ผลของปริมาณรำข้าวและเอนไซม์อัลคาเลสต่อระดับการย่อยโปรตีน ผลผลิต และฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระของเพปไทด์ไฮโดรไลเซทจากรำข้าวสกัดน้ำมัน

กุลรภัส วชิรศิริ[1*] โศรดา วัลภา[2] มณีรัตน์ มีพลอย[3] ดำรงชัย สิทธิสำอาง[1] และ ยุทธศักดิ์ สุบการี[4]
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

** Corresponding Author: kulraphat@tistr.or.th*
[1] นักวิจัย ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมอาหารสุขภาพ (ศนอ.)
[2] ผู้เชี่ยวชาญวิจัย ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมอาหารสุขภาพ (ศนอ.)
[3] นักวิจัย ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมเกษตรสร้างสรรค์ (ศนก.)
[4] ผู้ช่วยวิจัย ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมอาหารสุขภาพ (ศนอ.)

ข้อมูลบทความ

ประวัติบทความ :
รับเพื่อพิจารณา : 30 ธันวาคม 2563
แก้ไข : 22 มิถุนายน 2564
ตอบรับ : 13 กรกฎาคม 2564
DOI : 10.14456/kmuttrd.2021.5

คำสำคัญ :
รำข้าว / เพปไทด์ไฮโดรไลเซท / เอนไซม์อัลคาเลส / ระดับการย่อยโปรตีน / การกำจัดอนุมูลอิสระ

บทคัดย่อ

ในการผลิตเพปไทด์ไฮโดรไลเซทจากรำข้าว มีหลากหลายปัจจัยที่มีผลต่อระดับการย่อยของโปรตีน ปริมาณผลผลิต และฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระของเพปไทด์-ไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของปริมาณรำข้าวในช่วง 2.0 – 30.0 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร และปริมาณเอนไซม์อัลคาเลสในช่วง 0.0011 – 0.2100 มิลลิลิตรต่อกรัมรำข้าวแห้ง ต่อระดับการย่อยโปรตีน ผลผลิต และฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระของเพปไทด์ไฮโดรไลเซทจากรำข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ผ่านกระบวนการสกัดน้ำมันออกแล้ว จากผลการทดลอง พบว่า ปริมาณรำข้าวที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ระดับการย่อยโปรตีนและปริมาณผลผลิตเพปไทด์ลดลง แต่ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่การเพิ่มขึ้นของปริมาณเอนไซม์อัลคาเลสทำให้ระดับการย่อยโปรตีนและปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้น แต่เพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่ได้มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยปริมาณรำข้าว 20 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร และเอนไซม์อัลคาเลส 0.00875 มิลลิลิตรต่อกรัมรำข้าวแห้งคือปริมาณสัดส่วนที่เหมาะสม ซึ่งให้ระดับการย่อยโปรตีนและผลผลิตในปริมาณสูงร้อยละ 20.21 ± 0.54 และ 32.19 ± 0.70 โดยน้ำหนัก มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และค่าความสามารถในการรีดิวซ์-เฟอร์ริก ร้อยละ 44.02 ± 5.88 และ 159.72 ± 5.56 ไมโครโมล Fe^{2+} ต่อกรัมตัวอย่างตามลำดับ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณรำข้าวและเอนไซม์อัลคาเลสในสัดส่วนที่เหมาะสมจะทำให้ได้เพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่มีฤทธิ์ชีวภาพปริมาณสูง ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเพปไทด์ในระดับอุตสาหกรรมและได้เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่เหมาะสม

The Effects of Rice Bran and Alcalase Contents on Degree of Hydrolysis, Yield and Free Radical Scavenging Activities of Peptide Hydrolysates from Defatted Rice Bran

Kulraphat Wachirasiri[1*], Sorada Wanlapa[2], Maneerat Meeploy[3], Damrongchai Sitthisomang[1] and Yuttasak Subkaree[4]

Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

* *Corresponding Author: kulraphat@tistr.or.th*

[1] *Researcher, Expert Centre of Innovative Health Food (InnoFood)*

[2] *Research Expert, Expert Centre of Innovative Health Food (InnoFood)*

[3] *Researcher, Expert Centre of Innovative Agriculture (InnoAg)*

[4] *Research assistant, Expert Centre of Innovative Health Food (InnoFood)*

Article Info

Article History:
Received: December 30, 2020
Revised: June 22, 2021
Accepted: July 13, 2021
DOI : 10.14456/kmuttrd.2021.5

Keywords:
Rice Bran / Alcalase / Peptide Hydrolysate / Degree of Hydrolysate / Free Radical Scavenging Activity

Abstract

As a number of factors are known to influence the degree of hydrolysis (DH) of protein, yield and free radical scavenging activity of peptide hydrolysate, the present study investigated the effects of rice bran concentration (2.0-30.0 g/100 mL) and alcalase concentration (0.0011– 0.210 mL/g rice bran DM) on DH, yield and free radical scavenging activities of peptide hydrolysates from defatted rice bran. The results showed that both rice bran and alcalase concentrations significantly affected DH, yield and DPPH radical scavenging activity of the hydrolysates ($p \leq 0.05$). An increase in rice bran concentration had negative effect on DH and yield, while increased DPPH radical scavenging activity was observed. DH and yield of hydrolysates increased when the alcalase concentration increased; DPPH radical scavenging activity nevertheless decreased. The optimal condition was noted to be 20.0 g DM in 100 mL and alcalase concentration 0.00875 mL/ g rice bran DM; these resulted in 20.21 ± 0.54% DH, 32.19 ± 0.70% (w/w) yield, 44.02 ± 5.88% DPPH radical scavenging activity and 159.72 ± 5.56 µmol Fe^{2+}/g sample ferric reducing antioxidant power. The results of the study indicated that both rice bran and alcalase concentrations affect free radical scavenging activities of peptide hydrolysates. The identified optimal condition can increase industrial production efficiency and result in suitable bioactive peptides.

1. บทนำ

เพปไทด์ไฮโดรไลเซทเป็นผลิตผลที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยสารเคมีหรือเอนไซม์ที่เหมาะสมจนได้เพปไทด์และกรดอะมิโนอิสระที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ สามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ ปรับระบบภูมิคุ้มกัน กระตุ้นการผลิตเม็ดเลือดขาว [1-6] กระบวนการกำจัดอนุมูลอิสระของเพปไทด์ไฮโดรไลเซทเกิดจากการให้โปรตอน (H^+) หรืออิเล็คตรอน (e^-) กับอนุมูลอิสระและจับกับไอออนโลหะเกิดเป็นสารประกอบที่มีความเสถียรไม่ว่องไวต่อปฏิกิริยา [3, 7] ด้วยเหตุนี้เพปไทด์ไฮโดรไลเซทจึงได้รับความสนใจและนำมาใช้เป็นส่วนผสมเพื่อการผลิตอาหารฟังก์ชัน (Functional food) การผลิตเพปไทด์ไฮโดรไลเซทด้วยวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส (Protease) เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาค่อนข้างจำเพาะเจาะจงในการตัดพันธะเพปไทด์ ก่อให้เกิดสิ่งเจือปนน้อย ไม่สร้างสารพิษ อีกทั้งให้เพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ซึ่งเหมาะแก่การนำไปใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหาร [3, 8-9] โดยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่นิยมศึกษาและใช้ในการผลิต อัลคาเลสเป็นเอนไซม์ชนิดเอนโดโปรตีเอส (Endoprotease) จะตัดพันธะเพปไทด์จากภายในของสายโปรตีนให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นเพปไทด์สายสั้นมากกว่ากรดอะมิโนอิสระ มีประสิทธิภาพสูงในการสกัดโปรตีนจากวัตถุดิบและย่อยโปรตีนเป็นเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ [3, 6, 8, 10]

อย่างไรก็ดี ในกระบวนการผลิตเพปไทด์พบว่าปัจจัยการผลิตได้แก่ ชนิดและปริมาณวัตถุดิบ ชนิดและปริมาณของเอนไซม์พีเอช อุณหภูมิ และระยะเวลา มีผลต่อระดับการย่อยของโปรตีน โครงสร้าง ขนาด ชนิด ลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์ที่ผลิตได้ [1-4] ซึ่งส่งผลกับคุณภาพและและประสิทธิภาพด้านฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้ [3, 6, 9, 10, 12-15] เพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่จะมีขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดัลตัน [1-4] ซึ่งต้องมีระดับการย่อยโปรตีนที่เหมาะสม อย่างไรก็ดี Chaijaroen [11] พบว่าเมื่อระดับการย่อยโปรตีนของเพปไทด์เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 4-5 เป็นร้อยละ 8-13 จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ลดลง [11] เนื่องจากเพปไทด์ที่มีระดับการย่อยโปรตีนที่สูงจะมีความสามารถในการให้ H^+ กับอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าเพปไทด์ที่มีระดับการย่อยโปรตีนต่ำ [11] ระดับการย่อยที่สูงจะทำลายโครงสร้างที่มีความว่องไว (active site) ของเพปไทด์ [3, 12] ทำให้เพปไทด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพลดลง [5, 8, 11] ปริมาณเอนไซม์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีส่วนช่วยให้เพปไทด์ไฮโดรไลเซทมีระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้น [9, 13-15] ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณวัตถุดิบ การศึกษาของ Mahdavi-Yekta และคณะ [16] พบว่าการย่อยพืชตระกูลถั่วด้วยเอนไซม์อัลคาเลสเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์จาก 30 เป็น 60 Anson unit/kg protein จะทำให้เพปไทด์มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 25-27 เป็นร้อยละ 44-46 ตามลำดับ ในขณะที่การเพิ่มปริมาณเอนไซม์จาก 60 เป็น 90 Anson unit/kg protein ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระของเพปไทด์ที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ [16] คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Chaijaroen [11] พบว่า การใช้เอนไซม์เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 1 เป็นร้อยละ 2 ในการย่อยรำข้าวเพปไทด์ที่ได้มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ลดลง [11] ด้วยเหตุนี้การศึกษาปัจจัยเพื่อหาปริมาณสัดส่วนวัตถุดิบและปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมจะช่วยให้การผลิตเพปไทด์ไฮโดรไลเซทมีประสิทธิภาพและได้ผลิตผลที่มีคุณภาพ

รำข้าวเป็นวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรจากโรงงานสกัดน้ำมันมีปริมาณโปรตีนเป็นองค์ประกอบร้อยละ 11–19 โดยน้ำหนักแห้ง ปริมาณไขมันร้อยละ 2 – 20 โดยน้ำหนักแห้ง [3, 10, 13, 17-20] รำข้าวจัดเป็นแหล่งวัตถุดิบที่ดีสำหรับการนำมาผลิตเพปไทด์เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูง วัตถุดิบไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาลและมีปริมาณมาก นอกจากนี้ราคาซื้อขายในท้องตลาดค่อนข้างต่ำเพียงกิโลกรัมละ 5 – 10 บาท รำข้าวจึงเป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีความเหมาะสมทั้งในด้านปริมาณ องค์ประกอบทางเคมี ราคาวัตถุดิบที่สามารถนำมาสร้างมูลค่าเพิ่มโดยการผลิตเพปไทด์ไฮโดรไลเซทได้ [2-4, 11, 21-23] ปัจจุบันการวิจัยศึกษาการผลิตเพปไทด์ไฮโดรไลเซทจากรำข้าวมีผู้ให้ความสนใจอยู่บ้าง แต่การศึกษาผลของปริมาณรำข้าวต่อประสิทธิภาพการผลิตและฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์ไฮโดรไลเซทยังมีการศึกษาไม่แพร่หลายนัก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษาผลของปริมาณวัตถุดิบรำข้าวและเอนไซม์อัลคาเลสต่อระดับการย่อยโปรตีน ผลผลิต และฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระของเพปไทด์เพื่อให้ได้กระบวนการผลิตที่มีประสิทธิภาพและเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่เหมาะสม

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 สารเคมีและวัตถุดิบ

รำข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ผ่านการสกัดน้ำมันออกแล้ว (Defatted rice bran) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท โคราชโรงสียงสงวน จำกัด รำข้าวบรรจุในถุงพลาสติกชนิด LDPE (Low density polyethylene) แบบมีซิปบรรจุถุงละ 1 กก. ขนส่งด้วยรถขนส่งเอกชนระยะเวลาในการขนส่งมายังสถานที่วิจัยไม่เกิน 4 ชั่วโมง รำข้าวเก็บรักษาที่อุณหภูมิ ≤ 10 องศาเซลเซียส ระหว่างรอการทดลอง

เอนไซม์ย่อยโปรตีนทางการค้าชนิด Alcalase 2.4 FG ยี่ห้อ Brenntag สั่งซื้อจากบริษัท Brenntag Ingredients (Thailand) Public Company Limited สารละลาย Folin-Ciocalteu ของบริษัท MERCK, 2,2- diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical (DPPH), 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ), $FeCl_3.6H_2O$ และ TNBS (Picrylsulfonic acid solution) จากบริษัท SIGMA สารมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ ได้แก่ L-Leucine ของบริษัท SIGMA กรดแกลลิก (Gallic acid) และ $FeSO_4.7H_2O$ ของบริษัท FLUKA สารเคมีและเอนไซม์ที่นำมาใช้ในการทดลองทั้งหมดเป็นสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ทดลอง (analytical grade)

2.2 องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว

รำข้าวที่ผ่านการสกัดน้ำมัน (Defatted rice bran) วิเคราะห์องค์ประกอบเคมี ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า และความชื้นด้วยวิธี AOAC 2000 [24]

2.3 ศึกษาผลของปริมาณรำข้าวต่อระดับการย่อยโปรตีน ผลผลิต และฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระของเพปไทด์ไฮโดรไลเซท

ชั่งรำข้าวปริมาณ 2.0 – 30.0 กรัมแห้ง ใส่ลงในขวดดูแรน (Duran)ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาณ 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ เติมเอนไซม์อัลคาเลสปริมาณ 2.8 มิลลิลิตร นำไปย่อยในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยการแช่ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6.0 โมลาร์ แยกกากที่เหลือออกด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ล้างกากด้วยน้ำกลั่นประมาณ 50 มิลลิลิตร) นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณผลผลิตเพปไทด์ไฮโดรไลเซท ระดับการย่อยโปรตีน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ

2.4 ศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ต่อระดับการย่อยโปรตีน ผลผลิต และฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระของเพปไทด์ไฮโดรไลเซท

ชั่งรำข้าวปริมาณ 20.0 กรัมแห้ง ใส่ลงในขวดดูแรนขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาณ 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ เติมเอนไซม์อัลคาเลสปริมาณ 0.022 – 4.200 มิลลิลิตร (ปริมาณเอนไซม์ 0.0011 – 0.210 มิลลิลิตรต่อกรัมรำข้าวแห้ง) นำไปย่อยในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยการแช่ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6.0 โมลาร์ แยกกากที่เหลือออกด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ล้างกากด้วยน้ำกลั่นประมาณ 50 มิลลิลิตร) สารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณผลผลิตเพปไทด์ไฮโดรไลเซท ระดับการย่อยโปรตีน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและระดับการย่อยโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและระดับการย่อยโปรตีนประยุกต์จากงานวิจัยของ Bumrungsart และ Duangmal [15] และ Benjakul และ Morrissey [25] โดยทำการเจือจางตัวอย่างให้เหมาะสม จากนั้นดูดตัวอย่างที่ผ่านการเจือจาง 125 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย phosphate buffer (0.2M, pH 8.2) ปริมาณ 2.0 มิลลิลิตร และสารละลาย TNBS (0.01%,v/v) ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Memmert) ที่ 50 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็น 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย HCl (0.1M) ปริมาณ 2.0

มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (SPECORD®200 PLUS) ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย phosphate buffer เป็น Blank และใช้สารละลาย L-Leucine (ความเข้มข้น 0.20 – 2.00 mmol/L) เป็นสารมาตรฐาน คำนวนระดับการย่อยโปรตีน (Degree of Hydrolysis, %DH) ตามสมการ

$$\text{ระดับการย่อยโปรตีน (\%DH)} = \frac{(L_t - L_0) \times 100}{(L_{max} - L_0)}$$

โดยที่ : L_0 คือ ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระเริ่มต้น (g/g protein)

L_t คือ ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่เวลาใดๆ (g/g protein)

L_{max} คือ ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระทั้งหมด (g/g protein)

หมายเหตุ : * ตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระทั้งหมด (Total free amino acid) หรือ L_{max} จะเตรียมโดยการย่อยรำข้าวปริมาณ 0.100 มิลลิกรัม ด้วย HCl 6.0 โมลลาร์ ปริมาณ 6.0 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วย NaOH 6.0 โมลาร์ ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนแล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระตามวิธีการวิเคราะห์

2.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Determination of Total Phenolic Content)

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Determination of Total Phenolic Content) ดัดแปลงมาจาก Thamnarathip และคณะ [3] โดยการเจือจางสารละลายตัวอย่าง จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu (1:10, v/v) ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Sodium carbonate (7.0%, w/v) ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank และใช้สารละลาย Gallic acid (ความเข้มข้น 0.01 – 0.05 mg/mL) เป็นสารมาตรฐาน ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจะแสดงออกมาในรูป มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมตัวอย่าง (mg GAE/g sample)

2.7 การวิเคราะห์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging assay)

การวิเคราะห์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging assay) ดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Chen และคณะ [26] โดยการดูดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.02 M, pH 6.0) ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย DPPH (สารละลาย 2,2- diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical (DPPH) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ในเอทานอลร้อยละ 95 โดยปริมาตร) ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร และเติมตัวอย่างที่ผ่านการเจือจาง (เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณปริมาณการกำจัดอนุมูลอิสระ ตามสมการ

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

โดยที่ : $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรของ 0.2 mM DPPH

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ของ 0.2 mM DPPH ผสมกับตัวอย่าง

2.8 การวิเคราะห์ค่าความสามารถในการรีดิวซ์-เฟอร์ริก (Ferric Reducing Antioxidant Power; FRAP)

การวิเคราะห์ค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (Ferric Reducing Antioxidant Power; FRAP) ประยุกต์จาก Thamnarathip และคณะ [3] ทำโดยการดูดสารละลาย FRAP ปริมาณ 3,000 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจาง (1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank และใช้สารละลาย $FeSO_4.7H_2O$ (ความเข้มข้น 100 – 1400 µM) เป็นสารมาตรฐาน คำนวณผลที่ได้ให้แสดงออกมาในรูป มิลลิโมลาร์ Fe^{2+} ต่อกรัมตัวอย่าง (µM Fe^{2+}/g sample)

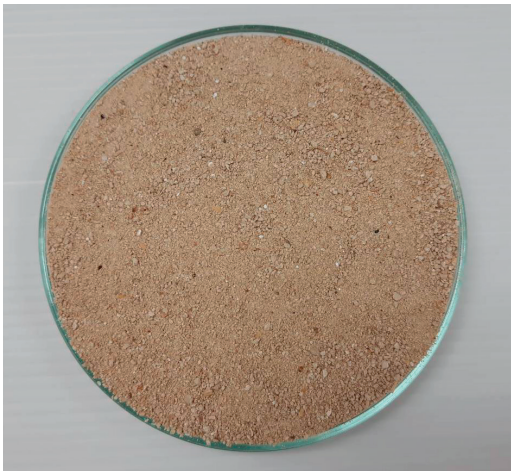
2.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มโดยสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ทำการทดลองจำนวน 3 ชุด (Replication) และวิเคราะห์การทดลอง 3 ซ้ำ ด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีทเมนท์โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DRMT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Statistic (Version 19.0)

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 องค์ประกอบเคมีของรำข้าว

รำข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ผ่านการสกัดน้ำมัน (Defatted rice bran) มีลักษณะปรากฏเป็นผงสีเหลืองอมน้ำตาล (รูปที่ 1) องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวที่นำมาใช้แสดงดังตารางที่ 1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวเบื้องต้นเพื่อประเมินคุณภาพ วิธีการจัดการวัตถุดิบสำหรับการวิเคราะห์ทดลองอันจะส่งผลถึงคุณภาพ ปริมาณของผลผลิตของผลิตภัณฑ์ อายุการเก็บของวัตถุดิบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณไขมันในรำข้าวที่มีผลต่ออายุการเก็บรักษาวัตถุดิบ รำข้าวที่มีปริมาณไขมันเป็นองค์ประกอบต่ำ ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดปฏิกิริยาลิพิดออกซิเดชั่น (Lipid Oxidation) อันมีผลทำให้เกิดกลิ่นหืนส่งผลเสียต่อคุณภาพวัตถุดิบและประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในการผลิตเพปไทด์ ผลการวิเคราะห์พบว่ารำข้าวมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 15 โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณรำข้าวที่มีการนำมาใช้ศึกษาการผลิตเพปไทด์ที่มีรายงานมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 11 – 19 [3, 13, 10, 17-20] ซึ่งถือว่ารำข้าวที่นำมาทดลองดังกล่าวมีปริมาณโปรตีนในระดับกลางที่เหมาะสมสำหรับการจะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการศึกษา ในขณะที่ปริมาณไขมันและกากใยในรำข้าวพบเพียงร้อยละ 0.6 – 0.8 และ 0.7 – 0.76 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ โดยปริมาณไขมัน (น้อยกว่าร้อยละ 1) และกากใย (น้อยกว่าร้อยละ 10) ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส [8]



รูปที่ 1 รำข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105ที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกแล้ว (Defatted rice bran)

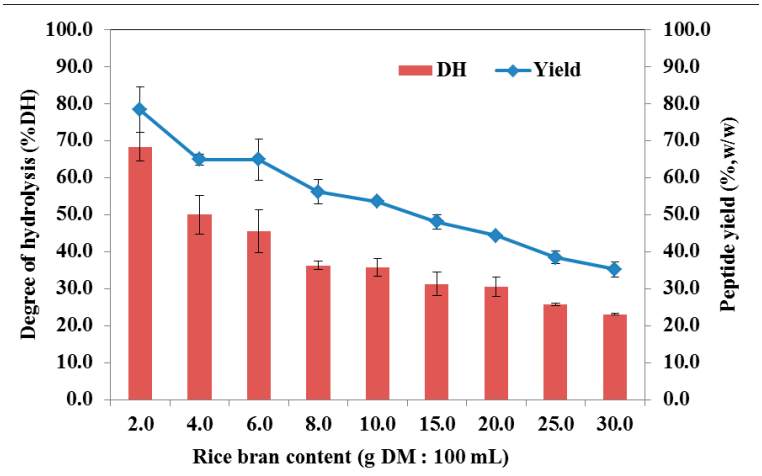
ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตเพปไทด์ไฮโดรไลเซท

วัตถุดิบ	องค์ประกอบทางเคมีร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง				อ้างอิง
	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	กากใย	
รำข้าว	14 - 15	0.6 – 0.8	9 – 10	0.71 – 0.76	งานวิจัยนี้
รำข้าว	11 – 19	2 - 20	7 - 11	-	[3,10,13,17-20]

หมายเหตุ ความชื้นฐานแห้งของรำข้าวที่นำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเท่ากับร้อยละ 9.12

3.2 ผลของปริมาณรำข้าวต่อระดับการย่อยโปรตีน ปริมาณผลผลิต และฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระของเพปไทด์ไฮโดรไลเซท

ปริมาณผลผลิตและระดับการย่อยโปรตีนของเพปไทด์-ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยรำข้าวปริมาณ 2.0 – 30.0 กรัมแห้งต่อ 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์อัลคาเลส แสดงดังรูปที่ 2 ระดับการย่อยโปรตีนที่ได้จากการทดลองที่ปริมาณรำข้าวแตกต่างกัน มีระดับการย่อยโปรตีนอยู่ในช่วงร้อยละ 30 - 70 ซึ่งค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ศึกษาการผลิตเพปไทด์จากแหล่งธัญพืชอื่นๆ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2 [5-6, 17] ทั้งนี้ระดับการย่อยโปรตีนที่ได้จากการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงสภาวะการผลิตที่อยู่ในระดับที่เหมาะสมซึ่งทำให้เอนไซม์สามารถทำงานและเข้าไปตัดพันธะเพปไทด์เป้าหมายได้ปริมาณมาก



รูปที่ 2 ปริมาณผลผลิตและระดับการย่อยโปรตีนของเพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยรำข้าวปริมาณ 2.0 – 30.0 กรัมแห้งต่อ 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

ตารางที่ 2 ระดับการย่อยโปรตีน ฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระของเพปไทด์ไฮโดรไลเซท

วัตถุดิบ	ชนิดเอนไซม์	ระดับการย่อยโปรตีน (%)	ความเข้มข้นของเพปไทด์	ฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ		อ้างอิง
				DPPH	FRAP	
รำข้าว	Alcalase	20.21	1.0 mg/mL	44.02%	159.72 μmol Fe^{2+}/g	**งานวิจัยนี้**
รำข้าว	Alcalase	7.5	-	-	-	[17]
รำข้าว	Flavourzyme	8.8	-	-	-	[17]
เมล็ดแฟลกซ์	Pancreatin	5.0 – 25.0	-	-	200 – 250 μmol Fe^{2+}/g	[5]
กากถั่วเหลือง	Alcalase	8.4 – 33.6	-	14.5 – 17.7%	223 – 685 μM Trolox	[6]

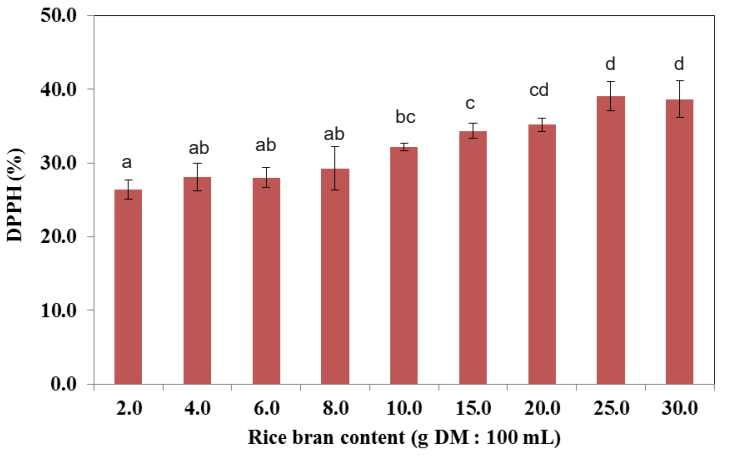
ตารางที่ 2 ระดับการย่อยโปรตีน ฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระของเพปไทด์ไฮโดรไลเซท (ต่อ)

วัตถุดิบ	ชนิดเอนไซม์	ระดับการย่อยโปรตีน (%)	ความเข้มข้นของเพปไทด์	ฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ		อ้างอิง
				DPPH	FRAP	
รำข้าวเจ้าหอมนิล	Alcalase	-	1.0 mg/mL	28 – 29%	-	[38]
ถั่วชิกพี	Alcalase	14.67	1.0 mg/mL	45%	-	[39]
ถั่วลิสง	Alcalase	-	1.0 mg/mL	15%	-	[26]
รำข้าวดอกมะลิ 105	Alcalase	-	2.0 mg/mL	4 – 5%	-	[38]
รำข้าวเจ้าหอมนิล	Alcalase	-	2.0 mg/mL	49 – 50%	-	[38]
ถั่วชิกพี	Alcalase	14.67	2.0 mg/mL	60%	-	[39]
รำข้าว	Alcalase	17 – 20	-	3.9 – 4.0%	-	[13]
รำข้าว	Alcalase	12.5	-	-	152 mM Fe^{2+}/g	[3]
รำข้าว	Crude enzyme from Tilapia	5 – 6	-	12 g Trolox/g	-	[11]

อย่างไรก็ดี การวิเคราะห์ผลของปริมาณรำข้าวต่อระดับการย่อยโปรตีน ปริมาณผลผลิต และฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระของเพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่ได้ พบว่าปริมาณรำข้าวที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ระดับการย่อยโปรตีน (Degree of hydrolysis) และปริมาณผลผลิตเพปไทด์ (peptide yield) ของเพปไทด์-ไฮโดรไลเซสที่ได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยเมื่อปริมาณรำข้าวเพิ่มขึ้นจาก 2.0 กรัมแห้งต่อ 100 มิลลิลิตร เป็น 30.0 กรัมแห้งต่อ 100 มิลลิลิตร จะทำให้มีระดับการย่อยโปรตีนและผลผลิตลดลงจากร้อยละ 68.32 และ 78.31 โดยน้ำหนักแห้ง ลดลงเหลือร้อยละ 23.09 และ 35.21 โดยน้ำหนักแห้งตามลำดับ คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Aziz และคณะ [27] ซึ่งพบว่าการเพิ่มปริมาณสารตั้งต้น (Substrate) เจลาตินจากปลานิล (Fish gelatin) และเจลาตินจากวัว (Bovine gelatin) จากร้อยละ 5 เป็นร้อยละ 25 ในการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสปริมาณร้อยละ 0.25 - 2.5 ที่พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที จะทำให้มีระดับการย่อยโปรตีนลดลง ทั้งนี้อาจเกิดจากการยับยั้งจากวัตถุดิบหรือตัวยับยั้งที่ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถผันกลับได้ (Irreversible protease inhibitor) ที่มีอยู่ในวัตถุดิบ [27] นอกจากนี้อาจเกิดจากเมื่อปริมาณรำข้าวสูงขึ้นมีความหนืดในระบบเพิ่มขึ้น การถ่ายเทความร้อน การเคลื่อนที่ของเอนไซม์ไปสู่พันธะเป้าหมายอาจทำได้ยากขึ้น มีผลทำให้ย่อยโปรตีนได้น้อยลง อีกทั้งอาจเกิดจากเพปไทด์ไฮโดรไลเซท (ผลิตภัณฑ์) ที่เกิดขึ้น เข้าไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ (Feedback inhibition) [8]

การทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระของเพปไทด์ที่ผลิตได้ให้ผลแปรผกผันกับระดับการย่อยของโปรตีนเมื่อปริมาณรำข้าวเพิ่มขึ้น (รูปที่ 3) เพปไทด์ที่ผลิตได้จากรำข้าว 2.0 กรัมแห้งต่อ 100 มิลลิลิตร มีระดับการย่อยโปรตีนร้อยละ 68.32

จะให้เพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH จากร้อยละ 26.36 เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 38.66 เมื่อปริมาณรำข้าวเพิ่มเป็น 30.0 กรัมแห้งต่อ 100 มิลลิลิตร แต่ระดับการย่อยโปรตีนลดลงเหลือร้อยละ 23.09 ทั้งนี้อาจเกิดจากเป็นเพปไทด์ที่ได้จากระดับการย่อยโปรตีนต่ำมีสัดส่วนของเพปไทด์หรือกรดอะมิโนที่เป็น hydrophobic สูงกว่าเพปไทด์ที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูง ทำให้เพปไทด์สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้มากกว่า [28] ในขณะที่ระดับการย่อยโปรตีนสูงจะทำให้มีสัดส่วนของเพปไทด์หรือกรดอะมิโนที่เป็น hydrophillic เพิ่มขึ้นส่งผลให้กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้น้อยลง [29] ความเป็นขั้วของเพปไทด์จะลดปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนกับอนุมูลอิสระ DPPH [30] นอกจากนี้เพปไทด์ที่ได้จากระดับการย่อยโปรตีนที่สูงอาจพบกรดอะมิโนอิสระในปริมาณมากขึ้นทำให้มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระน้อยลง ซึ่ง Thongimpong และคณะ [8] รายงานว่ากรดอะมิโนอิสระให้ฤทธิ์ทางชีวภาพน้อยกว่าเพปไทด์ เพปไทด์ที่มีระดับการย่อยโปรตีนต่ำมีความสามารถในการให้ H^+ กับอนุมูลอิสระได้ดีกว่าเพปไทด์ที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูง [11] ระดับการย่อยที่สูงอาจจะทำลายโครงสร้างที่มีความว่องไว (active site) ของเพปไทด์ที่ผลิตได้ [3, 31]

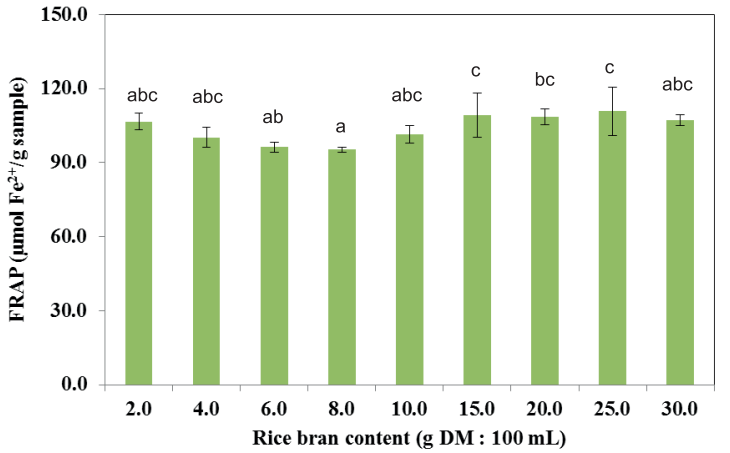


รูปที่ 3 ฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของเพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยรำข้าวปริมาณ 2.0 – 30.0 กรัมแห้งต่อ 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

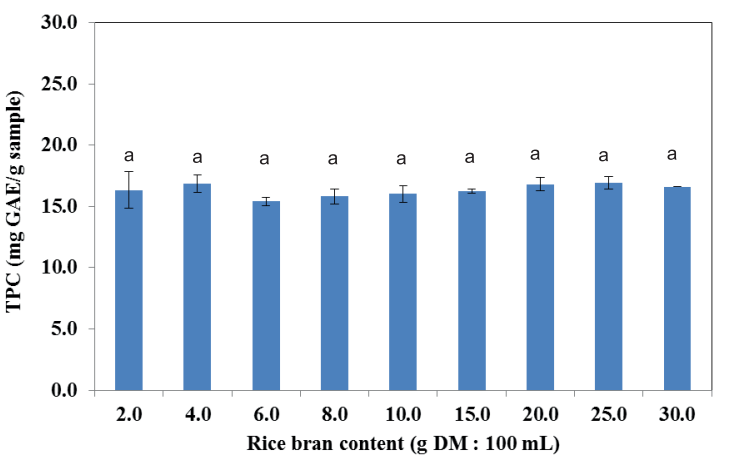
ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (FRAP) และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของเพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของรำข้าวเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) (รูปที่ 4) ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (FRAP) มีแนวโน้มการลดลงคล้ายคลึงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในผลิตภัณฑ์ที่ได้แสดงดังรูปที่ 4 และ 5 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความสามารถในการริดิวส์เฟอร์ริก (FRAP) ของเพปไทด์ขึ้นอยู่กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (TPC) ในผลิตภัณฑ์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wanyo และคณะ [32] ซึ่งพบว่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (FRAP) จะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้น โดยสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ [20] มีรายงานการพบสารประกอบฟีนอลิกในรำข้าวหลายกลุ่มดังนี้ Gallic acid, Protocatechuic acid, p-Hydroxybenzoic acid, Vanillic acid, Chlorogenic acid, Syringic acid, Ferulic acid, and Sinapic acid [20, 33-34]

จากการศึกษาผลของปริมาณรำข้าวต่อระดับการย่อยโปรตีน ปริมาณผลผลิต และฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระของเพปไทด์ไฮโดรไลเซทข้างต้น สามารถสรุปได้ว่าปริมาณรำข้าวมีผลต่อระดับการย่อยโปรตีน ผลผลิต และฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระของเพปไทด์ไฮโดรไลเซท การใช้รำข้าวปริมาณต่ำมีผลทำให้ได้เพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่มีระดับการย่อย

โปรตีนและผลผลิตสูง แต่เพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่ได้มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระต่ำ ส่วนการใช้รำข้าวปริมาณสูงมีผลทำให้ได้เพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่มีระดับการย่อยโปรตีนและผลผลิตต่ำ แต่เพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่ได้มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระสูง อย่างไรก็ดีปริมาณรำข้าวที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองนี้คือ รำข้าว 20.0 กรัมแห้งต่อ 100 มิลลิลิตร เนื่องจากให้เพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่มีผลผลิตและฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระในระดับที่เหมาะสม



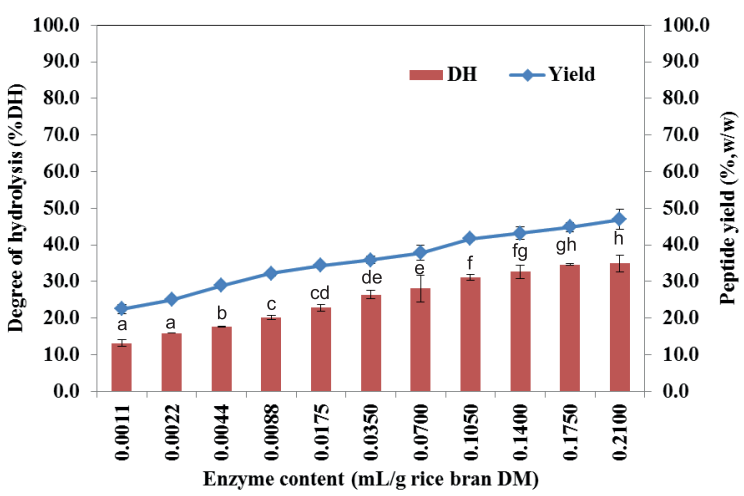
รูปที่ 4 ค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (FRAP) ของเพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยรำข้าวปริมาณ 2.0 – 30.0 กรัมแห้งต่อ 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์อัลคาเลส



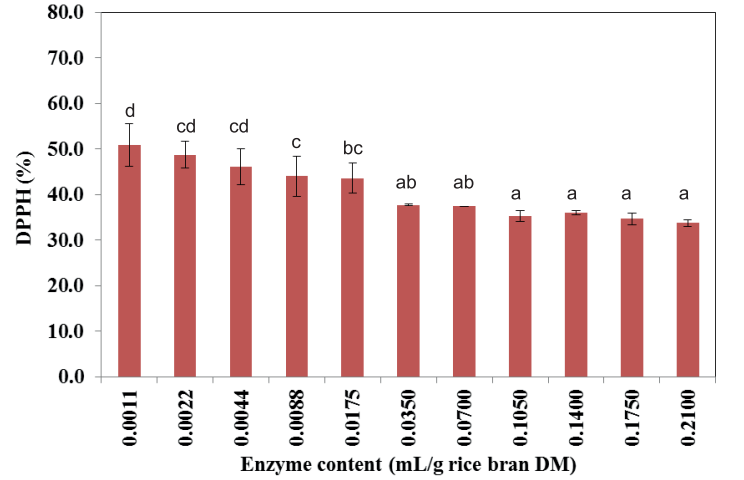
รูปที่ 5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content, TPC) ของเพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยรำข้าวปริมาณ 2.0 – 30.0 กรัมแห้งต่อ 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

3.3 ผลของปริมาณเอนไซม์ต่อระดับการย่อยโปรตีน ผลผลิต และฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระของเพปไทด์ไฮโดรไลเซท

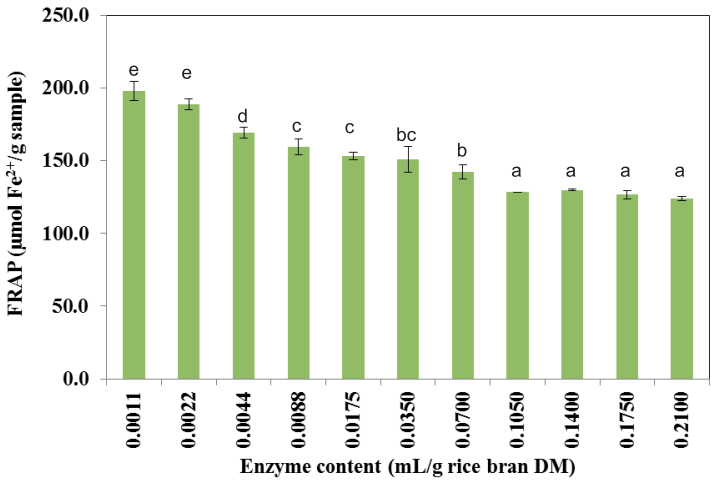
ปริมาณผลผลิตและระดับการย่อยโปรตีนของเพปไทด์-ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยรำข้าวโดยการศึกษาเอนไซม์-อัลคาเลสในช่วง 0.0011- 0.2100 มิลลิลิตรต่อกรัมรำข้าวแห้ง แสดงดังรูปที่ 6 ปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำให้ระดับการย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้นจากระดับการย่อยโปรตีนร้อยละ 13.14 และเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 34.95 และปริมาณผลผลิตเพปไทด์เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 22.45 เป็น 46.95 โดยน้ำหนักแห้งตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chaijaroen [11], Charoen และคณะ [13] Baharuddin และคณะ [14] Bumrungsart และ Duangmal [15], และ Aziz และคณะ [27] ในขณะที่ฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และความสามารถในการรีดิวส์เฟอร์ริก (FRAP) ของเพปไทด์ที่ผลิตได้ให้ผลในทางตรงกันข้ามโดยมีแนวโน้มลดลงดังแสดงในรูปที่ 7 และ 8



รูปที่ 6 ปริมาณผลผลิตและระดับการย่อยโปรตีนของเพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยรำข้าวด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 0.0011 – 0.210 มิลลิลิตรต่อกรัมรำข้าวแห้ง



รูปที่ 7 ฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของเพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยรำข้าวด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 0.0011 – 0.210 มิลลิลิตรต่อกรัมรำข้าวแห้ง



รูปที่ 8 ค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (FRAP) ของเพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยรำข้าวด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 0.0011 – 0.210 มิลลิลิตรต่อกรัมรำข้าวแห้ง

การใช้เอนไซม์ปริมาณ 0.0011 มิลลิลิตรต่อกรัมรำข้าวแห้งจะให้เพปไทด์ที่มีระดับการย่อยโปรตีนร้อยละ 13.14 ซึ่งมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 49.91 และความสามารถในการรีดิวส์เฟอร์ริก (FRAP) 198.04 µmol Fe^{2+}/g sample จะลดลงเหลือร้อยละ 33.71 และ 123.92 µmol Fe^{2+}/g sample ตามลำดับ ที่ปริมาณการใช้เอนไซม์ 0.2100 มิลลิลิตรต่อกรัมรำข้าวแห้ง ซึ่งมีระดับการย่อยโปรตีนร้อยละ 34.95 ผลการทดลองนี้คล้ายคลึงกับผลการศึกษาของ Klompong และคณะ [35] Ismail และ Hasni [36] และ Chaijaroen [11] ซึ่งรายงานว่าระดับการย่อยโปรตีนจากรำข้าวที่เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 4-5 เป็นร้อยละ 8-13 ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ลดลงจาก 10-11 Trolox/g เหลือ 7 – 8 g Trolox/ g ตามลำดับ [11] เพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูงมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระต่ำกว่าเพปไทด์ที่มีระดับการย่อยโปรตีนต่ำ โดยพบว่าเพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยรำข้าวด้วยเอนไซม์-อัลคาเลส มีระดับการย่อยโปรตีนร้อยละ 20.05 สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ต่ำกว่าเพปไทด์ที่มีระดับการย่อยโปรตีนร้อยละ 17.89 คล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Thongimpong และคณะ [8] พบว่าเพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยกากทานตะวันด้วยเอนไซม์ Flavourzyme ที่มีระดับการย่อยโปรตีนร้อยละ 57 สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ต่ำกว่าเพปไทด์-ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยกากทานตะวันด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (Bromelain) ที่มีระดับการย่อยโปรตีนร้อยละ 42 เพปไทด์-ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยรำข้าวด้วยเอนไซม์ที่สกัดได้จากปลานิลปริมาณ 1-3% จะมีระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้น แต่จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ลดลง [11] และเพปไทด์ที่ระดับการย่อยโปรตีนต่ำสุดจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงที่สุด [11] เช่นเดียวกับงานวิจัยของของ Ismail และ Hasni [36] พบว่าเพปไทด์-ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยหอยแมงภู่ (Green mussel) ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับการย่อยโปรตีนต่ำสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูงกว่าเพปไทด์ที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูง ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระที่ลดลงนั้นสาเหตุเกิดจากการเพปไทด์ไฮโดรไลเซทสูงถูกย่อยเป็นโมเลกุลขนาดเล็กมากจนทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระน้อยลง เพปไทด์-ไฮโดรไลเซทที่มีระดับการย่อยโปรตีนต่ำกว่าจะมีความสามารถในการให้ H^+ กับอนุมูลอิสระได้ดีกว่าเพปไทด์ที่มีระดับการย่อยโปรตีนที่สูงกว่า [11] อย่างไรก็ดีมีงานวิจัยหลายชิ้น [5-6, 37] รายงานว่าระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้นจะทำให้เพปไทด์ไฮโดร-ไลเซทที่ได้มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงขึ้นเมื่อระดับการย่อยโปรตีนต่ำกว่าร้อยละ 20 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ FRAP

และการสร้างพันธะกับ Fe(II) จะลดลงเมื่อระดับการย่อยโปรตีนสูงกว่าร้อยละ 20 [5] และระดับการย่อยโปรตีนที่สูงกว่าร้อยละ 85 เพปไทด์จะถูกย่อยเป็นกรดอะมิโนและมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระลดลง [11] ในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีแนวโน้มลดลงเมื่อปริมาณสัดส่วนของเอนไซม์เพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นจะเกิดการย่อยได้สมบูรณ์ขึ้นทำให้มีสัดส่วนของสารประกอบฟีนอลิกลดลงเมื่อเทียบกับปริมาณเพปไทด์ทั้งหมด

ผลของปริมาณเอนไซม์ต่อระดับการย่อยโปรตีน ผลผลิตและฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระของเพปไทด์ไฮโดรไลเซท พบว่าการใช้เอนไซม์ปริมาณต่ำจะทำให้ได้เพปไทด์ไฮโดรไลเซทมีระดับการย่อยโปรตีนและผลผลิตต่ำ แต่เพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่ได้มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระสูง ในขณะที่การใช้เอนไซม์ปริมาณสูงจะทำให้ได้เพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่มีระดับการย่อยโปรตีนและปริมาณผลผลิตสูง แต่เพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่ได้มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระต่ำ โดยการศึกษาปริมาณการใช้เอนไซม์อัลคาเลสช่วง 0.0011 – 0.2100 มิลลิลิตรต่อกรัมรำข้าวแห้ง ปริมาณเอนไซม์ที่ 0.00875 มิลลิลิตรต่อกรัมรำข้าวแห้งให้ปริมาณผลผลิตเพปไทด์ไฮโดรไลเซทสูงและเพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่ได้มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระสูง

การศึกษาผลของปริมาณวัตถุดิบรำข้าวและเอนไซม์อัลคาเลสในการวิจัยนี้ ปริมาณรำข้าวและเอนไซม์ที่เหมาะสมคือ 20.0 กรัมแห้งต่อ 100 มิลลิลิตร และ 0.00875 มิลลิลิตรต่อกรัมรำข้าวแห้ง ตามลำดับ โดยภายใต้สภาวะนี้จะให้เพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่มีระดับการย่อยโปรตีนและผลผลิตร้อยละ 20.21 ± 0.54 และ 32.19 ± 0.70 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เพปไทด์ไฮโดรไลเซทมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และ FRAP ร้อยละ 44.02 ± 5.88 และ 159.72 ± 5.56 ไมโครโมล Fe^{2+} ต่อ กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่วิเคราะห์ได้ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นถึงความเหมาะสมของปัจจัยการผลิตในด้านปริมาณสัดส่วนวัตถุดิบเอนไซม์ตลอดจนสภาวะการผลิตที่ใช้ในการผลิตเพปไทด์ไฮโดรไลเซท

4. สรุปผลการทดลอง

การควบคุมสภาวะการผลิตให้เหมาะสมเพื่อให้ได้เพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงและผลผลิตเพปไทด์ไฮโดรไลเซทที่คุ้มค่าต่อการผลิตเป็นสิ่งสำคัญที่ผู้ผลิตควรตระหนัก จากการศึกษาปริมาณรำข้าวและเอนไซม์อัลคาเลสที่ได้จากการทดลองนี้ สามารถสรุปได้ว่าปริมาณรำข้าวและเอนไซม์อัลคาเลสที่เหมาะสมคือ 20.0 กรัมแห้งต่อ 100 มิลลิลิตร และ 0.00875 มิลลิลิตรต่อกรัมรำข้าวแห้ง ตามลำดับ ซึ่งสามารถผลิตเพปไทด์-ไฮโดรไลเซทที่มีปริมาณผลผลิตและมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระที่สูงและมีประสิทธิภาพเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการผลิตเพปไทด์ไฮโดรไลเซทเพื่อใช้เป็นส่วนผสมในอาหารฟังก์ชั่น

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบริษัท โคราชโรงสียงสงวน จำกัด ที่ให้การสนับสนุนรำข้าวเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในงานวิจัยครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง

1. Yimit, D., Hoxur, P., Amat, N., Uchikawa, K. and Yamaguchi, N., 2012, “Effects of Soybean Peptide on Immune Function, Brain Function, and Neurochemistry in Healthy Volunteers,” *Nutrition*, 28 (2), pp. 154-159.

2. Wang, X., Chen, H., Fu, X., Li, S. and Wei, J., 2017, “A Novel Antioxidant and ACE Inhibitory Peptide from Rice Bran Protein: Biochemical Characterization and Molecular Docking Study,” *LWT - Food Science and Technology*, 75, pp. 93-99.

3. Thamnarathip, P., Jangchud, K., Nitisinprasert, S. and Vardhanabhuti, B., 2016, “Identification of Peptide Molecular Weight from Rice Bran Protein Hydrolysate with High Antioxidant Activity,” *Journal of Cereal Science*, 69, pp. 329-335.

4. Kannan, A., Hettiarachchy, N. and Narayan, S., 2009, “Colon and Breast Anti-cancer Effects of Peptide Hydrolysates Derived from Rice Bran,” *The Open Bioactive Compounds Journal*, 2, pp. 17-20.

5. Karamac, M., Kulczyk, A. and Sulewska, K., 2014, “Antioxidant Activity of Hydrolysates Prepared from Flaxseed Cake Proteins using Pancreatin,” *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, 64 (4),

pp. 227–233.

6. Sbroggio, W.F., Montilha, M.S., Garcia de Figueiredo, V.R., Georgetti, S.R. and Kurozawa, L.E., 2016, "Influence of the Degree of Hydrolysis and Type of Enzyme on Antioxidant Activity of Okara Protein Hydrolysates," *Food Science and Technology (Campinas)*, 36 (2), pp. 375-381.

7. Zhang, C., Zhang, N., Li, Z., Tian, Y., Zhang, L. and Zhang, B., 2016, "Stability of Antioxidant Peptides Prepared from Large Yellow Croaker (*Pseudosciaena crocea*)," *Current Topics in Nutraceutical Research*, 14 (1), pp. 37-48.

8. Thongimpong, P., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., Pinitglang, S. and Thumthanaruk, B., 2015, "Antioxidant and Functional Properties of Extracted Sunflower Proteins by Bromelain and Flavourzyme®," *KMUTT Research and Development Journal*, 39 (4), pp. 565 – 583. (In Thai)

9. Li, X., Xiong, H., Yang, K., Peng, D., Peng, H. and Zhao., 2012, "Optimization of the Biological Processing of Rice Dregs into Nutritional Peptides with the Aid of Trypsin," *Journal Food Science Technology*, 49 (5), pp. 537–546.

10. Ahmadifard, N., Murueta, J.H.C., Abedian-Kenari, A., Motamedzadegan, A. and Jamali, H., 2016, "Comparison the Effect of Three Commercial Enzymes for Enzymatic Hydrolysis of Two Substrates (Rice Bran Protein Concentrate and Soy-been Protein) with SDS-PAGE," *Journal Food Science Technology*, 53 (2), pp. 1279-1284.

11. Chaijaroen, T., 2015, Functional and Biological Properties of Enzymatic Hydrolysate from Defatted Rice Bran by Using Partial Purified Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Viscera Extract, Doctoral of Philosophy Thesis, Functional Food and Nutrition Program, Prince of Songkla University.

12. Li, X., Shen, S., Deng, J., Li, T. and Ding, C., 2014, "Antioxidant Activities and Functional Properties of Tea Seed Protein Hydrolysate (*Camellia oleifera Abel*.) Influenced by the Degree of Enzymatic Hydrolysis," *Food Science and Biotechnology*, 23, pp. 2075-2082.

13. Charoen, R., Tipkanon, S. and Savebowon, W., 2017, "Production of Rice Bran Protein Hydrolysates from Traditional Thai Rice Bran (Plai-Ngahm-Prachinburi)," *International Food Research Journal*, 24 (6), pp. 2304-2311.

14. Baharuddin, N.A., Halim, N.R.A. and Sarbon, N.M., 2016, "Effect of Degree of Hydrolysis (DH) on the Functional Properties and Angiotensin I-converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity of Eel (*Monopterus* sp.) Protein Hydrolysate," *International Food Research Journal*, 23 (4), pp. 1424-1431.

15. Bumrungsart, N. and Duangmal, K., 2019, "Optimization of Enzymatic Hydrolysis Condition for Producing Black Gram Bean (*Vigna mungo*) Hydrolysate with High Antioxidant Activity," *Food and Applied Bioscience Journal*, 7, pp. 105–117.

16. Mahdavi-Yekta, M., Nouri, L. and Azizi, M.H., 2019, "The Effects of Hydrolysis Condition on Antioxidant Activity of Protein Hydrolyzate from Quinoa," *Food Science and Nutrition*, pp. 930-936.

17. Hamada, J.S., 2000, "Characterization and Functional Properties of Rice Bran Proteins Modified by Commercial Exoproteases and Endoproteases," *Journal of Food Science,* 65 (2), pp. 305–310.

18. Timachai, S. and Thawornchinsombut, S., 2011, "Effect of Proteases on Bioactive Properties of Rice Bran Protein Hydrolysates," *The 12th Khon Kaen University 2011 Graduate Research Conference*, BM02, pp. 507-517. (In Thai)

19. Phongthai, S., Homthawornchoo, W. and Rawdkuen, S., 2017, "Preparation, Properties and Application of Rice Bran Protein: A Review," *Inter-*

national Food Research Journal, 24 (1), pp. 25-34.

20. Zaky, A.A., Chen, Z., Qin, M., Wang, M. and Jia, Y., 2020, "Assessment of Antioxidant Activity, Amino Acids, Phenolic Acid and Functional Attributes in Defatted Rice Bran and Rice Bran Protein Concentrate," *Progress in Nutrition*, 22 (4), pp. 1-9.

21. Phantuwong, N., 2017, Functional and Biological Properties of Sang Yod Rice Bran Hydrolysate Prepared by Enzymatic Hydrolysis and Its Application in Rice Pudding Product, Doctor of Philosophy Thesis, Functional Food and Nutrition Program, Prince of Songkla University.

22. Phusrisom, S., Senggunprai, L., Prawan, A., Kongpetch, S. Kukongviriyapan, U., Thawornchinsombut, S., Changsri, R. and Kukongviriyapan, V., 2020, "Rice Bran Hydrolysates Induce Immunomodulatory Effects by Suppression of Chemotaxis, and Modulation of Cytokine Release and Cell-mediated Cytotoxicity," *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 10 (10), pp. 470-478.

23. Xu, Z., Mao, T., Huang, L., Yu, Z., Yin, B., Chen, M. and Cheng, Y., 2019, "Purification and Identification Immunomodulatory Peptide from Rice Protein Hydrolysates," *Food and Agricultural Immunology*, 30 (1), pp. 150-162.

24. AOAC, 2000, Official Methods of Analysis, 17th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.

25. Benjakul, S. and Morrissey, M.T., 1997, "Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid Wastes," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, pp. 3423-3430.

26. Chen, G., Zhao, L., Zhao, L., Cong, T. and Bao, S., 2007, "In Vitro Study on Antioxidant Activities of Peanut Protein Hydrolysate," *Journal of Science of Food Agriculture*, 87, pp. 357–362.

27. Aziz, A.G.K.A., Mohammad, A.W., Suhimi, A.M. and Jahim, J.M., 2014, "Influence of Substrate and Enzyme Concentration towards Degree of Hydrolysis for Gelatin," *Journal of Applied Science*, 14 (12), pp. 1347-1350.

28. Kim, J.H., Jang, H.J., Cho, W.Y., Yeon, S.J. and Lee, C.H., 2020, "In Vitro Antioxidant Actions of Sulfur-containing Amino Acids," *Arabian Journal of Chemistry*, 13, pp. 1678-1684.

29. Shahi, Z., Sayyed-Alangi S.Z. and Najafian, L., 2020, "Effects of Enzyme Type and Process Time on Hydrolysis Degree, Electrophoresis Bands and Antioxidant Properties of Hydrolyzed Proteins Derived from Defatted Bunium Persicum Bioss. Press Cake," *Heliyon*, 6 (2).

30. Zhao, X.H., Wu, D. and Li, T.J., 2010, "Preparation and Radical Scavenging Activity of Papain-catalyzed Casein Plasteins," *Dairy Science and Technology*, 90, pp. 521-535.

31. Li, X., Shen, S., Deng, J., Li, T. and Ding, C., 2014, "Antioxidant Activities and Functional Properties of Tea Seed Protein Hydrolysates (Camellia oleifera Abel.) Influenced by the Degree of Enzymatic Hydrolysis," *Food Science and Biotechnology*, 23, pp. 2075 - 2082.

32. Wnayo, P., Schoenlechner, R., Meeso, N. and Siriamornpun, S., 2014, "Antioxidant Activities and Sensory Properties of Rice Bran with Marigold Tea," *Food and Applied Bioscience Journal*, 2 (1), pp. 1-14

33. Wanyo, P., Meeso, N. and Siriamornpun, S., 2014, "Effects of Different Treatments on the Antioxidant Properties and Phenolic Compounds of Rice Bran and Rice Husk," *Food Chemistry*, 157, pp. 457-463.

34. Peanparkdee, M., Patrawart, J. and Iwamoto, S., 2019, "Effect of Extraction Conditions on Phenolic Content, Anthocyanin Content and Antioxidant Activity of Bran Extracts from Thai Rice Cultivars," *Journal*

of Cereal Science, 86, pp. 6-91.

35. Klompong, V., Benjakul, S., Yachai, M., Visessanguam, W., Shahidi, F. and Hayes, K., 2009, "Amino Acid Composition and Antioxidative Peptides from Protein Hydrolysate of Yellow Stripe Trevally (*Selaroides leptolepis*)," *Journal of Food Science*, 74 (2), pp. 126-133.

36. Ismail, N. and Hasni, F., 2014, "Antioxidant Activity and Solubility of Green Mussel (*Perna viridis*) Hydrplysate as Influenced by Degree of Hydrolysis," *Jurnal Intelek*, 8 (2), pp. 13- 19.

37. Uraipong, C., 2016, Investigation into the Biological Functions of Rice Bran Protein Hydrolysates, Doctor of Philosophy Thesis, Faculty of Engineering, The University of New South Wales.

38. Boonyasri, N., Thirabunyanon, M., Kongjaroon, C. and Deangprok, W., 2016, "Antioxidant Activities and Total Polyphenol Contents of Methanol Extract Protein Isolates and Peptide Derived from Khao Dawk Mali 105 and Jao Hom Nin Rice Brans," *Journal of Agricultural Research and Extension*, 32 (2), pp. 12-22. (In Thai)

39. Ghribi, A.M., Sila, M., Przybylski, R., Nedjar-Arroume, N., Makhlouf, I., Blecker, C., Attia, H., Dhulster, P., Bougatef, A. and Besbes, S., 2015, "Purification and Identification of Novel Antioxidant Peptides from Enzymatic Hydrolysate of Chickpea (Cicer arietinum L.) Protein Concentrate," *Journal of Functional Foods*, 12, pp. 516-525.