัณฑ์เครื่องคั้นจำลองเดิมโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผง ไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชัน (pH 7.0)

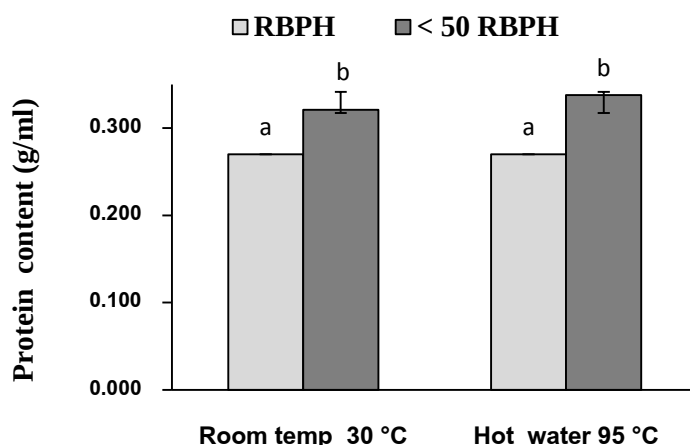
การแยกส่วน	ร้อยละของแสงที่ส่องผ่าน (%T)	
	น้ำอุณหภูมิห้อง (30 °C)	น้ำร้อน (95 °C)
ไม่ผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชัน (RBPH)	0.15±0.00 ^a	0.15±0.01 ^a
ผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชัน (< 50 RBPH)	95.42±0.36 ^b	93.97±0.45 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ของ 2 ซ้ำ การทดลอง (replication)
^{a-b} ตัวอักษรที่แตกต่างกันทั้งแนวตั้งและแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

คาลตัน (< 50 RBPH) จึงเป็นการทำให้มีโปรตีนเข้มข้นมากขึ้น ในขณะที่ความร้อนไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน ($p > 0.05$) (ภาพที่ 2)

2.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

ภาพที่ 3 แสดงปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของผลิตภัณฑ์เครื่องคั้นจำลองเดิมโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผง 2 ขนาด (RBPH และ < 50 RBPH) ภายใต้สภาวะความเป็นกรด-ด่าง 7.0 และมีปริมาณน้ำตาลร้อยละ 0 เปรียบเทียบกับการละลายน้ำที่อุณหภูมิห้อง (~30°C) และที่อุณหภูมิ

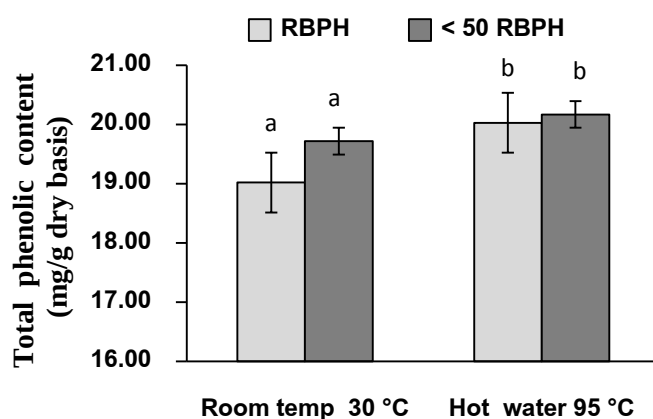


ภาพที่ 2 ปริมาณโปรตีนของผลิตภัณฑ์เครื่องคั้นจำลองเดิมโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชัน (pH 7.0)

หมายเหตุ RBPH และ < 50 RBPH คือ โปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชันขนาด 50 กิโลคาลตัน

^{a-b} ตัวอักษรที่ต่างกันบนแท่งกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

(95°C) พบว่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของตัวอย่างที่เติม RBPH และ < 50 RBPH ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 19.02 – 20.17 มิลลิกรัม/กรัมเปปไทด์ผง อาจเนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลิกมีโมเลกุลขนาดเล็กกว่า 50 กิโลดาลตัน จึงไม่พบความแตกต่างระหว่าง RBPH และ < 50 RBPH ในขณะที่ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองที่เตรียมจากน้ำที่อุณหภูมิ 95°C มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าตัวอย่างที่เตรียมจากน้ำที่อุณหภูมิห้อง ($p \leq 0.05$) Kähkönen และคณะ (1999) รายงานว่า ชั้นเปลือกนอกของเมล็ดธัญพืช เปลือกชั้นนอก (husk/hull) เปลือกชั้นใน (pericarp) เซลล์ทดสอบและอัลบูโรน (testa and aleurone cells) มีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าในส่วนของชั้นเอนโดสเปิร์ม ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกในธัญพืชพบทั้งในรูปแบบอิสระและรูปแบบที่มีการจับตัวกับสารอื่น (bound form) เช่น น้ำตาล กรดไขมัน หรือโปรตีน ส่วนใหญ่จะพบอยู่ในรูปแบบที่มีการจับตัวกับสารอื่น ซึ่งกระบวนการแปรรูปสามารถปลดปล่อยเป็นสารประกอบฟีนอลิกอิสระได้ เช่น ความร้อน กรด ค้างแรงเกลือ การฉายรังสี เป็นต้น ทำให้มีปริมาณสารฟีนอลิกอิสระในระบบเพิ่มขึ้น (Bonoli และคณะ 2004) Xu และคณะ (2007) พบว่า การให้ความร้อนแก่สารสกัดจากเปลือกส้มที่สภาวะต่างๆ (120-150 °C นาน 30-90 นาที) มีผลให้มีปริมาณกรดฟีนอลิกรูปแบบอิสระเพิ่มขึ้นแต่รูปแบบที่มีการจับตัวลดลง อย่างไรก็ตามความร้อนยังมีผลทำลายกรดฟีนอลิกด้วยขึ้นอยู่กับระดับความร้อนและระยะเวลาที่ใช้



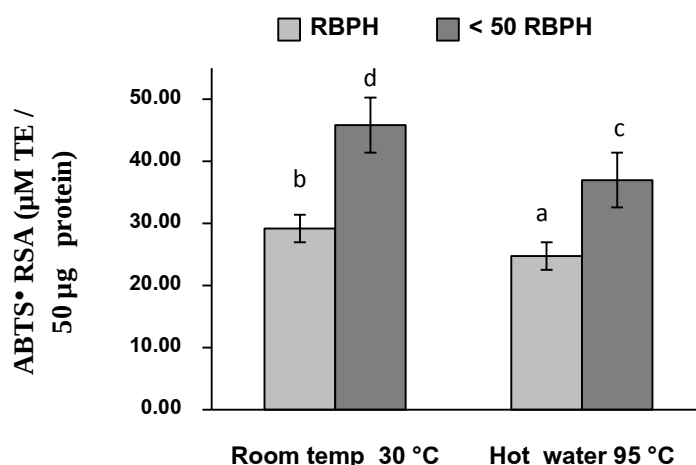
ภาพที่ 3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองเติมโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชัน (pH 7.0)

หมายเหตุ RBPH และ < 50 RBPH คือ โปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชันขนาด 50 กิโลดาลตัน

^{a-b} ตัวอักษรที่ต่างกันบนแท่งกราฟแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

2.5 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS

ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS ของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสตพวงที่ไม่ผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชัน (RBPH) ที่เติมลงในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล ABTS ต่ำกว่า (24.73 – 29.15 ไมโครโมลาร์โทรลอคซ์ /50 ไมโครกรัมโปรตีน) โปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสตพวงที่ผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชัน (< 50 RBPH) (36.96–45.82 ไมโครโมลาร์โทรลอคซ์/50ไมโครกรัมโปรตีน) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ภาพที่ 4) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ สรญา ชิมาชัย (2554) ที่ศึกษาความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS ของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ 3 สภาวะ พบว่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS ของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสตที่มีขนาดมากกว่า 50 กิโลดาลตัน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล ABTS ต่ำกว่าโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสตที่มีขนาดต่ำกว่า 50 กิโลดาลตัน (<10 kDa และ 10–50 kDa) นอกจากนี้ผลการวิจัยยังพบว่าความร้อนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS โดยอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น (95°C) ทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูล ABTS ลดลง ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 4 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสตพวงไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชัน (pH 7.0)

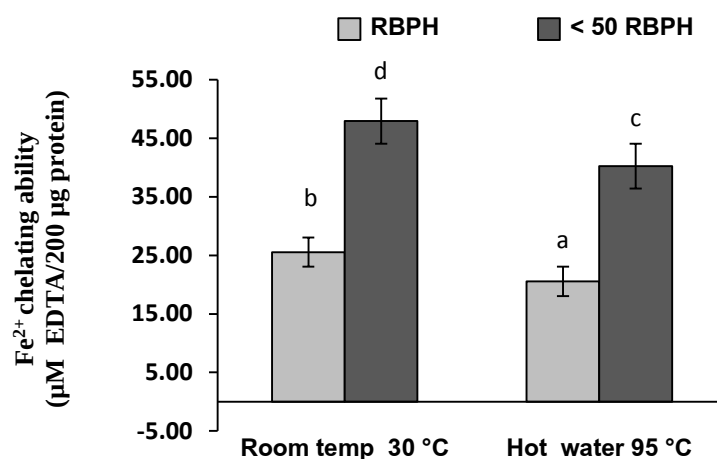
หมายเหตุ RBPH และ < 50 RBPH คือ โปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสตไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชันขนาด 50 กิโลดาลตัน

^{a-c} ตัวอักษรที่ต่างกันบนแท่งกราฟแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

2.6 ความสามารถในการจับเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+})

ภาพที่ 5 แสดงความสามารถของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสตพวง RBPH และ < 50 RBPH ที่เติมในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองในการจับเฟอร์รัสไอออน พบว่าโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสตพวงขนาด < 50 RBPH มีความสามารถในการจับเฟอร์รัสไอออน (40.25–47.96 ไมโครโมลาร์อีดีทีเอ/200

ไมโครกรัมโปรตีน) สูงกว่า RBPH (20.55–25.56 ไมโครโมลาร์อีดีทีเอ/200 ไมโครกรัมโปรตีน) ($p \leq 0.05$) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์กิจกรรมการยับยั้งอนุมูล ABTS และสอดคล้องกับผลการทดลองของ สรญา ชิมะชัย (2554) ที่ศึกษาโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลสที่ย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ และผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชัน พบว่าโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลสที่ย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่มีขนาดน้อยกว่า 50 กิโลดาลตัน มีความสามารถในการจับเฟอร์รัสไอออนสูงกว่าโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลสที่มีขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่ (ไม่แยกส่วน และ > 50 kDa) Moure และคณะ (2006) ศึกษาการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองด้วย Flavourzyme พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลสที่มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน มีประสิทธิภาพในการจับเฟอร์รัสไอออนสูงกว่าขนาด 30–50 กิโลดาลตัน และที่ไม่ผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชัน ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Dong และคณะ (2008) ศึกษาโปรตีนไฮโดรไลสจากกล้ามเนื้อปลาเก๋ที่ผลิตโดย Alcalase และ Flavourzyme พบว่าโมเลกุลขนาดเล็กในโปรตีนไฮโดรไลสมีบทบาทสำคัญในการจับกับโลหะ โดยขนาดโมเลกุลที่เล็กกว่า 500 ดาลตัน มีความสามารถในการจับเฟอร์รัสไอออนสูง เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลส 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนการเตรียมผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองโดยการละลายโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลสผงในน้ำที่อุณหภูมิสูง (95°C) ทำให้ความสามารถในการจับเฟอร์รัสไอออนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 5 ความสามารถในการจับเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลสไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชัน (pH 7.0)

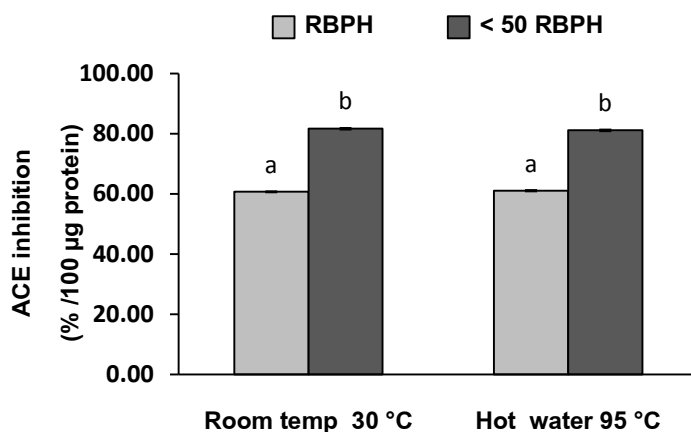
หมายเหตุ RBPH และ < 50 RBPH คือ โปรตีนรำข้าวไฮโดรไลสไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชันขนาด 50 กิโลดาลตัน

^{a-c} ตัวอักษรที่ต่างกันบนแท่งกราฟแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

2.7 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี

กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์เอซีอีของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผง RBPH และ < 50 RBPH ที่เติมในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลอง (ภาพที่ 6) พบว่าโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงขนาด < 50 RBPH มีกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี (ร้อยละ 81.10–81.64 /100 ไมโครกรัมโปรตีน) สูงกว่าโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงที่ไม่ผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชัน (RBPH) (ร้อยละ 60.68–61.03 /100 ไมโครกรัมโปรตีน) ($p \leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ สรญา ธิมาชัย (2554) ที่ศึกษาการย่อยโปรตีนรำข้าวด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ และนำไปแยกขนาดด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชัน พบว่าโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทขนาดต่ำกว่า 50 กิโลดาลตัน มีกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์เอซีอีสูงกว่าโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทที่มีขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่ (ไม่แยกส่วน และ >50 kDa) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) He และคณะ (2006) ได้ศึกษาโปรตีนกึ่งไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยด้วย Protease จาก *Bacillus sp.* เมื่อผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชันพบว่าโปรตีนกึ่งไฮโดรไลเสทที่มีขนาดโมเลกุล 3 กิโลดาลตัน (IC_{50} เท่ากับ 0.22 mg/ml) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์เอซีอีสูงกว่าโปรตีนกึ่งไฮโดรไลเสทที่ไม่ผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชัน (IC_{50} เท่ากับ 0.98 mg/ml) เช่นเดียวกัน Raghavan และ Kristinsson (2009) พบว่าโปรตีนปลาเนื้อไฮโดรไลเสทที่ย่อยด้วย Cryotin และ Flavourzyme ที่มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์เอซีอีสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทขนาดโมเลกุล 10–30 กิโลดาลตัน และ > 30 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

ในขณะที่อุณหภูมิไม่มีผลต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี ($p > 0.05$) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทมีความคงตัวต่อความร้อน ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Wu และ Ding (2002) พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสทที่ผ่านการย่อยด้วย Alcalase หลังจากนำสารละลายเปปไทด์ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาผ่านกระบวนการให้ความร้อนโดยใช้อุณหภูมิ 20-100 °C นาน 2 ชั่วโมง พบว่าการใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี เช่นเดียวกับ Hwang (2010) ได้ศึกษาผลของกระบวนการแปรรูปต่อความคงตัวของเปปไทด์ โดยใช้สารละลายโพลิโกเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยน้ำคั้นพุน้ำด้วยเอนไซม์โอเรียนเทส ที่มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 204-265 ดาลตัน หลังจากนั้นนำสารละลายโพลิโกเปปไทด์ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 20-100 °C นาน 2 ชั่วโมง พบว่าการใช้อุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนแตกต่างกันไม่มีผลต่อร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี Rivas และคณะ (2007) ได้ทดสอบความคงตัวของเปปไทด์จากการหมักโปรตีนเวย์ในการยับยั้งเอนไซม์เอซีอีเมื่อเติมลงในเครื่องดื่มผสมน้ำส้มที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 75 °C นาน 1 นาที และค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.99 หลังจากนั้นบรรจุเครื่องดื่มปริมาตร 150 มิลลิลิตรในถุงโพลีเอทิลีน (polyethylene bag) นำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 84 และ 95 °C นาน 140 วินาที พบว่าเครื่องดื่มผสมน้ำส้มที่ผ่านการให้ความร้อนทั้ง 2 อุณหภูมิ มีอัตราส่วนของการยับยั้งเอนไซม์เอซีอีไม่แตกต่างกัน



ภาพที่ 6 ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์เอซีอีของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชันที่สภาวะความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0

หมายเหตุ RBPH และ < 50 RBPH คือ โปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชันขนาด 50 กิโลดาลตัน

^{a-b} ตัวอักษรที่ต่างกันบนแท่งกราฟแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อเติมโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงที่ไม่ผ่าน (RBPH) และผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชันขนาด 50 กิโลดาลตัน (< 50 RBPH) ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลอง พบว่าความร้อน (95 °C) มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS และความสามารถในการจับเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) ($p \leq 0.05$) แต่ไม่มีผลต่อปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ร้อยละของแสงที่ส่องผ่าน (ความขุ่น) ปริมาณโปรตีนและความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี ($p > 0.05$) ในขณะที่ขนาดของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงมีผลต่อ ความขุ่น ปริมาณโปรตีน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS ความสามารถในการจับเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) และความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี ($p \leq 0.05$) ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงศึกษาขนาดของเปปไทด์แต่ละชนิดแยกกัน

3. การศึกษาผลของปริมาณน้ำตาล ความเป็นกรด-ด่าง และความร้อน ต่อความคงตัวของโปรตีน รำข้าวไฮโดรไลเสทผงที่ไม่ผ่านและผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชันในผลิตภัณฑ์ เครื่องดื่มจำลองแบบขง

3.1 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solid)

การหาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองที่เติมโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงที่ไม่ผ่าน (crude rice bran protein hydrolysate, RBPH) และผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชันขนาด 50 กิโลดาลตัน (< 50 RBPH) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ที่สภาวะการมีปริมาณน้ำตาล ความเป็นกรด-ด่าง และการให้ความร้อนที่แตกต่างกัน พบว่า เมื่อปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้น ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นด้วย ($p \leq 0.05$) ในขณะที่ความร้อนและความเป็นกรด-ด่าง ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ($p > 0.05$) แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองเติมโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงที่ไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชันภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน

ปริมาณ น้ำตาล (%)	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (°Brix)			
	RBPH		< 50 RBPH	
	น้ำอุณหภูมิห้อง (30°C)	น้ำร้อน (95°C)	น้ำอุณหภูมิห้อง (30°C)	น้ำร้อน (95°C)
0	2.53±0.06 ^a	2.53±0.15 ^a	2.97±0.08 ^A	2.97±0.14 ^A
7	9.93±0.15 ^b	10.07±0.12 ^b	9.72±0.45 ^B	9.83±0.29 ^B
15	17.07±0.06 ^c	17.10±0.10 ^c	17.27±0.37 ^C	16.93±0.10 ^C

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ของ 2 ซ้ำการทดลอง (replication)

RBPH และ < 50 RBPH คือ โปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทที่ไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชันขนาด 50 กิโลดาลตัน

^{a-c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

^{A-B} ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

3.2 ร้อยละของแสงที่ส่องผ่าน (% Transmittance)

การวัดความใส (Clarification) ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองที่เติมโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงทั้ง 2 ชนิด คือ ที่ไม่ผ่านและผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชัน (RBPH และ < 50 RBPH) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน แสดงผลในตารางที่ 4 ซึ่งพบว่า การเปลี่ยนแปลงค่าร้อยละของแสงที่ส่องผ่านของตัวอย่างที่เติมโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงทั้งสองขนาดมี

แนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ ความร้อน ปริมาณน้ำตาล และความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีผลต่อค่าร้อยละของแสงที่ส่องผ่านแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้ปัจจัยทั้งสามชนิดมีอิทธิพลร่วมกัน (interaction) ($p \leq 0.05$) ต่อการเปลี่ยนแปลงค่าร้อยละของแสงที่ส่องผ่าน ในส่วนของความร้อนพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (95°C) ค่าร้อยละของแสงที่ส่องผ่านมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้สารละลายโปรตีนราข้าวไฮโดรไลเซตพองเกิดการเสียสภาพทำให้ความสามารถในการละลายลดลงกลายเป็นสารแขวนลอย โดยอุณหภูมิจะมีผลต่อพันธะนอนโควาเลนต์ (non-covalent) เช่น พันธะไฮโดรเจน พันธะไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interactions) และพันธะอิเล็กตรอนิก (electrostatic interactions) ในโครงสร้างของโปรตีน ทำให้โปรตีนเกิดการคลายตัวและส่วนที่ไม่ชอบน้ำภายในโครงสร้างโปรตีนเปิดตัวออกมา ความสามารถในการทำปฏิกิริยากับน้ำตาลลดลง และส่วนที่ไม่ชอบน้ำที่เปิดออกมานี้จะเหนี่ยวนำให้โปรตีนเกิดการรวมตัว จับตัวเป็นก้อน และตกตะกอนในที่สุด (Li-Chan และคณะ 1984) สำหรับ RBPH นั้นเนื่องจากมีอนุภาคขนาดใหญ่จึงค่อนข้างเกิดปัญหาในการละลาย ทำให้สารละลายที่ได้มีลักษณะเป็นสารแขวนลอยซึ่งสารละลายที่ได้มีความขุ่นมาก ในทางตรงกันข้ามโปรตีนไฮโดรไลเซตชนิด < 50 RBPH สามารถละลายน้ำได้ดีทำให้สารละลายที่ได้มีลักษณะที่ใส

ปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่าร้อยละของแสงที่ส่องผ่านเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเนื่องจากน้ำตาลมีผลทำให้สารละลายมีความใสมากขึ้นอาจเนื่องมาจากน้ำตาลช่วยเสริมการละลายของเปปไทด์ Tanabe และ Sacki (2001) รายงานการเพิ่มการละลายของโปรตีนมัยโอซินจากปลาเมื่อทำปฏิกิริยาเมตลาร์ด์หรือไกลโคซิเลชัน (glycosylation) กับน้ำตาลกลูโคสที่สภาวะความเข้มข้นของเกลือต่ำ (0.1 M NaCl) ในขณะที่สภาวะความเป็นกรด-ด่างต่ำ (pH 3.5 และ 4.5) พบว่าผลิตภัณฑ์เครื่องดัดจำลองมีความใสมากกว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกลาง (pH 7.0) เนื่องจากสภาวะการทดลองที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.5 และ 4.5 มีค่าใกล้เคียงกับค่า pI (Isoelectric point) ของโปรตีนราข้าว ($pI \sim 4.5$) ในสภาวะที่สารละลายโปรตีนมีค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในระดับ pI ความสามารถในการละลายของโปรตีนจะลดลงต่ำสุดเนื่องจากประจุไฟฟ้ารวมของโปรตีนมีค่าเป็นศูนย์จึงไม่เกิดแรงผลักกันระหว่างประจุที่จะทำให้โปรตีนเกิดการกระจายในสารละลาย ในสภาวะนี้โปรตีนอยู่ชิดกันซึ่งอาจเกิดการรวมตัวและตกตะกอน เมื่อนำส่วนใสไปวัดค่าร้อยละของแสงที่ส่องผ่านจึงทำให้ผลิตภัณฑ์เครื่องดัดจำลองมีความใสมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ishii และ Yokotsuka (1972) ได้ศึกษากระบวนการทำให้น้ำผลไม้ใสโดยใช้เอนไซม์ Pectin trans-Eliminase (PTE) พบว่าช่วงของอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำให้น้ำผลไม้ใสคือ $45-50^{\circ}\text{C}$ และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (70°C) ค่าร้อยละของแสงที่ส่องผ่านจะลดลง และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมสำหรับการทำให้น้ำผลไม้ใส อยู่ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง 3 – 4 ทำให้น้ำผลไม้มีค่าร้อยละของแสงที่ส่องผ่านสูงที่สุดประมาณร้อยละ 96.25 และที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.5 น้ำผลไม้มีค่าร้อยละของแสงที่ส่องผ่านประมาณ 17.36 นอกจากนี้ยังพบว่าผลการวิจัยนี้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ในน้ำตาลทุกระดับ (ร้อยละ 0 7 และ 15) เมื่อผ่านการเติมน้ำร้อน (95°C) มีความคงตัวของค่าร้อยละของแสงที่ส่องผ่านของโปรตีนราข้าวไฮโดรไลเซตพองมากที่สุด

ตารางที่ 4 ร้อยละของแสงที่ส่องผ่านของผลิตภัณฑ์เครื่องคั้นจำลองเดิมโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผง ไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชันภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน

ปริมาณ น้ำตาล (%)	ความเป็น กรด-ด่าง (pH)	ร้อยละของแสงที่ส่องผ่าน (%T)			
		RBPH		< 50 RBPH	
		น้ำอุณหภูมิห้อง (30°C)	น้ำร้อน (95°C)	น้ำอุณหภูมิห้อง (30°C)	น้ำร้อน (95°C)
0	3.5	0.24±0.00 ^e	0.15±0.02 ^a	75.10±0.51 ^D	60.53±0.01 ^A
	4.5	0.24±0.00 ^e	0.14±0.03 ^a	93.28±1.04 ^{GH}	85.55±0.17 ^F
	7.0	0.15±0.00 ^a	0.15±0.01 ^a	95.42±0.36 ^I	93.97±0.45 ^{GHI}
7	3.5	0.30±0.01 ^f	0.17±0.01 ^{ab}	73.70±1.79 ^D	63.50±0.03 ^B
	4.5	0.24±0.00 ^e	0.17±0.03 ^{abc}	93.15±0.31 ^G	86.54±0.09 ^F
	7.0	0.31±0.01 ^{fg}	0.17±0.00 ^{abc}	95.32±0.13 ^{HI}	92.53±2.08 ^G
15	3.5	0.33±0.01 ^g	0.20±0.00 ^{bcd}	80.00±1.82 ^E	70.46±0.11 ^C
	4.5	0.33±0.01 ^g	0.19±0.03 ^{bcd}	94.50±0.52 ^{GHI}	86.34±0.15 ^C
	7.0	0.21±0.00 ^e	0.21±0.02 ^{cd}	94.60±0.51 ^{GHI}	93.92±0.95 ^{GHI}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ของ 2 ซ้ำการทดลอง (replication)

RBPH และ < 50 RBPH คือ โปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชันขนาด 50 กิโลดาลตัน

^{a-g} ตัวอักษรที่แตกต่างกันทั้งแนวดิ่งและแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

^{A-I} ตัวอักษรที่แตกต่างกันทั้งแนวดิ่งและแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

3.3 ปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนของผลิตภัณฑ์เครื่องคั้นจำลองเดิมโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผง RBPH และ < 50 RBPH ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันพบว่า ปริมาณน้ำตาล ความเป็นกรด-ด่าง และความร้อน ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดย RBPH และ <50 RBPH มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 0.256 - 0.292 และ 0.292 – 0.369 กรัม/มล. ตามลำดับ (ตารางที่ 5) Contreras และคณะ (2011) ได้ศึกษาความคงตัวของเปปไทด์จากเคซีน (RYLGY และ AYFYPEL) ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน นำมาผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งระเหิดและแบบพ่นฝอย (อุณหภูมิขาเข้า 140 °ซ และ ขาออก 75-100°ซ) พบว่ากระบวนการทำแห้งทั้ง 2 วิธีไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเปปไทด์ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 5 ปริมาณโปรตีนของผลิตภัณฑ์เครื่องคั่วเมล็ดงาเต็มโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชันภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน

ปริมาณ น้ำตาล (%)	ความเป็น กรด-ด่าง (pH)	ปริมาณโปรตีน (g/ml)			
		RBPH ^{ns}		< 50 RBPH ^{ns}	
		น้ำอุณหภูมิห้อง (30°C)	น้ำร้อน (95°C)	น้ำอุณหภูมิห้อง (30°C)	น้ำร้อน (95°C)
0	3.5	0.273±0.00	0.266±0.01	0.302±0.00	0.292±0.00
	4.5	0.256±0.00	0.271±0.01	0.306±0.00	0.329±0.00
	7.0	0.270±0.01	0.270±0.02	0.321±0.01	0.338±0.03
7	3.5	0.288±0.01	0.267±0.02	0.316±0.03	0.325±0.01
	4.5	0.274±0.01	0.276±0.04	0.329±0.00	0.317±0.04
	7.0	0.277±0.00	0.271±0.03	0.339±0.03	0.335±0.02
15	3.5	0.292±0.01	0.271±0.00	0.363±0.00	0.357±0.06
	4.5	0.282±0.01	0.290±0.02	0.345±0.02	0.321±0.03
	7.0	0.289±0.00	0.292±0.02	0.369±0.01	0.347±0.06

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ของ 2 ซ้ำ การทดลอง (replication)

RBPH และ < 50 RBPH คือ โปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชันขนาด 50 กิโลดาลตัน

^{ns} ทริทเมนต์ทั้งหมด ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

3.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของผลิตภัณฑ์เครื่องคั่วเมล็ดงาเต็มโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผง RBPH และ < 50 RBPH ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน มีปริมาณเท่ากับ 17.48 – 20.45 และ 19.56 – 21.84 มิลลิกรัมต่อกรัมเปปไทด์ผง (ตารางที่ 6) พบว่าตัวอย่างที่เต็มโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงแต่ละขนาด มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกมีความคงตัวต่อ ปริมาณ น้ำตาล ความเป็นกรด-ด่าง และความร้อน จิราพร เพลินจิต (ม.ป.ป.) ได้ศึกษาความคงตัวของกรดฟีนอลิกในน้ำกึ่งวิกฤต (subcritical water) 100 150 200 และ 250 °ซ เป็นเวลา 30 60 90 และ 120 นาที จากการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนทำให้กรดฟีนอลิกสลายตัวมากขึ้น โดยส่วนใหญ่สลายตัวอย่างสมบูรณ์ที่ 250 °ซ หลังจากให้ความร้อน 30 นาที อย่างไรก็ตามเนื่องจากในงานวิจัยนี้สภาวะของความร้อนไม่รุนแรง (95 °ซ) จึงไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ตารางที่ 6 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองเดิมโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชันภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน

ปริมาณน้ำตาล (%)	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg/g dry basis)			
		RBPH ^{ns}		< 50 RBPH ^{ns}	
		น้ำอุณหภูมิห้อง (30°C)	น้ำร้อน (95°C)	น้ำอุณหภูมิห้อง (30°C)	น้ำร้อน (95°C)
0	3.5	18.77±0.47	17.48±0.01	20.08±1.12	19.97±0.53
	4.5	18.07±0.44	20.22±0.14	20.42±0.43	20.99±0.01
	7.0	19.02±0.39	20.03±0.15	19.72±0.35	20.17±0.49
7	3.5	19.48±0.88	19.56±0.34	20.44±0.22	19.60±1.00
	4.5	19.29±0.21	19.92±2.95	20.45±1.06	19.56±0.58
	7.0	18.54±0.39	19.42±0.16	21.16±0.29	19.84±1.32
15	3.5	20.06±0.97	20.45±0.92	21.09±0.39	20.40±0.92
	4.5	19.79±0.69	19.32±0.35	21.84±0.36	20.35±0.56
	7.0	20.15±0.37	20.05±2.34	21.16±0.98	21.13±0.45

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ของ 2 ซ้ำ การทดลอง (replication)

RBPH และ < 50 RBPH คือ โปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชันขนาด 50 กิโลดาลตัน

^{ns} ทริทเมนต์ทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

3.5 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS

ตารางที่ 7 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS ของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสท RBPH และ < 50 RBPH ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน พบว่า ปริมาณน้ำตาล ความเป็นกรด-ด่าง และความร้อน มีผลทำให้ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสท RBPH และ < 50 RBPH มีค่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS อยู่ในช่วง 7.95–32.02 และ 21.62–45.89 ไมโครโมลาร์โทรลอคซ์/50 ไมโครกรัมโปรตีนตามลำดับ ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS ของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทจะลดลง เมื่อผ่านการเติมน้ำร้อน (95°C) ค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้นและปริมาณน้ำตาลลดลง ($p \leq 0.05$) ซึ่งโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสททั้ง 2 ชนิด มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน สำหรับโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทที่ไม่ผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชัน (RBPH) พบว่ามีอิทธิพลร่วมกันระหว่าง 2 ปัจจัย คือ ความร้อนกับน้ำตาล ความร้อนกับค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณน้ำตาลกับความเป็นกรด-ด่าง ($p \leq 0.05$) และสำหรับ

โปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทที่ผ่านการแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชัน (< 50 RBPH) พบว่ามีผลร่วมระหว่าง 3 ปัจจัย ($p \leq 0.05$) ต่อความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS Zhao และคณะ (2011) รายงานว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ป็นกรดมีผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนกึ่งไฮโดรไลเสท พบว่าความคงตัวของคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันลดลงเล็กน้อยเมื่อความเป็นกรดเพิ่มขึ้นเนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนไฮโดรไลเสท (การเสียสภาพ/การตกตะกอน) ด้วยการเหนี่ยวนำของสภาวะที่เป็นกรดและความร้อน ผลการวิจัยนี้ที่สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นกลาง (pH 7.0) ในน้ำตาลทุกๆระดับ (ร้อยละ 0 7 และ 15) เมื่อผ่านการเติมน้ำร้อน (95°C) มีความคงตัวของค่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS ของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทมากที่สุด

ตารางที่ 7 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองเดิมโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชันภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน

ปริมาณน้ำตาล (%)	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	ABTS• RSA ($\mu\text{M TE} / 50 \mu\text{g protein}$)			
		RBPH		< 50 RBPH	
		น้ำอุณหภูมิห้อง (30°C)	น้ำร้อน (95°C)	น้ำอุณหภูมิห้อง (30°C)	น้ำร้อน (95°C)
0	3.5	20.66±0.31 ^f	7.95±0.79 ^a	31.53±0.39 ^D	21.62±0.33 ^A
	4.5	26.11±0.46 ^h	14.72±0.84 ^c	40.12±0.48 ^H	27.60±0.27 ^C
	7.0	29.15±0.30 ^{kl}	24.73±0.41 ^g	45.82±0.11 ^K	36.96±0.02 ^E
7	3.5	24.65±0.04 ^g	10.52±0.88 ^b	36.63±0.19 ^E	25.02±0.03 ^B
	4.5	28.18±0.01 ^{jk}	16.44±0.15 ^d	41.42±0.35 ^I	30.60±0.70 ^D
	7.0	32.02±0.36 ^m	26.90±0.93 ^{hi}	45.89±0.04 ^K	37.62±0.28 ^{EF}
15	3.5	27.11±0.20 ^{hij}	14.81±0.82 ^c	38.90±0.20 ^G	26.97±1.11 ^C
	4.5	30.13±0.00 ^l	19.35±0.34 ^c	42.94±0.59 ^J	30.74±0.82 ^D
	7.0	29.15±0.03 ^{kl}	27.91±0.95 ^{ijk}	45.87±0.07 ^K	38.34±0.42 ^{FG}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ของ 2 ซ้ำ การทดลอง (replication)

RBPH และ < 50 RBPH คือ โปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชันขนาด 50 กิโลดาลตัน

^{a-m} ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งและแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

^{A-K} ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งและแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

3.6 ความสามารถในการจับเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+})

ตารางที่ 8 แสดงความสามารถในการจับเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) ของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสท RBPH และ < 50 RBPH ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.25 พบว่าโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงที่เติมในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลอง มีค่าความสามารถในการจับเฟอร์รัสไอออนอยู่ในช่วง 2.44–33.65 และ 4.38–48.08 ไมโครโมลาร์ดีดีทีเอ/200 ไมโครกรัมโปรตีน ตามลำดับ โดยปริมาณน้ำตาล ความเป็นกรด-ด่าง และความร้อน มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความสามารถในการจับเฟอร์รัสไอออน ($p \leq 0.05$) และพบผลของทั้ง 3 ปัจจัยร่วมกัน ($p \leq 0.05$) เมื่อโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผ่านการเติมน้ำร้อน (95°C) ค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้นและปริมาณน้ำตาลลดลง พบว่าความสามารถในการจับเฟอร์รัสไอออนของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงจะลดลง ($p \leq 0.05$) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์กิจกรรมการยับยั้งอนุมูล ABTS ผลการวิจัยนี้ที่สภาวะความเป็นกรด-ด่าง ที่เป็นกลาง (pH 7.0) ในน้ำตาลทุกๆ ระดับ (ร้อยละ 0 7 และ 15) เมื่อผ่านการเติมน้ำร้อน (95°C) มีความคงตัวของค่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS ของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงมากที่สุด

3.7 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี

ตารางที่ 9 แสดงกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์เอซีอีของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสท RBPH และ < 50 RBPH ที่เติมในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน ซึ่งอยู่ในช่วงร้อยละ 60.28 – 62.95/100 ไมโครกรัมโปรตีน พบว่า ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันของปริมาณน้ำตาล ความเป็นกรด-ด่าง และความร้อน ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี ($p > 0.05$) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงมีความคงตัวของกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์เอซีอีต่อสภาวะการมีระดับน้ำตาล ความเป็นกรด-ด่าง และความร้อน ที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wu และ Ding (2002) ได้ศึกษาโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสทที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส หลังจากนำสารละลายเปปไทด์มาผ่านกระบวนการให้ความร้อนโดยใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 20 40 60 80 และ 100 $^{\circ}\text{C}$ นาน 2 ชั่วโมง พบว่าการใช้อุณหภูมิและระยะเวลาในการให้ความร้อนแตกต่างกันไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี และการบ่มเปปไทด์จากโปรตีนถั่วเหลือง (ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 2 – 10 (อุณหภูมิ 40 $^{\circ}\text{C}$) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี Hwang (2010) ได้ศึกษาผลของกระบวนการแปรรูปต่อความคงตัวของเปปไทด์ โดยใช้สารละลายโอลิโกเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยน้ำต้มสุกด้วยเอนไซม์โอเรียนเทส (Orientase) มาผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 20 40 60 80 และ 100 $^{\circ}\text{C}$ นาน 2 ชั่วโมง พบว่าการใช้อุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี นอกจากนี้กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์เอซีอีและปริมาณของเปปไทด์เหลืออยู่สูงหลังผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 $^{\circ}\text{C}$ นาน 2 ชั่วโมง ที่ pH 2, 4, 6, 8 และ 10

ตารางที่ 8 ความสามารถในการจับเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) ของผลิตภัณฑ์เครื่องคั่วเมล็ดงาโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทพวงไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชันภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน

ปริมาณ น้ำตาล (%)	ความเป็น กรด-ด่าง (pH)	Fe^{2+} chelating ability (μM EDTA/200 μg protein)			
		RBPH		< 50 RBPH	
		น้ำอุณหภูมิห้อง (30°C)	น้ำร้อน (95°C)	น้ำอุณหภูมิห้อง (30°C)	น้ำร้อน (95°C)
0	3.5	6.04±1.63 ^d	2.44±0.66 ^a	6.25±1.53 ^{ABC}	4.38±0.07 ^A
	4.5	9.16±0.68 ^{de}	4.07±0.83 ^a ^b	15.72±0.49 ^E	6.21±0.27 ^{ABC}
	7.0	25.56±0.16 ^h	20.55±0.49 ^g	48.08±0.71 ^K	40.25±0.10 ^H
7	3.5	10.77±0.64 ^c	2.67±0.28 ^a	8.01±0.67 ^C	5.51±0.56 ^a ^B
	4.5	10.46±0.88 ^{de}	5.24±0.72 ^{bc}	24.98±2.11 ^F	10.54±0.50 ^D
	7.0	33.65±0.85 ^k	21.37±0.26 ^g	46.79±0.56 ^{JK}	42.29±0.05 ^I
15	3.5	12.46±1.44 ^f	3.06±0.08 ^a	6.82±0.54 ^{BC}	6.05±0.13 ^a ^B
	4.5	21.67±0.49 ^g	6.38±0.02 ^c	27.31±0.97 ^G	11.45±0.18 ^D
	7.0	30.47±0.39 ^{ij}	29.19±0.91 ^{ij}	45.80±1.41 ^J	42.98±0.21 ^I

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ของ 2 ซ้ำ การทดลอง (replication)

RBPH และ < 50 RBPH คือ โปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเตรชันขนาด 50 กิโลดาลตัน

^{a-k} ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งและแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

^{A-K} ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งและแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 9 ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์เอซีของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองเดิมโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทพวง (ไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชัน) ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน

ปริมาณ น้ำตาล (%)	ความเป็น กรด-ด่าง (pH)	ACE inhibition (% /100 µg protein)			
		RBPH ^{ns}		< 50 RBPH ^{ns}	
		น้ำอุณหภูมิห้อง (30°C)	น้ำร้อน(95°C)	น้ำอุณหภูมิห้อง (30°C)	น้ำร้อน (95°C)
0	3.5	61.27±1.32	61.15±0.86	82.96±1.92	80.98±0.41
	4.5	62.95±1.12	60.94±1.51	80.94±1.86	80.55±0.03
	7.0	60.68±2.27	61.03±1.56	81.03±1.56	81.10±0.01
7	3.5	60.28±0.43	61.01±0.08	81.08±0.23	80.36±0.72
	4.5	61.58±0.83	61.21±0.12	81.41±0.16	80.71±0.45
	7.0	62.81±1.23	60.36±1.08	80.56±1.08	81.04±0.06
15	3.5	61.64±1.05	61.01±0.62	81.06±2.14	80.30±1.27
	4.5	61.73±1.03	60.42±0.18	80.32±0.81	80.30±1.20
	7.0	61.24±0.46	60.28±1.39	80.78±1.13	80.86±0.33

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ของ 2 ซ้ำ การทดลอง (replication)

RBPH และ < 50 RBPH คือ โปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทไม่ผ่านและผ่านเมมเบรนอัลตราฟิลเทรชันขนาด 50 กิโลดาลตัน

^{ns} ทรีทเมนต์ทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p > 0.05)

บทที่ 5

สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการวิจัย

การศึกษาผลของการแยกส่วนด้วยเทคนิคอัลตราฟิльтраชันและความร้อนต่อความคงตัวของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ (pH 7.0) ที่อุณหภูมิห้อง (~30 °ซ.) และที่ 95 °ซ. (ไม่เติมน้ำตาล) พบว่า ความร้อนและขนาดของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงที่ผ่านและไม่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 50 กิโลดาลตัน (RBPH และ < 50 RBPH) ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด นอกจากนี้การแยกส่วนด้วยเมมเบรนอัลตราฟิльтраชัน (< 50 RBPH) นั้นยังทำให้มีโปรตีนเข้มข้นมากขึ้น แต่ความร้อนไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน ในขณะที่ความร้อนและขนาดของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงมีผลต่อปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS และความสามารถในการจับเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) และเมื่อเปรียบเทียบโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงทั้ง 2 ขนาด พบว่าโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงขนาด < 50 กิโลดาลตัน มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์เอซีอีและการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า และให้สารละลายที่มีความใสมากกว่า

จากการศึกษาผลของ ปริมาณน้ำตาล ความเป็นกรด-ด่าง และความร้อน ต่อความคงตัวของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงแต่ละขนาด (RBPH และ < 50 RBPH) พบว่ามีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ เมื่อปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเพิ่มขึ้นด้วยแต่ความร้อนและความเป็นกรด-ด่าง ไม่มีผลต่อปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และเมื่อพิจารณาค่าร้อยละของแสงที่ส่องผ่านของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสททั้ง 2 ขนาดพบว่ามียุทิสพลร่วมของสามปัจจัยซึ่งมีผลต่อค่าร้อยละของแสงที่ส่องผ่าน โดยเครื่องดัดแปลงมีค่าการส่องผ่านของแสงลดลงที่สภาวะพีเอชและปริมาณน้ำตาลต่ำ แต่อุณหภูมิสูง และเช่นเดียวกันปัจจัยทั้งสามมีผลทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลงเมื่อผ่านการเติมน้ำร้อน ค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้นและปริมาณน้ำตาลที่ลดลง ในทางตรงกันข้ามปัจจัยทั้งสาม ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทมีความคงตัวต่อความร้อน ปริมาณน้ำตาลและความเป็นกรด-ด่าง โดยเฉพาะที่สภาวะเป็นกลาง (pH 7.0) ในน้ำตาลทุก ๆ ระดับ (ร้อยละ 0, 7 และ 15) เมื่อผ่านการเติมน้ำร้อน (95°ซ) พบว่าโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผงมีความคงตัวมากที่สุด จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเปปไทด์รำข้าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระบบเครื่องดัดแปลงที่มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์เอซีอีได้อย่างหลากหลาย อย่างไรก็ตามสำหรับการพัฒนาเครื่องดัดแปลงที่สภาวะกรดจะส่งผลให้การต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์ลดลง

2. ข้อเสนอแนะ

2.1 เนื่องจากในขั้นตอนการทดลองอาจเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล (Browning reaction) ในระหว่างการสกัดโปรตีนที่ใช้สภาวะต่างสูง (pH 11) เนื่องจากการทำปฏิกิริยาระหว่างแป้งข้าวที่ปนมากับวัตถุดิบและโปรตีนในรำข้าว นอกจากนี้การเติมปริมาณน้ำตาลระดับต่าง ๆ ลงในระบบเครื่องคั้นจำลองอาจเกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโนในโปรตีนไฮโดรไลเสทจากรำข้าวได้ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพื่อให้ทราบว่าสมบัติการต้านออกซิเดชันเกิดจากผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลด้วยหรือไม่

2.2 ควรศึกษาการมีปฏิสัมพันธ์ (Interaction) ของเปปไทด์กับส่วนประกอบต่างๆ ในอาหาร นอกจากน้ำตาลและกรดซิตริก และความคงตัวของเปปไทด์รำข้าวต่อกระบวนการแปรรูปอาหารวิธีอื่นๆ

2.3 ควรศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบและลำดับของกรดอะมิโนของเปปไทด์รำข้าวเมื่อผ่านกระบวนการแปรรูปอาหาร

2.4 ควรมีการพัฒนาโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทโดยเติมเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหาร หรือเครื่องคั้นเพื่อสุขภาพต่าง ๆ ที่มีสภาวะใกล้เคียงกับสภาพแวดล้อมจริง

เอกสารอ้างอิง

- ขวัญหญิง คุ่มทองกลาง. 2546. การศึกษาการสกัดและสมบัติทางหน้าที่ของโปรตีนรำข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาอุตสาหกรรมเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- จารุตา วิเศษสรโรช. 2545. การใช้เอนไซม์ในการผลิตรำข้าวโปรตีนสูง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จิราพร เพลินจิต. (บ.ป.ป.). ความคงตัวของกรดฟีนอลิกในน้ำถึงวิกฤต. การประชุมวิชาการบัณฑิตศึกษา ศิลปากร ระดับชาติ ครั้งที่ 1. สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- ตลาดสินค้าล่วงหน้าแห่งประเทศไทย. 2551. การผลิตข้าวหอมมะลิของไทย. ค้นคว้าได้จาก http://www.afet.or.th/v081/thai/product/bhmr/statistic_production.php. ค้นคว้าเมื่อ 30 พฤศจิกายน 2554.
- ประพันธ์ ปิ่นศิริโรตม. 2535. การเกิดตะกอนความขุ่นในเบียร์. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 10 (1) : 1-7.
- วันชัย ดันติวิทยาพิทักษ์. 2541. ข้าวไทย: รสชาติ เมล็ดพันธุ์ อ้างอิงใน อรอนงค์ นัยวิกุล. 2547. ข้าว: วิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศุภวรรณ ถาวรชินสมบัติ และหทัยกาญจน์ กกกแก้ว. อนุสิทธิบัตรระดับชาติ เรื่อง การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากรำข้าวที่มีคุณสมบัติลดความดัน เลขที่ 4844 ได้รับเมื่อวันที่ 22 ก.ค. 2551.
- สุนันทา วงศ์ปิยชน และ วชิร สุขวิวัฒน์. 2552. ผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพจากรำข้าวสกัดน้ำมัน (II) ผลิตภัณฑ์ข้าวพองอัดแท่งผสมรำข้าว. การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ประจำปี 2552. กรมการข้าวสำนักวิจัยและพัฒนาข้าว. 142-154.
- สมพร อิศวิลานนท์ และ ปรุฬห์ สันติธรรมรักษ์. 2555. รายงานสถานการณ์การผลิตและการค้าข้าวของโลกและของไทยปี 2554 และแนวโน้ม KNIT Agricultural Policy No. 2012-1. 22 หน้า.
- สรญา ธิมาชัย. 2554. ผลของเอนไซม์โปรตีเอสต่อคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสท. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- หทัยกาญจน์ กกกแก้ว. 2550. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากรำข้าวหอมมะลิและคุณสมบัติด้านไบโอแอคทีฟ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- อรอนงค์ นัยวิกุล. 2550. ข้าว: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 366 หน้า.
- Aluko RE, Monu E. 2003. Functionality and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysate. Food Chem Toxicol. 68: 1254 – 1258.

- AOAC. 2000. Association of official analytical chemists: Official Methods of Analysis. 16th Edition. Washington, DC.
- Bonoli M, Marconi E, Caboni MF. 2004. Free and bound phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.) flours Evaluation of the extraction capability of different solvent mixtures and pressurized liquid methods by micellar electrokinetic chromatography and spectrophotometry. J Chromatogr A 1057 : 1–12
- Contreras MM, Sevilla MA, Monroy-Ruiz J, Amigo L, Gomez-Sala B, Molina E, Ramos M, Recio I. 2011. Food-grade production of an antihypertensive casein hydrolysate and resistance of active peptides to drying and storage. Int Dairy J 21 : 470 – 476.
- Davies EA, Bevis HE, Potter R, Harris J, Williams GC, Delves-Broughton J. 1998. Research note : The effect of pH on the stability of nisin solution during autoclaving. Letters in Applied Microbiology 27 : 186-187.
- Dong S, Zeng M, Wang D, Liu Z, Zhao Y, Yang H. 2008. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Food Chem 107 (4) : 1485-1493.
- Gnanasambandam R, Hettiarachchy N-S. 1995. Protein concentrates from unstabilized and stabilized rice bran : properties. J Food Sci 54 (1) : 142-145.
- Hwang J-S. 2010. Impact of processing on stability of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides obtained from tuna cooking juice. Food Res Int 43 : 902 – 906.
- Iqbal S, Bhangar MI, Anwar F. 2007. Antioxidant properties and components of bran extracts from selected wheat varieties commercially available in Pakistan. LWT 40 : 361-367.
- Ishii S, Yokotsuka T. 1972. Clarification of fruit juice by pectin *trans*-eliminase. J Agric Food Chem 20(4) : 787-791.
- Jiamyangyuen S, Srijesdaruk V, Harper J.W. (2005). Extraction of rice bran protein concentrate and its application in bread. Songklanakarin J Sci Technol 27(1) : 55-62.
- Kawamura Y, Muramoto M. 1993. Anti-tumorigenic and immunoactive protein and peptide factors in food stuff. 2. Antitumorigenic factors in rice bran. In: Food and cancer prevention chemical and biological aspects, pp. 331–401. Waldron KW, Johnson IT, Fenwick LR, Eds. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Kähkönen MP, Hopia AL, Vourela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. 1999. Antioxidant activities of plant extracts containing phenolic compounds. J Agric Food Chem 47: 3954-3962.

- Korhonen H, Pihlanto A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *Int Dairy J.* 16 : 945 – 960.
- Li GH, Liu H, Shi YH, Shrestha S. 2004. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food protein and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Res* 24 (7) : 469-486.
- Li GH, Liu H, Shi YH, Le GW. 2005. Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. *J Pharm Biomed Anal.* 37 : 219-224.
- Lowry O-H, Rosebrough N-J, Farr A-L, Randall R-J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Food Chem* 193 (1) : 265-275.
- Moure A, Dominguez H, Parajo C-J. 2006. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fraction from industrial effluents and their hydrolysates. *J Proc Biochem* 41 (2) : 447-456.
- Prakash J. 1991. Studies on Rice Bran Proteins and Their Use in Food Formulations, Ph.D. Dissertation. Mysore, India: University of Mysore.
- Prakash J. 1996. Rice bran proteins: properties and food uses. *Critical Rev Food Sci Nutr*, 537-552 (6): 36.
- Raghavan S, Kristinsson H-G. 2009. ACE-inhibition activity of tilapia protein hydrolysates. *Food Chem* 117 (4) : 582-588.
- Rivas A, Rodrigo D, Company B, Sampedro F, Rodrigo M. 2007. Effects of pulsed electric fields on water-soluble vitamins and ACE inhibitory peptide add to a mixed orange juice and milk bererage. *Food Chem* 104 : 1550 –1559.
- Reunanen J, Saris PEJ. 2004. Bioassay for nisin in sausage; a shelf life study of nisin in cooked sausage. *Meat Science* 66 : 515 - 518.
- Salcedo-Chaves B, Osuna-Casrto JA, Guevara-Lara F, Domingue-Domingues J, Paredes-Lopez O. 2002. Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amarants (*Amaranthus cruentus*) Seed. *J Agric Food Chem* 50 : 6515-6520.
- Sathivel S, Bechtel P-J, Babbitt J, Smiley S, Crapo C, Reppond K-D, Prinyawiwatkul W. 2003. Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) by product hydrolysate. *J Food Sci* 68 (7) : 2196-2200.
- Shih FF. 2003. An update on the processing of high-protein rice products. *Nahrung* 47(6) : 420-424.

- Tanabe M, Saeki H. 2001. Effect of maillard reaction with glucose and ribose on solubility at low ionic strength and filament-forming ability of fish myosin. *J Agric Food Chem* 49: 3403-3407.
- Thiansilakul Y, Benjakul S, Shahidi F. 2007. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food chemistry* 103: 1385–1394.
- Wu J, Ding X. 2002. Characterization of inhibition and stability of soy-protein derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Res Int* 35 (4): 367–375.
- Xu G, Ye X, Chen J, Liu D. 2007. Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *J Agric Food Chem* 55: 330-335.
- Yin LJ, Tong YL, Jiang ST. 2005. Improvement of the functionality of minced mackerel by hydrolysis and subsequent lactic acid bacterial fermentation. *J Food Sci* 70: M172–M178.
- Yoshie-Stark Y, Bez J, Wasche A. 2006. Effect of different pasteurization conditions on bioactivities of *Lupinus albus* protein isolates. *LWT - Food Science and Technology* 39 (2) : 118-123.
- Zhao J, Huang GR, Zhang MN, Chen WW, Jiang JX. 2011. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant stability of shrimp processing byproduct hydrolysate. *American J Food Technol* 6 (10) : 904-913.

ภาคผนวก

1. ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (AOAC 2000)

1.1 อุปกรณ์

Hand refractometer

1.2 วิธีทดลอง

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองที่สภาวะต่างๆ วัดด้วย hand refractometer อ่านปริมาณของของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ในหน่วยของสารริกซ์

2. ร้อยละของแสงที่ส่องผ่าน (% Transmittance) (Ishii และ Yokotsuka 1972)

ร้อยละของแสงที่ส่องผ่าน (% Transmittance) คือ สัดส่วนของความเข้มของแสงที่ผ่านเข้าไปในตัวอย่างต่อความเข้มของแสงที่ผ่านออกมา นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจำลองไปวัดค่าร้อยละของแสงที่ส่องผ่าน (% Transmittance) ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (Lowry and others 1951)

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

3.1.2 ปิเปต

3.1.3 หลอดทดลอง

3.2 สารเคมี

3.2.1 คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

3.2.2 โซเดียมซิทเรท ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

3.2.3 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

3.2.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3.2.5 โฟลินฟีนอล (folin-Ciocalteu phenol reagent)

3.2.6 โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumine)

3.3 วิธีทดลอง

3.3.1 การเตรียมสารละลาย

1) สารละลาย ก นำคอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) จำนวน 0.5 กรัม ผสมกับโซเดียมซิทเรท ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) จำนวน 1 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2) สารละลาย ข นำโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) จำนวน 20 กรัม ผสมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จำนวน 4 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3) สารละลาย ค นำ สารละลาย ก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย ข ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

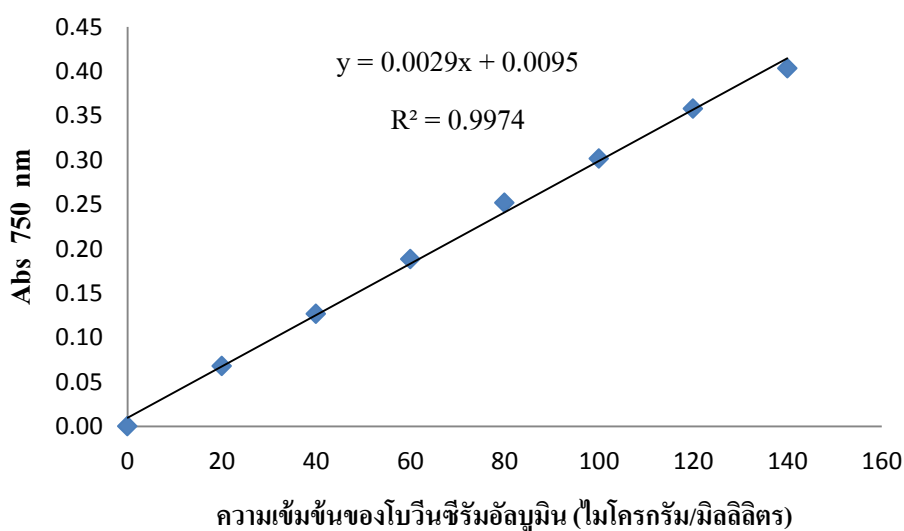
4) สารละลาย ง โฟลินฟีนอล (folin-Ciocalteu phenol reagent) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

3.3.2 นำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสทปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย ค ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-10 นาที

3.3.3 เติมสารละลาย ง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20-30 นาที

3.3.4 นำสารละลายผสมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

3.3.5 หาปริมาณโปรตีนในสารละลายโดยเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของโบวันซีรัมอัลบูมิน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (ภาพผนวกที่ 1)



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของโบวันซีรัมอัลบูมิน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

4. การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS (ABTS radical-scavenging activity) (Yin และคณะ 2005)

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 4.1.1 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
- 4.1.2 ปิเปต
- 4.1.3 หลอดทดลอง

4.2 สารเคมี

- 4.2.1 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
- 4.2.2 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
- 4.2.3 โพแทสเซียมซัลเฟต ($K_2S_4O_8$)
- 4.2.4 โทรลอกซ์ (6-Hydroxyl-2,5,7,8 tetramethyl-chloroman-2-carboxylic acid; Trolox)
- 4.2.5 โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 (Sodium phosphate buffer)
- 4.2.6 2, 2'-เอซิโนบิส (3-เอธิลเบนโซไทโรเอโซลิน-6-ซัลโฟนิคแอซิด) (2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline -6-sulfonic acid; ABTS)

4.3 วิธีทดลอง

4.3.1 เตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.0 (ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.818 และโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.0015)

4.3.2 เตรียมอนุมูล ABTS โดยนำสารละลาย ABTS มาผสมกับสารละลายโพแทสเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรที่เท่ากัน

4.3.3 เตรียมสารละลายโปรตีนร่าข้าวไฮโดรไลเสทความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือตัวควบคุม (เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.0 แทนตัวอย่างโปรตีนร่าข้าวไฮโดรไลเสท) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย ABTS ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 6 นาที ในที่มืด

4.3.4 นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

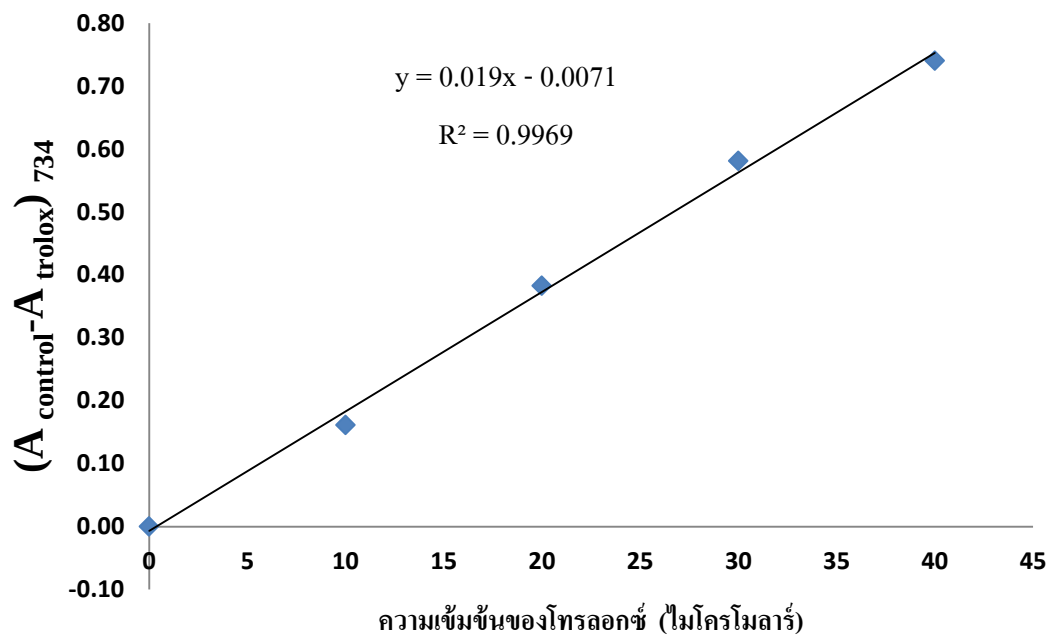
4.3.5 คำนวณหาความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS (ร้อยละ) จาก

$$\text{กิจกรรมการยับยั้งอนุมูล ABTS (ร้อยละ)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุม

B = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

4.3.6 เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS ของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสท กับ Trolox โดยสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ Trolox กับค่าความแตกต่างของการดูดกลืนแสงของอนุมูล ABTS เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม ($A = (A_{\text{control}} - A_{\text{trolox}})_{734 \text{ nm}}$) โดยใช้ความเข้มข้นของ Trolox ตั้งแต่ 0 ถึง 40 ไมโครโมลาร์ (ภาพผนวกที่ 2)



ภาพผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ Trolox (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และค่าความแตกต่างของการดูดกลืนแสงของอนุมูล ABTS เทียบกับตัวควบคุมที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

5. การวิเคราะห์ความสามารถในการจับกับเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+} Chelating ability) (Yin and 2005)

5.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

5.1.1 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

5.1.2 ปิเปต

5.1.3 หลอดทดลอง

5.2 สารเคมี

5.2.1 เฟอโรซีน ((3-(2-Pyridyl)-5,6 diphenyl-1,2,4-triazine-4',4' '- disulfonic acid monosodium salt))

5.2.2 เมทานอล (Methanol)

5.2.3 เอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติกแอซิด (Ethylenediminettra acetic acid; EDTA)

5.2.4 ไอรอนคลอไรด์ ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

5.2.5 โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0

5.3 วิธีทดลอง

5.3.1 เตรียมสารละลายโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือตัวควบคุม (เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.0 แทนตัวอย่างโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสท) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร

5.3.2 เติมนเมทานอล ปริมาตร 3.7 มิลลิลิตร และไอรอนคลอไรด์ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

5.3.3 จากนั้นเติมเฟอโรซีนความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 10 นาที

5.3.4 นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร

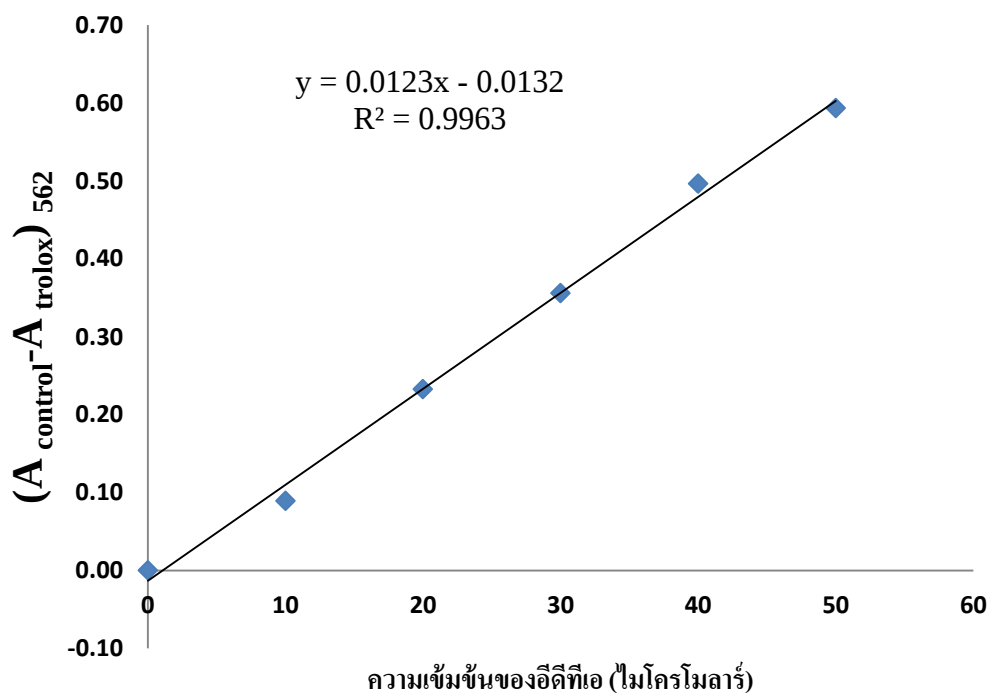
5.3.5 คำนวณความสามารถในการจับกับเฟอร์รัสไอออน (ร้อยละ) จาก

$$\text{ความสามารถในการจับกับเฟอร์รัสไอออน (ร้อยละ)} = \frac{(A-B) \times 100}{A}$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุม (โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

5.3.6 เปรียบเทียบความสามารถในการจับกับเฟอร์รัสไอออน ของโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทกับ อีดีทีเอ โดยสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของอีดีทีเอกับค่าความแตกต่างของการดูดกลืนแสงของเฟอร์รัสไอออน เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม ($A = (A_{\text{control}} - A_{\text{EDTA}})_{562 \text{ nm}}$) โดยใช้ความเข้มข้นของอีดีทีเอ ตั้งแต่ 0 ถึง 50 ไมโครโมลาร์ (ภาพผนวกที่ 3)



ภาพผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของอีดีทีเอ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และค่าความแตกต่างของการดูดกลืนแสงของเฟอร์รัสไอออนเทียบกับตัวควบคุมที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร

6. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Iqbal และคณะ 2007)

6.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

6.1.1 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

6.1.2 ปิเปต

6.1.3 หลอดทดลอง

6.2 สารเคมี

6.2.1 กรดแกลลิก (gallic cid)

6.2.2 เมทานอล (Methanol)

6.2.3 โฟลินฟีนอล (folin-Ciocalteu phenol reagent)

6.2.4 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

6.3 วิธีทดลอง

6.3.1 เตรียมกรดแกลลิก หรือสารละลายโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทผง 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

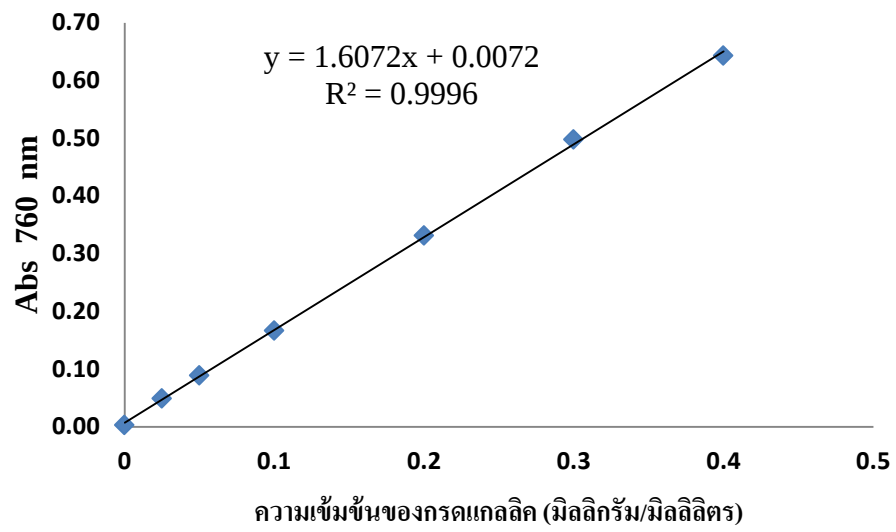
6.3.2 เติมน้ำ DI (Dionized water) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร

6.3.3 เติมสารโฟลินฟีนอล (เจือจางด้วยน้ำ 1 : 10) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร จากนั้นทิ้งที่อุณหภูมิห้องไว้ประมาณ 10 นาที

6.3.4 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6.3.5 นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

6.3.6 คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกรดแกลลิก (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร (ภาพผนวกที่ 4)



ภาพผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกรดแกลลิก (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงของที่มีความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร

7. การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี (Angiotensin I –converting enzyme; ACE)
(Li and others 2005)

7.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 7.1.1 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
- 7.1.2 ปิเปต
- 7.1.3 หลอดทดลอง
- 7.1.4 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

7.2 สารเคมี

- 7.2.1 กรดไฮโดรคลอริก
- 7.2.2 เกลือเฮปส์โซเดียม (HEPES sodium salt)
- 7.2.3 ควิโนลีน (Quinoline)
- 7.2.4 โซเดียมคลอไรด์
- 7.2.5 เบนซีนซัลโฟนิลคลอไรด์ (Benzene sulfonyl chloride; BSC)
- 7.2.7 เอทานอล
- 7.2.8 เอนไซม์ย่อยแองจิโอเทนซินวัน (Angiotensin I-converting enzyme ; EC 3.4.15.1 from rabbit lung)
- 7.2.9 ฮิปปิวรีล-แอล-ฮิสทีดิล-แอล-ลิวซีน (Hippury-L-histidyl-L-Leucine; HHL)

7.3 วิธีทดลอง

7.3.1 การเตรียมสารละลาย

7.3.1.1 สารละลายบัฟเฟอร์เฮปส์ไฮโดรคลอริก (HEPES HCl buffer) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (ประกอบด้วยสารละลายเกลือเฮปส์โซเดียมความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์) pH 8.3 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เตรียมโดยนำเกลือเฮปส์โซเดียม (HEPES sodium salt) และโซเดียมคลอไรด์มาละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับ pH ไปที่ 8.3 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

7.3.1.2 เตรียมสารละลายฮิปปิวรีล-แอล-ฮิสทีดิล-แอล-ลิวซีน (HHL) ความเข้มข้น ร้อยละ 0.3 ในสารละลายบัฟเฟอร์เฮปส์ไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

7.3.1.3 เตรียมสารละลายเอนไซม์เอซีอีความเข้มข้น 100 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์เฮปส์ไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

7.3.2 การเตรียมตัวอย่าง

7.3.2.1 เติมสารละลายโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในสารละลายฮิบพิวรีล-แอล-ฮิสทีดิล-แอล-ลิวซีน ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

7.3.2.2 เติมสารละลายเอนไซม์เอซีอีความเข้มข้น 100 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

7.3.2.3 หยดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 นอร์มัล ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

7.3.2.4 ปรับปริมาตรเป็น 0.5 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เฮเพสไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.3 (เอนไซม์เอซีอีจะย่อยฮิบพิวรีล-แอล-ฮิสทีดิล-แอล-ลิวซีน ซึ่งเป็นสับสเตรตและปล่อยกรดฮิบพิวริกออกมา)

7.3.2.5 เติมควิโนลีน ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นาน 10 วินาที

7.3.2.6 เติมเบนซีนซัลโฟนิลคลอไรด์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที นาน 20 วินาที นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ในที่มืด

7.3.2.7 เติมเอธานอลปริมาตร 3,700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ในที่มืด

7.3.2.8 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

7.3.3 การเตรียมตัวอย่างควบคุม

7.3.3.1 เติมสารละลายฮิบพิวรีล-แอล-ฮิสทีดิล-แอล-ลิวซีน ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์เฮเพสไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

7.3.3.2 เติมสารละลายเอนไซม์เอซีอีความเข้มข้น 100 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

7.3.3.3 หยดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 นอร์มัล ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

7.3.3.4 เติมสารละลายโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทปริมาตร 20 ไมโครลิตร

7.3.3.5 ปรับปริมาตรเป็น 0.5 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เฮเพสไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

7.3.3.6 เติมควิโนลีน ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นาน 10 วินาที

7.3.3.7 เดิมเบนซินซัลโฟนิลคลอไรด์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที นาน 20 วินาที นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ในที่มีด

7.3.3.8 เดิมเอธานอลปริมาตร 3,700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ในที่มีด

7.3.3.9 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

7.3.4 การเตรียมแบลงค์ (Blank)

7.3.4.1 เดิมสารละลายเอนไซม์เอซีอีเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 นอร์มัล ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

7.3.4.2 เดิมสารละลายอิมพิวริล-แอล-ฮิสทีดิล-แอล-ลิวซีน ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

7.3.4.3 เดิมสารละลายโปรตีนรำข้าวไฮโดรไลเสทปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

7.3.4.4 ปรับปริมาตรเป็น 0.5 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เฮเพสไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

7.3.4.5 เดิมควิโนลีน ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นาน 10 วินาที

7.3.4.6 เดิมเบนซินซัลโฟนิลคลอไรด์ (BSC) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที นาน 20 วินาที นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ในที่มีด

7.3.4.7 เดิมเอธานอลปริมาตร 3,700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ในที่มีด

7.3.4.8 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

7.3.5 คำนวณสามารถในการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี (ร้อยละ)

$$\text{สามารถในการยับยั้งเอนไซม์เอซีอี (ร้อยละ)} = \frac{(B-A) \times 100}{(B-C)}$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

B = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุม (เติมบัฟเฟอร์แทนตัวอย่าง)

C = ค่าการดูดกลืนแสงของแบงก์ (เติมกรดไฮโดรคลอริกก่อนเอนไซม์)