

การลดกิจกรรมการเกิดสีน้ำตาลในสารสกัดรำข้าว ที่สกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤติต่อการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส Browning Reduction of Rice Bran Extract Produced by Subcritical Water Extraction Followed by Protease Hydrolysis

สุพัตรา สุภาวงศ์*

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

ศุภวรรณ ถาวรชินสมบัติ

สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

Supattra Supawong*

Department of Food Science and Technology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Supawan Thawornchinsombut

Department of Food Technology, Faculty of Technology, Khon Kaen University,
Nai Muang, Muang, Khon Kaen 40002

Received: August 5, 2019; Accepted: September 11, 2019

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการลดกิจกรรมการเกิดสีน้ำตาลในสารสกัดรำข้าวที่สกัดภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤติ (subcritical water, SW) ต่อด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส (protease hydrolysis, PH) โดยใช้เอนไซม์ที่ย่อยแป้งและน้ำตาลทางการค้า (Ultraflow® Max, SAN Super 360L, GC 147) และสารลดการเกิดสีน้ำตาล (กรดซิตริกและโซเดียมเมแทไบซัลไฟต์) การศึกษาผลของการใช้เอนไซม์ทางการค้าย่อยแป้งและน้ำตาลก่อนการสกัดด้วย SW + PH เพื่อกำจัดสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด พบว่าการย่อยกากรำข้าวด้วยเอนไซม์ทางการค้า Ultraflow® Max ตามด้วย GC 147 สามารถลดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในกากรำข้าวสูงสุดและสูญเสียปริมาณโปรตีนในกากรำข้าวน้อยที่สุด การแช่กากรำข้าวทั้งในสารละลายกรดซิตริก (0.5 % w/v) และโซเดียมเมแทไบซัลไฟต์ (0.0007 % w/v) สามารถลดความเข้มของสีน้ำตาลในสารสกัดภายใต้สภาวะ SW + PH สารสกัดรำข้าวที่ได้จากการสกัดด้วย SW + PH มีปริมาณโปรตีน กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณการเกิดสีน้ำตาลสูงกว่าสารสกัดรำข้าวที่ได้จากการสกัดด้วย SW เพียงอย่างเดียว วิธี

ที่เหมาะสมที่เลือกมาใช้ในการลดการเกิดสีน้ำตาลในสารสกัดรำข้าว คือ การแช่กากรำข้าวในสารละลายกรดซิตริกก่อนการสกัดภายใต้สภาวะ SW + PH ภายใต้สภาวะดังกล่าวซึ่งได้ปริมาณผลผลิต (% yield) ผงรำข้าวสกัด 46.8 % w/w ผงรำข้าวที่สกัดได้มีปริมาณโปรตีน 26.8 % ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม 29.4 มิลลิกรัมกรดแกลลิก/กรัมสารสกัดรำข้าวผง ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS 14.1 มิลลิกรัม Trolox/กรัมสารสกัดรำข้าวผง และค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP 8.4 มิลลิกรัม FeSO₄/กรัมสารสกัดรำข้าวผง งานวิจัยนี้เป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มที่ต้องการประยุกต์ใช้สารสกัดรำข้าวในอาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ ผลิตภัณฑ์เจลปลาทอด ขนมขบเคี้ยว น้ำผลไม้ ที่ไม่ต้องการให้มีสีน้ำตาล

คำสำคัญ : รำข้าว; การลดสีน้ำตาล; สารลดการเกิดสีน้ำตาล; เอนไซม์ไฮโดรไลซ์; กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

The objective of this research was to study browning reduction treatments of rice bran extract (RBE) produced by subcritical water extraction (SW) followed by protease hydrolysis (PH), using commercial enzymes (Ultraflow[®] Max, SAN Super 360L, GC 147) and anti-browning agent (citric acid and sodium metabisulfite). The use of commercial enzymes to digest starch and sugar to eliminate the precursors in Maillard reaction before SW+ PH showed that Ultraflow[®] Max followed by GC 147 hydrolysis resulted in the highest reduction of reducing sugar content and the lowest loss of protein content. The immersion of rice bran in both citric acid solution (0.5% w/v) and sodium metabisulfite (0.0007% w/v) reduced browning intensity of the extracts under SW+ PH. The RBE obtained after SW+ PH exhibited much greater protein content, antioxidant activities, as well as browning intensity, than those from individually SW. The suitable selected condition for obtaining the lower browning intensity was soaking rice bran in citric acid before SW+ PE. Under this condition, the yield, protein content, total phenolic content, ABTS activity and FRAP of RBE powder were 46.8 %w/w, 26.8%, 29.4 mg gallic acid/g RBE powder, 14.1 mg Trolox/g RBE powder, and 8.4 mg FeSO₄/g RBE powder, respectively. This research is beneficial to food and beverage industries, those applying RBE in foods that do not require brown color, such as bakery products, fried fish cake, snack, and juice.

Keywords: rice bran; browning reduction; anti-browning agent; hydrolytic enzyme; antioxidant activity

1. คำนำ

ข้าว (*Oryza Sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญที่สุดของประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2561 ประเทศไทยมีผลผลิตข้าวรวม 32.1 ล้านตัน การส่งออกข้าวของปี พ.ศ. 2561 มีประมาณ 11.1 ล้าน

ตัน มูลค่า 180,270 ล้านบาท (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2562) กระบวนการสีข้าวจะให้เศษเหลือที่สำคัญ คือ รำข้าว รำข้าวส่วนใหญ่จะนำไปสกัดน้ำมัน และน้ำมันที่ได้มีคุณภาพและคุณค่าทางอาหารสูง สามารถใช้ประกอบอาหารหรือเป็น

ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในรูปแบบซูลน้ำมันรำข้าว ซึ่งประเทศไทยมีปริมาณการผลิตน้ำมันรำข้าวดิบในปี พ.ศ. 2561 สูงถึง 130,691 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม, 2562) คิดเป็นกากรำข้าวที่เป็นเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมัน 522,760 ตัน ขณะที่กากรำข้าวที่ผ่านการสกัดน้ำมันแล้วจะขายไปเป็นอาหารสัตว์ที่มีราคาถูก ทั้งที่กากรำข้าวยังคงคุณค่าทางโภชนาการค่อนข้างสูง คือ มีปริมาณโปรตีนสูงกว่า 20 % การเพิ่มมูลค่าของกากรำข้าวโดยการนำมาสกัดโปรตีน สารสกัดรำข้าว และการผลิตเป็นรำข้าวไฮโดรไลเสทเพื่อใช้เป็นอาหารมนุษย์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ผลการศึกษาของ Sharma และคณะ (2011) พบว่ารำข้าวไฮโดรไลเสทที่ผลิตจากกากรำข้าวผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งของโปรตีนที่ดีและมีฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ทั้งฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในหลอดทดลอง ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และฤทธิ์ต้านการเกิดลิ่มเลือดในหลอดเลือด

ผลงานวิจัยที่ผ่านมา (Supawong *et al.*, 2018) ได้ผลิตรำข้าวไฮโดรไลเสทจากกากรำข้าวของโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำมันรำข้าว โดยการใช้ น้ำกึ่งวิกฤต (subcritical water) ร่วมกับการใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีน วิเคราะห์สมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของรำข้าวไฮโดรไลเสทที่ผลิตได้ พบว่ารำข้าวไฮโดรไลเสทให้ปริมาณโปรตีนและปริมาณสารประกอบฟีนอลที่เก็บเกี่ยวได้สูง และมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี นอกจากนี้การวิจัยเพื่อการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร พบว่าการเติมรำข้าวไฮโดรไลเสทผงร้อยละ 2 ลงในผลิตภัณฑ์เนื้อปลาทอดขึ้นรูปแช่เยือกแข็ง ช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมันในระหว่างการแช่แข็ง-ละลาย ได้ไม่ต่างจากการเติมสารกันหืนสังเคราะห์ BHA (butylate hydroxylanisole) (Supawong, 2018) อย่างไรก็ตาม การประยุกต์ใช้รำข้าวไฮโดรไลเสทในอุตสาหกรรมอาหารยังมีข้อจำกัดในเรื่องสีน้ำตาล

เนื่องจากปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิต แป้งและน้ำตาลเป็นสารตั้งต้นของการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด ซึ่งในกากรำข้าวนั้นมีทั้งแป้งและโปรตีนเป็นองค์ประกอบ เมื่อผ่านกระบวนการสกัดและการย่อยด้วยเอนไซม์ภายใต้สภาวะความร้อนสูง จึงทำให้น้ำตาลและกรดอะมิโนเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดส่งผลให้สารสกัดมีสีน้ำตาล ทำให้มีข้อจำกัดในการนำสารสกัดไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่ม สารสกัดรำข้าวที่มีสีน้ำตาลจะส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่เติมด้วยสารสกัดดังกล่าวมีสีเข้มขึ้น ไม่รับประทานไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคและไม่ใช่สิ่งที่ต้องการของผู้ประกอบการ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการลดกิจกรรมการเกิดสีน้ำตาลในสารสกัดรำข้าวที่สกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส โดยการแยกน้ำตาลรีเวิร์ซซึ่งเป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาเมลลาร์ดออกและการใช้สารลดการเกิดสีน้ำตาล วิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ ค่าการเกิดสีน้ำตาล ปริมาณโปรตีนและค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดรำข้าวที่ได้ เพื่อเป็นการเพิ่มคุณประโยชน์ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารได้อย่างหลากหลาย โดยไม่มีผลกระทบต่อด้านสีของสารสกัดรำข้าวและยังคงสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัตถุดิบ

กากรำข้าวที่เหลือจากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าว ซึ่งผ่านการสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ด้วยตัวและความร้อน ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท กลีสรรย์ จำกัด จังหวัดพระนครศรีอยุธยา กากรำข้าวถูกบรรจุใส่ถุงสุญญากาศ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ จนกว่าจะนำมาใช้

2.2 ศึกษาการใช้เอนไซม์ย่อยแป้งและน้ำตาลเพื่อลดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในกากรำข้าวก่อนการสกัด

กากรำข้าวเติมน้ำในอัตราส่วน (1:7) ย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยแป้งและน้ำตาล (Ultraflow® Max, SAN Super 360L, GC 147) ภายใต้สภาวะดังตารางที่ 1 หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 2 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปหมนแห้งที่ 10,000 x g นาน 15 นาที แยกสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนเปรียบเทียบกับสารละลายส่วนใสที่แยกได้จากกระบวนการที่ไม่ได้ผ่านการย่อย (ควบคุม)

2.2.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar content)

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์วิเคราะห์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1994) โดยนำสารละลายส่วนใสที่แยกได้ 10 มิลลิลิตร เติมน้ำ low-alkalinity of somogyi ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มนาน 10 นาที แล้วทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมน้ำ Nelson's arsenomolybdate ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500

นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu UV-2401PC Recording Spectrophotometer, โตเกียว, ประเทศญี่ปุ่น) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0-240 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.2 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีน (protein content) ในสารละลายส่วนใสวิเคราะห์ด้วยวิธี Lowry (Lowry et al., 1951) โดยการนำสารละลายส่วนใสที่แยกได้ 1 มิลลิลิตร เติมน้ำด้วยสารละลาย alkali copper ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำด้วยสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0-160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

คัดเลือกสิ่งทดลองที่สามารถกำจัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดออกจากกากรำข้าวได้มากที่สุด และสูญเสียปริมาณโปรตีนน้อยที่สุด นำไปทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 1 สภาวะการย่อยแป้งและน้ำตาลในกากรำข้าว

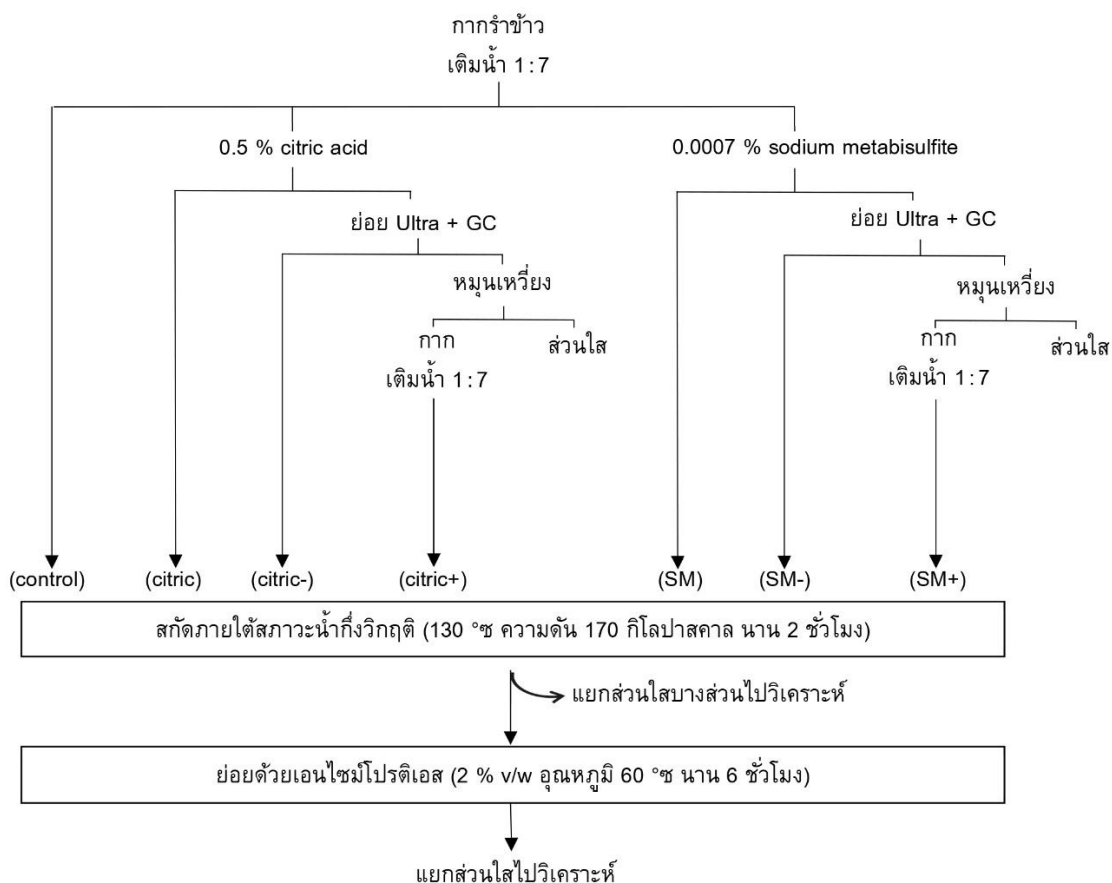
สิ่งทดลอง	สภาวะในการย่อย			
	ชนิดของเอนไซม์ (2 % v/w)	อุณหภูมิ (°C)	pH	เวลา (ชม.)
ควบคุม	No add	50	6	2
San	San super	60	5	2
Ultra	Ultraflow® max	50	6	2
Ultra + San	Ultraflow® max followed by San super	50/60	6/5	2/2
Ultra + GC	Ultraflow® max followed by Glucoamylase	60/60	6/4.5	2/2

2.3 ศึกษาการใช้สารลดการเกิดสีน้ำตาล
ร่วมกับเอนไซม์ย่อยแป้งและน้ำตาลก่อน
กระบวนการสกัดข้าวด้วยน้ำกึ่งวิกฤติต่อ
ด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส

ไดอะแกรมแสดงกระบวนการทดลอง รูป
ที่ 1 โดยการนำการำข้าวเติมสารลดการเกิดสี
น้ำตาล ได้แก่ กรดซิตริกความเข้มข้น 0.5 % w/v
และโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 0.0007
% w/v ในอัตราส่วนการำต่อสารละลายสารลดการ
เกิดสีน้ำตาล 1:7 แขนง 18 ชั่วโมง จากนั้นแยก
สารแขวนลอยนี้ออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกเก็บไว้
ใช้ในกระบวนการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤติต่อการ
ย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส เปรียบเทียบกับตัวอย่าง
ควบคุมที่ไม่เติมสารลดการเกิดสีน้ำตาล และไม่ผ่าน

การย่อยแป้งและน้ำตาล

ส่วนที่สองนำไปแยกแป้งและน้ำตาลโดย
การย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยแป้งและน้ำตาลภายใต้
สภาวะที่คัดเลือกมาจากการทดลองที่ 2.2 และแยก
สารแขวนลอยออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกหลังการ
ย่อยแป้งและน้ำตาล แล้วเก็บสารแขวนลอยทั้งหมด
ไว้ในกระบวนการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤติต่อการ
ย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส และส่วนที่สองเก็บ
การำที่เหลือหลังการหมักเหวี่ยงแยกแป้งและ
น้ำตาล แล้วเติมน้ำในการำที่แยกได้ในอัตราส่วน
1:7 นำไปใช้สกัดโปรตีนและสารสำคัญด้วยน้ำกึ่ง
วิกฤติต่อการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส เหมือน
กับส่วนแรก



รูปที่ 1 ไดอะแกรมกระบวนการสกัดข้าวด้วยน้ำกึ่งวิกฤติต่อการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส

กระบวนการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตต่อการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส เริ่มจากนำกากรำข้าวและสารแขวนลอยที่ได้จากกระบวนการข้างต้นจำนวน 7 สิ่งทดลอง ได้แก่ (1) ควบคุม (control) คือ ตัวอย่างที่ไม่แช่สารลดการเกิดสีน้ำตาลและไม่ผ่านการย่อยแป้งและน้ำตาล (2) กรดซิตริก (citric) คือ ตัวอย่างที่แช่กรดซิตริก ไม่ผ่านการย่อยแป้งและน้ำตาล (3) กรดซิตริก- (citric-) คือ ตัวอย่างที่แช่กรดซิตริก ผ่านการย่อยแป้งและน้ำตาล (4) กรดซิตริก+ (citric+) คือ ตัวอย่างที่แช่กรดซิตริก ผ่านการย่อยและแยกแป้งและน้ำตาล (5) โซเดียมเมแทไบซัลไฟต์ (SM) คือ ตัวอย่างที่แช่โซเดียมเมแทไบซัลไฟต์ ไม่ผ่านการย่อยแป้งและน้ำตาล (6) โซเดียมเมแทไบซัลไฟต์- (SM-) คือ ตัวอย่างที่แช่โซเดียมเมแทไบซัลไฟต์ ผ่านการย่อยแป้งและน้ำตาล และ (7) โซเดียมเมแทไบซัลไฟต์+ (SM+) คือ ตัวอย่างที่แช่โซเดียมเมแทไบซัลไฟต์ ผ่านการย่อยและแยกแป้งและน้ำตาล

โดยนำสารแขวนลอยทั้ง 7 ตัวอย่าง ไปสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตต่อการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส โดยเทสารแขวนลอยลงในขวดดูแรนอัตรา 3 ใน 4 ของปริมาตรขวดและปิดฝาให้สนิท นำไปสกัดภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤต โดยใช้เครื่อง high pressure cooker ที่อุณหภูมิ 130 °ซ ความดัน 170 กิโลปาสคาล นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แบ่งเก็บสารละลายส่วนใสบางส่วนไว้สำหรับการวิเคราะห์ อีกส่วนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส G6 ความเข้มข้น 2 % v/w อุณหภูมิ 60 °ซ นาน 6 ชั่วโมง (Supawong *et al.*, 2018) หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 95 °ซ นาน 2 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปหมนเหวี่ยงที่ 10,000 x g นาน 15 นาที สารละลายส่วนใสที่ได้เรียกว่ารำข้าวสกัด นำสารสกัดรำข้าวที่ได้ไปวิเคราะห์ความเข้มของสีน้ำตาล (browning intensity) ปริมาณโปรตีน และกิจกรรม

การต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant activity)

2.3.1 วิเคราะห์ความเข้มของสีน้ำตาล

ปริมาณสารเมลานอยดินในสารสกัดที่จะวิเคราะห์ด้วยการวัดค่าความเข้มของสีน้ำตาลตามวิธีของ Dong และคณะ (2011) โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดรำข้าวที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

2.3.2 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ตามวิธีการในข้อ 2.2.2

2.3.3 วิเคราะห์ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของสารสกัดรำข้าวด้วยวิธี 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) ดัดแปลงมาจาก Yin และคณะ (2012) โดยเตรียมสารละลาย ABTS เข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.818% และโปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ความเข้มข้น 0.0015 % จากนั้นผสมสารละลาย ABTS กับโปแทสเซียมเพอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ บ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 5 ± 2 °ซ นาน 12 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดอนุมูล ABTS เริ่มการวิเคราะห์ด้วยสารละลายอนุมูล ABTS ปริมาณ 3 มิลลิลิตร เติมด้วยสารสกัดรำข้าว 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่อุณหภูมิห้อง นาน 6 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายโทรลอกซ์ (trolox) ความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัม โทรลอกซ์ต่อมิลลิลิตร

คัดเลือกสภาวะที่ให้ค่าปริมาณโปรตีนและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด มีค่าความเข้มของสีน้ำตาลในสารสกัดต่ำสุด อีกทั้งสูญเสียพลังงานน้อยและมีขั้นตอนกระบวนการใน

การผลิตที่ไม่ซับซ้อน ไปทำแห้งแบบฟรีซไดรย (Gamma 2-16 LSC Freeze dryer, Sciquip, สหราชอาณาจักร)

2.4 ศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพของผงรำข้าวสาคั่วที่ได้จากการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสม

นำผงรำข้าวสาคั่วที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตที่ได้ (yield) ปริมาณโปรตีน ปริมาณสารฟีนอลิกรวม (total phenolic content) และค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ ferric reducing antioxidant power (FRAP)

2.4.1 วิเคราะห์ปริมาณผลผลิตที่ได้

ปริมาณผลผลิตที่สกัดได้ คำนวณได้จากการชั่งน้ำหนักการรำข้าวแห้งที่ใช้เริ่มต้น (DRB) และน้ำหนักสารสกัดรำข้าวผงที่สกัดได้ (RBE) มาคำนวณดังสมการ $\text{yield (\% w/w)} = (\text{RBE} \div \text{DRB}) \times 100$ ทั้งนี้สารสกัดรำข้าวผงที่ได้จะเก็บให้พ้นแสงที่อุณหภูมิ -18°C เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

2.4.2 วัดค่าสี

ค่าสีของผงรำข้าวสาคั่ว วัดออกมาในระบบ CIE ค่า L^* (ความสว่าง) a^* (ค่าความเป็นสีแดง) และ b^* (ค่าความเป็นสีเหลือง) โดยวัดด้วยเครื่อง Minolta colorimeter (CR-310; Minolta Camera Co. Ltd., โอซาก้า, ประเทศญี่ปุ่น) ตามวิธีการของ Supawong และคณะ (2018)

2.4.3 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนของผงรำข้าวสาคั่ว วิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldahl ตามวิธีของ AOAC (AOAC, 2000) โดยใช้ค่า conversion factor ที่ 5.95

2.4.4 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม วิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Singleton และ Rossi (1965) นำผงสาร

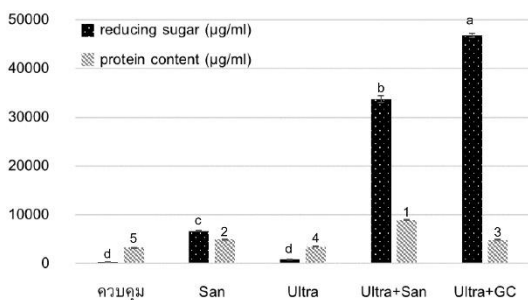
สกัดรำข้าวละลายในน้ำกลั่น แล้วนำสารละลายดังกล่าวปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมด้วยสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 4 มิลลิตร เขย่าให้สารละลายผสมกัน และตั้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย $7.5\% \text{ Na}_2\text{CO}_3$ ปริมาตร 2 มิลลิตร เขย่าให้สารละลายผสมกัน และตั้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากกราฟมาตรฐานปริมาณกรดแกลลิก

2.4.5 วิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

วิเคราะห์ตามวิธีการในข้อ 2.3.3

2.4.6 วิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านออกซิเดชัน การวิเคราะห์ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Benzie และ Strain (1996) หลักการของสารต้านออกซิเดชันที่สามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อนของเฟอร์ริก $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเฟอร์รัส $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ จากสารละลายสีเหลืองจะถูกเปลี่ยนเป็นสารละลายสีน้ำเงินม่วง ปริมาณของ $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ ที่เกิดขึ้น คือ ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่แสดงผลในรูป FRAP value เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ FeSO_4 โดยเริ่มจากการเติมสารละลายผงรำข้าวสาคั่วลงในสารละลาย ferric-TPTZ ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เขย่าให้สารละลายผสมกัน และตั้งไว้เป็นเวลา 8 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำปราศจากไอออน (deionized water) เป็นสารละลายควบคุม



รูปที่ 2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนในสารละลายส่วนใสหลังการย่อยกากข้าวด้วยเอนไซม์ย่อยแป้งและน้ำตาล [^{a-d} ตัวอักษรกำกับต่างกันในแต่ละข้อมูลปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ ¹⁻⁵ ตัวเลขกำกับต่างกันในแต่ละข้อมูลปริมาณโปรตีน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$); ควนคุม คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยแป้งและน้ำตาล; San คือ ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ San super; Ultra คือ ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Ultraflow[®] max; Ultra+San คือ ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Ultraflow[®] max ตามด้วยเอนไซม์ San super; Ultra+GC คือ ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Ultraflow[®] max ตามด้วยเอนไซม์ glucoamylase]

2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) โดยทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA (analysis of variance) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 ($p < 0.05$) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ผลการศึกษาการใช้เอนไซม์ย่อยแป้งและน้ำตาลเพื่อลดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่างรำข้าวก่อนการสกัด

การศึกษาย่อยแป้งและน้ำตาลในกากรำข้าวที่ผ่านการสกัดน้ำมัน เพื่อต้องการลดปริมาณสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่จะเกิดในกระบวนการสกัดสารสำคัญภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤติและการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสให้ได้มากที่สุด ขณะเดียวกันจะต้องมีการสูญเสียปริมาณโปรตีนออกไปในขั้นตอนนี้น้อยที่สุด จากการย่อยกากรำข้าวด้วยเอนไซม์ทางการค้า 3 ชนิด คือ (1) Ultraflow[®] Max ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีส่วนผสมของเอนไซม์ไซลาลเนส (xylanase) กับเอนไซม์เบต้า-กลูคาเนส (β-Glucanase) 2) SAN Super 360L ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีส่วนผสมของเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (amylglucosidases) แอลฟา-อะไมเลส (alpha-amylases) โปรติเอส (protease) และกลูคาเนส (glucanases) และ (3) GC 147 ซึ่งเป็นเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) (รูปที่ 2) พบว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ทางการค้า SAN Super 360L สามารถแยกน้ำตาลรีดิวซ์ออกมาได้มากกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ Ultraflow[®] Max ขณะเดียวกันก็สูญเสียปริมาณโปรตีนไปในขั้นตอนนี้น้อยกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ Ultraflow[®] Max เนื่องจากเอนไซม์ Ultraflow[®] Max ประกอบด้วยเอนไซม์ไซลาลเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเฮมิเซลลูเลส (hemicellulases) ที่มีหน้าที่ย่อยแกนหลักของเฮมิเซลลูโลสที่เป็นโครงสร้าง และเอนไซม์เบต้า-กลูคาเนสที่ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสที่เป็นโครงสร้างผนังเซลล์ให้เป็นเซลลูโลสสายโซ่และน้ำตาลกลูโคส แต่เอนไซม์ SAN Super 360L ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสที่ทำหน้าที่ย่อยสตาร์ชโดยตัดโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสออกจากโมเลกุลของสตาร์ชที่ตำแหน่งปลายด้านนอน-รีดิวซ์ซิง (non-reducing end) ของพันธะไกลโคไซด์

(glycosidic bond) ทั้งที่ตำแหน่งแอลฟา-1-4 และ 1-6 เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสซึ่งย่อยพันธะไกลโคไซด์ภายในสายพอลิเมอร์ของโมเลกุลสตาร์ชและไกลโคเจน (glycogen) ที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 แบบสุ่มทำให้โมเลกุลของสตาร์ชและไกลโคเจนถูกย่อยได้น้ำตาล และ SAN Super 360L ยังประกอบด้วยเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งทำหน้าที่ย่อยพันธะเปปไทด์ในสายโปรตีน ดังนั้นการที่เอนไซม์ทางการค้า SAN Super 360L มีส่วนประกอบของเอนไซม์ย่อยแป้งและน้ำตาลที่หลากหลาย อีกทั้งยังมีเอนไซม์ย่อยโปรตีนอยู่ด้วย จึงเป็นสาเหตุให้กากรำข้าวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ SAN Super 360L สามารถย่อยเอาน้ำตาลออกมาได้มากกว่า แต่ก็ทำให้มีการสูญเสียโปรตีนออกไปมากเช่นกัน เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนที่สูญเสียในการำข้าวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Ultraflow® Max พบว่ามีการสูญเสียโปรตีนมากกว่าน้ำตาลรีดิวซ์ อาจมีสาเหตุมาจากเมื่อโครงสร้างของกากรำข้าวถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไซลาลเนสกับเอนไซม์เบต้า-กลูคาเนส แล้วโครงสร้างของกากรำข้าวแตกออก ทำให้ทั้งสตาร์ชและโปรตีนที่จับอยู่ในโครงสร้างถูกเปิดออกมาในสารละลายและละลายออกมาได้

เมื่อย่อยกากรำข้าวด้วยเอนไซม์ Ultraflow® Max ต่อด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ GC 147 พบว่าสามารถกำจัดน้ำตาลรีดิวซ์ออกมากกว่า อีกทั้งยังสูญเสียปริมาณโปรตีนน้อยกว่ากากรำข้าวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Ultraflow® Max ต่อด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ SAN Super 360L เนื่องจากโครงสร้างกากรำข้าวที่ซับซ้อนถูกย่อยด้วยเอนไซม์ Ultraflow® Max ซึ่งย่อยโครงสร้างเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ในการำข้าว หลังจากนั้นตามด้วยการย่อยด้วย GC 147 ซึ่งเป็นเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่สามารถสลายพันธะไกลโคซิดิก เพื่อให้ได้กลูโคสที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว สามารถย่อยเอาน้ำตาลแยกออกมาได้มากและสูญเสียโปรตีนน้อยกว่า

กากรำข้าวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Ultraflow® Max ต่อด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ SAN Super 360L ซึ่งมีเอนไซม์ย่อยโปรตีนเป็นองค์ประกอบด้วย

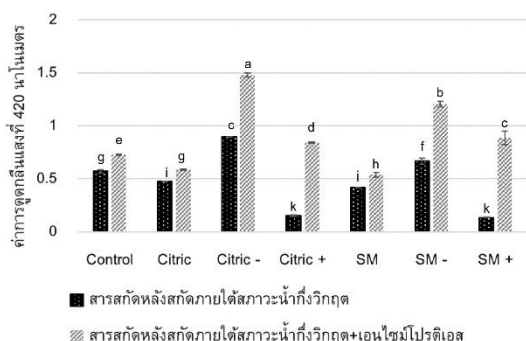
เนื่องจากแป้งและน้ำตาลเป็นสารตั้งต้นของการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่ทำให้มีสีน้ำตาลในสารสกัด ซึ่งไม่เป็นที่ต้องการของผู้ประกอบการที่ต้องการนำสารสกัดรำข้าวสุดท้ายไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร ดังนั้นการศึกษาการย่อยกากรำข้าวที่สกัดไขมันออกแล้วด้วยเอนไซม์ย่อยแป้งและน้ำตาล ก่อนกระบวนการสกัดโปรตีนและสารสำคัญ เพื่อกำจัดแป้งและน้ำตาลออกให้มากที่สุด จึงเลือกสิ่งทดลองการย่อยด้วยเอนไซม์ Ultraflow® Max ต่อด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ GC 147 ที่สามารถแยกน้ำตาลรีดิวซ์ออกได้มากที่สุดและสูญเสียโปรตีนต่ำที่สุดไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.2 ผลการศึกษาการใช้สารลดการเกิดสีน้ำตาลร่วมกับเอนไซม์ย่อยแป้งและน้ำตาล ก่อนกระบวนการสกัดรำข้าวด้วยน้ำกึ่งวิกฤติ ต่อด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส

3.2.1 ความเข้มข้นของสีน้ำตาล

การศึกษาผลของการใช้สารลดการเกิดสีน้ำตาลร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยแป้งและน้ำตาล ก่อนกระบวนการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤติ และการย่อยด้วยโปรติเอส เพื่อลดความเข้มของสีน้ำตาลในรำข้าวสกัด ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 3 พบว่าการแช่กากรำข้าวทั้งในกรดซิตริก (citric) และโซเดียมเมแทไบซัลไฟต์ (SM) ก่อนการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤติสามารถลดการเกิดสีน้ำตาลในสารสกัดมากกว่าการไม่แช่ (control) ทั้งในสารสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤติและในสารสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤติตามด้วยการย่อยด้วยโปรติเอสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจากกรดซิตริกที่ใช้แช่กากรำข้าวนั้นไปลดค่าความเป็นกรดต่างของระบบ ซึ่งค่าความเป็นกรดต่างที่ต่ำเป็นสภาวะที่ทำให้ปฏิกิริยาเมลลาร์ดเกิดได้น้อยกว่าที่สภาวะค่าความเป็นกรด

ต่างสูง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sakac และคณะ (2012) พบว่าการเพิ่มขึ้นของค่าความเป็นกรดต่าง และอุณหภูมิส่งผลให้ปฏิกิริยาเมลลาร์ดเกิดได้มากขึ้น ขณะที่ Wolfrom และคณะ (1974) พบว่าการลดซัลฟิรสามารถยับยั้งปฏิกิริยาเมลลาร์ดระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์และกรดอะมิโน อีกทั้งกรดซัลฟิรยังมีฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชัน ส่วนโซเดียมเมแทบอลิซึมไฟต์มีสมบัติในการเป็นสารฟอกสี (bleaching agent) จึงส่งผลให้กากรำข้าวที่ถูกแช่ในสารละลายโซเดียมเมแทบอลิซึมไฟต์มีค่าสีน้ำตาลที่ต่ำ อีกทั้งส่งผลให้สารสกัดที่ได้มีค่าความเข้มของสีน้ำตาลต่ำลง



รูปที่ 3 ความเข้มของสีน้ำตาลของสารสกัดรำข้าวหลังสกัดภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤต และหลังสกัดภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤตต่อการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส วัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

ความเข้มของสีน้ำตาลในสารสกัดที่มีการแช่สารลดการเกิดสีน้ำตาลตามด้วยการย่อยและแยกแ่งและน้ำตาล (Citric+ และ SM+) แสดงปริมาณค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตรในสารสกัดภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤตที่น้อยที่สุด ซึ่งค่านี้แสดงปริมาณเม็ดสีเมลานอยดินที่เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของปฏิกิริยาเมลลาร์ด ซึ่งทำให้เกิดสีน้ำตาล

ในสารสกัด สาเหตุที่สิ่งทดลอง Citric+ และ SM+ ให้ค่าความเข้มของสีน้ำตาลต่ำสุดในสารสกัดภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤต เนื่องจาก Citric+ มีการแช่กากรำข้าวในกรดซัลฟิรที่ช่วยลดการเกิดสีน้ำตาล และ SM+ มีการแช่กากรำข้าวในสารละลายโซเดียมเมแทบอลิซึมไฟต์ที่สามารถฟอกสีได้ อีกทั้งหลังจากแช่สารลดสีน้ำตาลแล้ว ทั้ง 2 สิ่งทดลอง จะย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยแ่งและน้ำตาล (Ultraflow® Max ตามด้วย GC 147) แล้วหมุนเหวี่ยงแยกแ่งและน้ำตาลออกไปก่อนการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต จึงทำให้แ่งและน้ำตาลที่เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาเมลลาร์ดถูกกำจัดออกไปและมีปริมาณน้อยลง ส่งผลให้ปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่เกิดขึ้นภายใต้ความร้อนและความดันในสภาวะน้ำกึ่งวิกฤตมีน้อยกว่าสิ่งทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ขณะเดียวกันกากรำข้าวที่มีการแช่สารลดการเกิดสีน้ำตาลที่มีการย่อยแ่งและน้ำตาลแต่ไม่มีการแยกแ่งและน้ำตาลออก (Citric- และ SM-) มีค่าความเข้มของสีน้ำตาลในสารสกัดสุดท้ายที่สูงที่สุด เนื่องจากในกระบวนการย่อยแ่งและน้ำตาลนั้นจะเกิดปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเล็ก รวมถึงน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่เป็นสาเหตุของสีน้ำตาล ส่งผลให้สารสกัดสุดท้ายของทั้งสองสิ่งทดลองมีปริมาณความเข้มของสีน้ำตาลสูงสุด

การเปรียบเทียบความเข้มของสีน้ำตาลในสารสกัดภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤตกับสารสกัดภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤตตามด้วยการย่อยด้วยโปรติเอส พบว่าการเกิดสีน้ำตาลในสารสกัดภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤตมีค่าความเข้มของสีน้ำตาลที่ต่ำกว่าสารสกัดภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤตตามด้วยการย่อยด้วยโปรติเอสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในทุกสิ่งทดลอง เนื่องจากหลังการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตตามด้วยการย่อยด้วยโปรติเอส จะส่งผลให้โปรตีนที่อยู่ในโครงสร้างกากรำข้าวเกิด

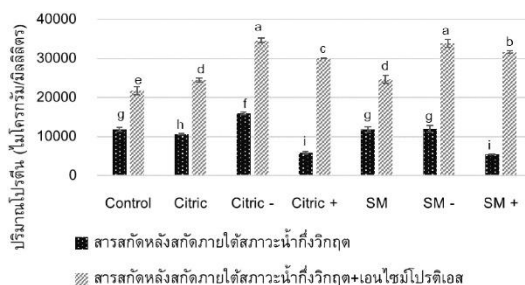
การเผยออกและโปรตีนถูกย่อยเกิดเป็นโปรตีนสายสั้น เปปไทด์ และกรดอะมิโน ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในการำข้าว จึงส่งผลให้กระบวนการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤติตามด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสมีความเข้มข้นของสีน้ำตาลในสารสกัดที่สูงกว่าการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤติเพียงอย่างเดียว และยังพบว่าการแช่สารลดการเกิดสีน้ำตาลไม่มีผลต่อการเกิดสีน้ำตาลในสารสกัดรำข้าวในกระบวนการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤติตามด้วยการย่อยด้วยโปรติเอส อาจเนื่องมาจากการเติมสารในปริมาณที่น้อยและฤทธิ์ของสารลดการเกิดสีน้ำตาลได้สิ้นสุดไปแล้วในกระบวนการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤติ จึงไม่ส่งผลต่อในกระบวนการย่อยด้วยโปรติเอส อีกทั้งในกระบวนการย่อยด้วยโปรติเอสเกิดเปปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้นของการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดจำนวนมากจึงส่งผลต่อการเกิดสีน้ำตาลที่มากขึ้น

ผลการทดลอง การแช่การำข้าวทั้งในกรดซิตริก (citric) และโซเดียมเมแทไบซัลไฟต์ (SM) และไม่มีการย่อยแป้งและน้ำตาลออกก่อนการสกัดสารสำคัญภายใต้ น้ำกึ่งวิกฤติตามด้วยการย่อยด้วยโปรติเอส ทำให้ได้สารสกัดสุดท้ายมีค่าความเข้มของสีน้ำตาลต่ำที่สุด

3.2.2 ปริมาณโปรตีน

ผลของการใช้สารลดการเกิดสีน้ำตาลร่วมกับเอนไซม์ย่อยแป้งและน้ำตาล ก่อนกระบวนการสกัดรำข้าวด้วยน้ำกึ่งวิกฤติต่อการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส ต่อปริมาณโปรตีนแสดงในรูปที่ 4 การแช่การำข้าวในสารละลายกรดซิตริก (citric) และสารละลายโซเดียมเมแทไบซัลไฟต์ (SM) ก่อนการสกัดสารสำคัญ ให้ค่าปริมาณโปรตีนในสารสกัดสูงกว่าการไม่แช่ (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจากการำข้าวที่แช่สารละลายกรดซิตริก (citric) และสารละลายโซเดียมเมแทไบซัลไฟต์ (SM) เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด

ที่ให้ค่าสีน้ำตาลในสารสกัดสุดท้ายต่ำกว่าการไม่แช่ (รูปที่ 3) จึงทำให้สูญเสียกรดอะมิโนไปในการเกิดเมลลาร์ดที่น้อยกว่า ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนในสารสกัดสุดท้ายสูงกว่า

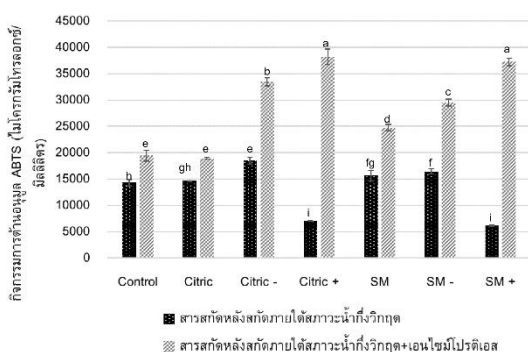


รูปที่ 4 ปริมาณโปรตีนในสารสกัดรำข้าวหลังสกัดภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤติ และหลังสกัดภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤติต่อการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส

ส่วนสิ่งทดลองที่ผ่านการแช่ด้วยสารละลายกรดซิตริกและโซเดียมเมแทไบซัลไฟต์ ร่วมกับการย่อยแป้งและน้ำตาล และไม่มีการแยกแป้งและน้ำตาลออกก่อนการสกัดสารสำคัญ (Citric- และ SM-) มีค่าปริมาณโปรตีนในสารสกัดสุดท้ายสูงที่สุด เนื่องจากเกิดการย่อย 2 รอบ คือ การย่อยการำข้าวรอบแรกด้วยเอนไซม์ย่อยแป้งและน้ำตาล และไม่มีการแยกแป้งและน้ำตาลออกก่อน จึงไม่มีการสูญเสียโปรตีนออกไปเลย จากนั้นมีการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤติตามด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส จึงส่งผลให้มีการสกัดและย่อยโปรตีนออกมาในหลายขั้นตอน ทำให้มีค่าปริมาณโปรตีนสูงสุด แต่อาจมีการสูญเสียกรดอะมิโนไปในปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่เกิดขึ้นบ้างบางส่วน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนที่ถูกสกัดออกมาแล้วอาจสูญเสียไปในสัดส่วนที่น้อย

ส่วนการแช่การำข้าวด้วยสารละลายกรดซิตริกและโซเดียมเมแทไบซัลไฟต์ ร่วมกับการย่อยแป้งและน้ำตาล แล้วแยกแป้งและ

น้ำตาลออกก่อนการสกัดสารสำคัญ (Citric+ และ SM+) อาจมีการสูญเสียโปรตีนออกไปบ้างในกระบวนการแยกแ่งและน้ำตาล แต่กลับพบว่าให้ค่าปริมาณโปรตีนในสารสกัดสุดท้ายสูงกว่าการแช่และไม่มีการย่อยด้วยแ่งและน้ำตาล (citric และ SM) อาจเนื่องมาจากการย่อยแ่งและน้ำตาลแล้วแยกออก ส่งผลทำให้มีปริมาณน้ำตาลที่จะเกิดปฏิกิริยาน้อยและโปรตีนที่คงเหลืออยู่ในสารสกัดสุดท้ายเกิดเมลลาร์ดได้น้อย และที่สำคัญการแยกแ่งและน้ำตาลออกส่งผลให้โปรตีนมีความบริสุทธิ์มากขึ้น มีปริมาณสารอื่นเจือปนในสารสกัดสุดท้ายน้อยลง จึงส่งผลให้มีค่าปริมาณโปรตีนที่สูงกว่า



รูปที่ 5 ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดรำข้าวหลังสกัดภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤต และหลังสกัดภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤตต่อการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส

ปริมาณโปรตีนในสารสกัดภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤตตามด้วยการย่อยด้วยโปรติเอสมีค่าปริมาณโปรตีนสูงกว่าสารสกัดภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤตเพียงอย่างเดียวในทุกสิ่งทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องมาจากหลังการสกัดภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤต การรำข้าวจะถูกทำลายโครงสร้างทำให้โครงสร้างที่ซับซ้อนเปิดออกและเกิดการอ่อนตัว ปริมาณสารสำคัญถูกสกัดออกมา

บางส่วน จากนั้นการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสทำให้โปรตีนที่ซ่อนอยู่ในโครงสร้างถูกย่อยและสกัดออกมาในสารละลายเพิ่มมากขึ้น จึงส่งผลให้การย่อยด้วยโปรติเอสหลังการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตเพียงอย่างเดียว

ผลการทดลองการแช่การำข้าวด้วยสารละลายกรดซิตริกและโซเดียมเมแทโบซัลไฟด์ร่วมกับการย่อยแ่งและน้ำตาล และไม่มีการแยกแ่งและน้ำตาลออกก่อนการสกัดสารสำคัญ (Citric- และ SM-) มีค่าปริมาณโปรตีนในสารสกัดสุดท้ายสูงที่สุด

3.2.3 ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าว วิเคราะห์ด้วยวิธีการต้านอนุมูล ABTS ซึ่งเป็นวิธีที่วัดความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS ซึ่งเป็นสารที่มีสี เกิดจากการออกซิไดซ์โดยอนุมูลเปอร์ออกไซด์ (Loypimai *et al.*, 2012) เมื่อเติมสารสกัดรำข้าวลงไปยับยั้งอนุมูลจะทำให้สีสารละลายจางลง ซึ่งผลการวิเคราะห์นี้จะคำนวณเป็นค่าคงที่สัมพันธ์กับสารต้านอนุมูลมาตรฐานโทรลอคซ์ (วิตามินที่ละลายน้ำได้) ผลการทดลองพบว่าสารสกัดรำข้าวที่ได้จากการสกัดภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤตตามด้วยการย่อยด้วยโปรติเอสให้ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตเพียงอย่างเดียวในทุกสิ่งทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูปที่ 5) ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดที่ได้จากการสกัดภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤตตามด้วยการย่อยด้วยโปรติเอสมีทั้งปริมาณผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเมลลาร์ดคือสารเมลานอยดิน (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร) (รูปที่ 3) และปริมาณโปรตีน (รูปที่ 4) ที่สูงกว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตเพียงอย่างเดียว ซึ่งมีรายงานว่าผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเมลลาร์ดนั้นแสดงสมบัติในการเป็น

สารต้านอนุมูลอิสระ (Supawong *et al.*, 2018) Yoshimura และคณะ (1997) ศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของโมเดลผลิตภัณฑ์เมลลาร์ด โดยใช้น้ำตาลกลูโคสทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนไกลซีน พบว่าสารดังกล่าวแสดงค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระผ่านกลไกการให้อิเล็กตรอน ส่วนโปรตีนก็สามารถแสดงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน ซึ่ง Sharma และคณะ (2011) ได้รายงานว่โปรตีนไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งรวมของโปรตีนที่แสดงค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี และสารสำคัญในสารสกัดรำข้าวที่แสดงค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระนั้น ได้แก่ โปรตีน เปปไทด์ กรดอะมิโน สารประกอบฟีนอลิก และผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Adebiyi *et al.*, 2009) อีกทั้ง Supawong และคณะ (2018) ยังพบว่าสารสกัดรำข้าวยังมีฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์อาหารทอดแช่เยือกแข็งอีกด้วย ดังนั้นฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูงของสารสกัดรำข้าวที่ได้จากการสกัดภายใต้สภาวะที่รุนแรงตามด้วยการย่อยด้วยโปรติเอส เป็นเพราะการมีปริมาณโปรตีนและปริมาณสารผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดที่สูง ซึ่งองค์ประกอบทั้งสองมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดังอธิบายข้างต้น

สารสกัดที่ได้จากการสกัดกากรำข้าวที่มีการแช่สารละลายกรดซิตริกและโซเดียมเมแทไบซัลไฟต์ และมีการย่อยแป้งและน้ำตาลก่อนการสกัดสารสำคัญ (Citric- และ SM-) พบว่าให้ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่สูง เนื่องจากสิ่งทดลองทั้งสองมีค่าสีน้ำตาลที่แสดงถึงปริมาณผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดและค่าปริมาณโปรตีนที่สูงที่สุด (รูปที่ 3 และ 4) ซึ่งองค์ประกอบทั้งสองมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ จึงส่งผลให้ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมีค่าที่สูง ขณะเดียวกันสารสกัดที่ได้จากการสกัดกากรำข้าวที่มีการแช่สารละลายกรดซิตริกและโซเดียมเมแทไบซัลไฟต์ และมีการย่อย

แป้งและน้ำตาลแล้วแยกแป้งและน้ำตาลออกก่อนการสกัดสารสำคัญ (Citric+ และ SM+) แสดงค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจากทั้งสองสิ่งทดลองมีการแยกแป้งและน้ำตาลออกก่อนการสกัดสารสำคัญ จึงส่งผลให้โปรตีน เปปไทด์ และกรดอะมิโนที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์สูง ส่งผลให้มีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด

การพิจารณาผลการลดกิจกรรมการเกิดสีน้ำตาลในสารสกัดรำข้าว พิจารณาถึงต้นทุนการผลิตและความซับซ้อนของกระบวนการที่โรงงานอุตสาหกรรมไม่ต้องการ จึงเลือกสิ่งทดลองที่มีการแช่กากรำข้าวในสารละลายซิตริกและไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยแป้งและน้ำตาล (citric) เนื่องจากกรดซิตริกกรดอาหารสามารถใช้ได้ในอุตสาหกรรมอาหาร ราคาไม่แพง อีกทั้งสิ่งทดลองที่เลือกนี้ให้ค่าความเข้มของสีน้ำตาลในสารสกัดสุดท้ายหลังการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤติต่อด้วยการย่อยด้วยโปรติเอสต่ำกว่าสิ่งทดลองอื่น ๆ และต่ำกว่าสิ่งทดลองควบคุม (control) อีกทั้งไม่มีความยุ่งยากในขั้นตอนการย่อยและแยกแป้งและน้ำตาล ซึ่งโรงงานอุตสาหกรรมอาหารไม่ต้องการความยุ่งยากซับซ้อนของกระบวนการ และสารสกัดสุดท้ายที่ได้จากสิ่งทดลองที่เลือกนี้ยังให้ค่าปริมาณโปรตีนและค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่สูงเป็นที่น่าสนใจของโรงงาน จึงเลือกสิ่งทดลอง citric ไปผลิตเป็นผงสารสกัดรำข้าวด้วยวิธีฟรีซดรายและวัดค่าสมบัติทางเคมีกายภาพ

3.3 ผลการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพของผงรำข้าวสกัดที่ได้จากการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสม

องค์ประกอบและค่าสมบัติทางเคมีกายภาพของผงสารสกัดรำข้าวแสดงดังตารางที่ 2 พบว่าปริมาณผลผลิตผงสารสกัดรำข้าวสูงถึง 46.8 % w/w และผงสารสกัดรำข้าวมีปริมาณโปรตีน 26.6

% อีกทั้งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม 29.4 มิลลิกรัมกรดแกลลิก/กรัมสารสกัดรำข้าวผง ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารประกอบที่แสดงสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี Cagdas และ Kumcuoglu (2015) กล่าวว่าสารประกอบฟีนอลิกมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและสมบัติการเป็นสารคีเลทโลหะ (metal chelate) ซึ่งสามารถอธิบายกลไกนี้ได้ว่าหมู่ hydroxyl ของสารประกอบฟีนอลิกสามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมกับสารอนุมูลอิสระในกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ นอกจากนี้สาร

ประกอบฟีนอลิกมีหมู่ฟังก์ชัน หมู่ hydroxyl และหมู่ carbonyl ที่พร้อมจะจับกับไอออนของเหล็ก (Fe) และทองแดง (Cu) สารสกัดรำข้าวผงแสดงค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS 14.1 มิลลิกรัม Trolox/กรัมสารสกัดรำข้าวผง ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP 8.4 มิลลิกรัม FeSO₄/กรัมสารสกัดรำข้าวผง และแสดงค่าสี L*, a* และ b* เท่ากับ 64.20, 2.29 และ 17.19 ตามลำดับ ซึ่งแสดงค่าสีเหลืองทอง (golden-yellow, Pantone 609 XGC) (Pantone, 2017)

ตารางที่ 2 ปริมาณผลผลิตที่สกัดได้และคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของผงรำข้าวสกัด

ค่าการวิเคราะห์	ผงรำข้าวสกัด
ปริมาณผลผลิต (% w/w โดยน้ำหนักสารสกัดผงต่อกากรำข้าวแห้ง)	46.8±1.3
ปริมาณโปรตีน (% โดยวิธี Kjeldahl)	26.6±1.1
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (มิลลิกรัมกรดแกลลิก/กรัมสารสกัดผง)	29.4±1.2
กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS (มิลลิกรัม Trolox/กรัมสารสกัดผง)	14.1±0.4
กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP (มิลลิกรัม FeSO ₄ /กรัมสารสกัดผง)	8.5±0.5
สี (L*/a*/b*)	64.1/2.3/17.2
เฉดสี (Pantone 609 XGC, Pantone 2017)	Golden-yellow color

สารสกัดรำข้าวผงที่ได้ ให้ปริมาณผลผลิตในปริมาณที่สูง ซึ่งอุตสาหกรรมสามารถนำไปผลิตในเชิงพาณิชย์ได้ อีกทั้งสารสกัดที่ได้ยังมีปริมาณโปรตีน สารประกอบฟีนอลิก และแสดงฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี ดังนั้นสารสกัดรำข้าวผงจึงสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อผลิตเป็นอาหารฟังก์ชัน หรือเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อเพิ่มคุณค่าทางสารอาหารที่ดีต่อสุขภาพต่อไปได้

4. สรุป

การลดกิจกรรมการเกิดสีน้ำตาลในสารสกัดรำข้าวที่สกัดภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤติต่อดวยการ

ย่อยด้วยโปรติเอส พบว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ทางการค้า Ultraflow® Max ตามด้วย GC 147 สามารถแยกแ่งและน้ำตาลออกจากกากรำข้าวได้สูงสุดโดยที่สูญเสียปริมาณโปรตีนต่ำสุด การแช่กากรำข้าวด้วยทั้งสารละลายซิทริกและโซเดียมเมแทไบซัลไฟต์ก่อนการสกัดสารสำคัญสามารถลดความเข้มของสีน้ำตาลในสารสกัด การแช่กากรำข้าวในสารละลายกรดซิทริกก่อนการสกัดสารสำคัญภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤติเหมาะสมและเพียงพอสำหรับการลดสีน้ำตาลในสารสกัดรำข้าวผง ซึ่งสารสกัดรำข้าวผงยังคงสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี มีค่าปริมาณโปรตีนและให้ผลผลิตที่สูง สามารถนำผลผลิตที่ได้ไปประยุกต์ใช้และพัฒนาในผลิตภัณฑ์

อาหารต่อไปได้ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มที่ต้องการผลิตสารสกัดรำข้าวเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารที่ไม่ต้องการสีน้ำตาล เช่น ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ ผลิตภัณฑ์เจลลาตอด ขนมขบเคี้ยว น้ำผลไม้ อีกทั้งอุตสาหกรรมที่ต้องการผลิตสารสกัดรำข้าวยังสามารถเลือกใช้สิ่งทดลองในงานวิจัยนี้เพื่อเป็นข้อมูลในการผลิตสารสกัดรำข้าวที่มีสมบัติทางเคมีกายภาพตามที่ต้องการได้ ซึ่งงานวิจัยนี้จะต้องมีการพัฒนาต่อไปในการวิจัยเชิงลึกถึงองค์ประกอบของสารสกัดและสมบัติเชิงหน้าที่ รวมถึงผลต่อร่างกายต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย บริษัท กลีสรรีย์ จำกัด จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ที่สนับสนุนการรำข้าวในการทำงานวิจัยนี้ และสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ห้องปฏิบัติการและสารเคมีในการทำวิจัย

6. รายงานอ้างอิง

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, ปริมาณการส่งออกข้าวของไทย รายประเทศ ระหว่างปี 2560-2562, แหล่งที่มา : <http://www.thairiceexporters.or.th/export%20by%20country%202019.html>, 10 มกราคม 2562.

สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม, ข้อมูลสถิติสำหรับการจัดทำดัชนีอุตสาหกรรม, แหล่งที่มา : <http://www.oie.go.th/academic/statistics>, 10 มกราคม 2562.

Adebisi, A.O., Adebisi, A.P., Ogawa, T. and Muramoto, K., 2009, Purification and

characterization of antioxidative peptides from unfractionated rice bran protein hydrolysates, *Int. J. Food Sci. Technol.* 43: 35-43.

AOAC, 2000, *Official Methods of Analysis*, 17th Ed., The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg.

Benzie, I.F. and Strain, J.J., 1996, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay, *Anal. Biochem.* 239:70-76.

Cagdas, E. and Kumcuoglu, S., 2015, Effect of grape seed powder on oxidative stability of precooked chicken nuggets during frozen storage, *J. Food Sci. Technol.* 52: 2918-2925.

Dong, S., Wei, B., Chen, B., McClements, D.J. and Decker, E.A., 2011, Chemical and antioxidant properties of casein peptide and glucose Maillard reaction products in fish oil-in-water emulsions, *J. Agric. Food Chem.* 59: 13311-13317.

Lowry, O.L., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

Loypimai, P., 2012, Total antioxidant capacity assessments *in vitro*, *J. Sci. Technol. MSU.* 31(2): 165-170.

Nelson, N., 1944, A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.* 153: 375-380.

Pantone, Find a PANTONE Color, Available Source: <http://www.pantone.com/color-finder/609-XGC>, July 7, 2019.

- Sakac, M., Gyura, J., Mišan, A., Šereš, Z. and Dokić, L., 2012, Influence of pH and temperature on nonenzymatic browning reaction between affined C sugar and amino acids, Food Feed Res. 39: 103-109.
- Sharma, S., Singh, R. and Rana, S., 2011, Bioactive Peptides: A review, Int. J. Bioautomation. 15: 223-250.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A, 1965, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, Am. J. Enol. Vitic. 16: 144-158.
- Supawong, S., 2018, Rice Bran Hydrolysates from Byproduct of Rice Bran Oil Industry: Browning Reduction, Antioxidant Activity and Quality Improvement in Frozen Fried Fish Cake, Doctoral Dissertation, Khon Kaen University, Khon Kaen.
- Supawong, S., Park, J.W. and Thawornchinsombut, S., 2018, Controlling lipid oxidation and volatile compounds in frozen fried fish cake prepared with rice bran hydrolysate, J. Aquat. Food Prod. Technol. 27: 885-899.
- Thamnarathip, P., Jangchud, K., Nitisinprasert, S. and Vardhanabhuti, B., 2016, Identification of peptide molecular weight from rice bran protein hydrolysate with high antioxidant activity, J. Cereal Sci. 69: 329-335.
- Wolfrom, M.L., Kashimura, N. and Horton, D., 1974, Factors affecting the Maillard browning reaction between sugars and amino acids, J. Agric. Food Chem. 22: 791-795.
- Yin, Z., Wang, J., Gu, X., Gu, H. and Kang, W., 2012, Antioxidant and a-glucosidase inhibitory activity of red raspberry (Harrywaters) fruits *in vitro*, Afr. J. Pharm. Pharmacol. 6: 3118-3123.
- Yoshimura, Y., Iijima, T., Watanabe, T. and Nakazawa, H., 1997, Antioxidative effect of Maillard reaction products using glucose glycine model system, J. Agric. Food Chem. 45: 4106-4109.