Published Online: 2 Dec 2020

สารประกอบฟีนอลิกและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากมอลต์

Phenolic Compounds and Protein Hydrolysates from Brewer's Spent Grain

กมลวรรณ เติมสายทอง

อีเมล: 6151701254@lamduan.mfu.ac.th

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ดร.ปัญญวัฒณ์ ปินตาทอง

อีเมล: punyawatt.pin@mfu.ac.th

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

กากมอลต์หรือกากเบียร์ เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ เป็นของแข็ง ไม่ละลายน้ำ ซึ่งเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากในการผลิต ส่วนใหญ่จะถูกขายให้กับอุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์ที่มีมูลค่าต่ำ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทเพื่อประโยชน์ทางเครื่องสำอาง โดยทำการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากกากมอลต์ด้วยวิธีการแช่ อัตราส่วน 1:10 น้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้น้ำ อะซิโตน และเอทานอล เป็นตัวทำละลายในการสกัด พบว่าสารสกัดจากกากมอลต์ที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 60 โดยปริมาตร ให้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด ร้อยละ 13.46 ± 1.10 เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ พบว่าสารสกัดจากกากมอลต์ที่ตัวทำละลายอะซิโตนร้อยละ 60 โดยปริมาตร ให้ปริมาณสารสำคัญที่มากกว่าสารสกัดจากตัวทำละลายอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับร้อยละ 8.01 ± 0.29 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม ปริมาณฟลาโวนอยด์ เท่ากับร้อยละ 2.63 ± 0.04 มิลลิกรัมสมมูลเคอร์เซทินต่อสารสกัด 1 กรัม และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 2 วิธี คือ การกวาดจับอนุมูลอิสระABTS และการรีดิวซ์เฟอร์ริก (FRAP) พบว่าสารสกัดจากเอทานอลร้อยละ 60 โดยปริมาตร ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS สูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 1.09 ± 0.02 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อสารสกัด 1 กรัม ขณะที่สารสกัดจากอะซิโตนร้อยละ 60 โดยปริมาตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP มากกว่าสารสกัดอื่น เท่ากับร้อยละ 5.81 ± 0.47 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อสารสกัด 1 กรัม ศึกษาการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากมอลต์ ด้วยเอนไซม์ปาเปนจากยางมะละกอ ความเข้มข้น 2,500 5,000 และ 10,000 ยูนิต และเวลาในการย่อยเท่ากับ 2, 4 และ 8 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดโปรตีน

Published Online: 2 Dec 2020

ไฮโดรไลเสทจากกากมอลต์ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนมีปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในระดับ 200.87 ± 3.92 - 497.49 ± 4.63 มิลลิกรัมโปรตีนต่อสารสกัด 1 กรัม เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อย (123.76 ± 2.43 มิลลิกรัมโปรตีนต่อสารสกัด 1 กรัม) เมื่อนำไปวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE เพื่อดูขนาดโมเลกุลโปรตีนที่ถูกย่อย พบว่าโปรตีนในกากมอลต์ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนแสดงแถบโมเลกุลที่ช่วง 21.948 - 36.574 กิโลดาลตัน ซึ่งมีขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับสารสกัดที่ไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน และพบแถบโมเลกุลขนาดน้อยกว่า 11 กิโลดาลตัน ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลเสทกากมอลต์ที่ได้มีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ระดับโพลีเปปไทด์จนถึงระดับเปปไทด์ขนาดเล็ก

คำสำคัญ: กากมอลต์, สารประกอบฟีนอลิก, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, โปรตีนไฮโดรไลเสท

Abstract

Brewer's spent grain is one of the major by products obtained from beer production process. Due to its large production, it is generally sold in the market as a low price product such as animal foods. Thus, the aim of this study extract phenolic compounds and prepare protein hydrolysate from brewer's spent grain for further application in cosmetic. The phenolic compounds were extracted by conventional shaking method with different solvents, i.e., deionized water, acetone, 60% (v/v) acetone/ethanol and 60% (v/v) ethanol. The results showed that highest yield of extract (13.46 ± 1.10%) was obtained when 60% ethanol was used. Total phenolic content (8.01 ± 0.29 mg GAE/g extract) and total flavonoid content (2.63 ± 0.04 mg QE/g extract) were highly gained in the presence of 60% v/v acetone. Antioxidant activities were assayed by ABTS radical scavenging activity and ferric reducing antioxidant power (FRAP), and the results revealed that 60% ethanol provided the highest ABTS value (1.09 ± 0.02 mg TEAC/g extract), while the highest FRAP value (5.81 ± 0.47 mg TEAC/g extract) was presented in 60% acetone. The protein hydrolysates were prepared from brewer's spent grain using papain enzyme with different units (2,500 5,000 and 10,000 U) and different hydrolysis times (2, 4 and 8 h). It was found that protein content assayed by Bradford's method was significantly increased to the range of 200 ± 3.92 – 497.49 ± 4.63 mg protein/g hydrolysate as compared with the untreated sample (123.76 ± 2.43 mg protein/g extract). The SDS-PAGE analysis revealed that protein was enzymatically degraded to smaller molecules, ranging around 21.948 to 36.574 kDa. Interestingly, the smaller band, less than 11 kDa was also observed. This can be implied that the obtained protein hydrolysates could be in the range ofpolypeptides and smaller peptides.

Keywords: Antioxidant Activity, Brewer's spent grain, Phenolic compounds, Protein hydrolysates

บทนำ/หลักการและเหตุผล

กากมอลต์หรือกากเบียร์ (brewers' spent grains) เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์โดยเริ่มจากการนำข้าวบาเลย์ (barley) ไปผ่านกระบวนการเตรียมมอลต์ (malting process) ได้เป็นบาเลย์มอลต์ และนำเข้าสู่กระบวนย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล (mashing) นำไปกรองจะได้ของเหลวที่มีรสหวาน เรียกว่า เวิร์ท (wort) เวิร์ทจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการทำเบียร์ในขั้นตอนต่อไป ส่วนที่เหลือจากการกรอง เป็นของแข็งที่ไม่ละลายน้ำประกอบด้วยแกลบข้าวบาร์เลย์ ชิ้นส่วนเศษเล็กๆของเปลือก เอนโดสเปิร์มและสารตกค้างอื่นๆ ที่ไม่ได้เปลี่ยนเป็นน้ำตาล (Lynch, Steffen & Arendt 2016; & Vieira et al., 2013) ซึ่งเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากถึงร้อยละ85 ของผลิตภัณฑ์พลอยได้ทั้งหมด (Mussatto, 2014; Xiros & Christakopoulos, 2012) และโดยส่วนใหญ่จะถูกใช้ไปเป็นอาหารสัตว์ซึ่งมีมูลค่าทางการตลาดที่ค่อนข้างต่ำ

องค์ประกอบหลักของกากมอลต์หรือกากเบียร์ ประกอบด้วยเส้นใยร้อยละ 30-50 โดยน้ำหนัก และโปรตีนร้อยละ 19-30 โดยน้ำหนัก (Mussatto, 2014) นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบอื่นที่กำลังได้รับความสนใจ คือ อะลาบีโนไซแลน (arabinoxylans) โปรตีนไฮโดรไลเสทและสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งเป็นสารที่มีประโยชน์

จากรายงานการศึกษาการสกัดสารจากกากมอลต์ พบสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ (Meneses, Martins, Teixeira & Mussatto, 2013) โดยจากการศึกษาของ Meneses et al. (2013) ที่ได้ทำการสกัดกากมอลต์ด้วยตัวทำละลายหลายชนิดที่แตกต่างกัน คือ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เฮกเซน เอทิลอะซิเตท น้ำ สกัดด้วยวิธีในความร้อนบน water bath และกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบหาองค์ประกอบของสารสกัด คือ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด, ฟลาโวนอยด์, โปรตีน และน้ำตาลรีดิวซ์ หาสารต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) พบว่าสารสกัดทั้งหมดมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ แต่สารสกัดจากอะซิโตน 60 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (9.90 ± 0.41 mg GAE/g BSG) และสารต้านอนุมูลอิสระทั้ง DPPH (18.53 ± 0.95 % inhibition) และ FRAP (4.15 ± 0.24 mM FE(II)/g BSG) มากที่สุดเมื่อเทียบกับตัวทำละลายอื่นๆ

โปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากมอลต์ ประกอบด้วยกรดอะมิโนไลซีนเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์เพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวและเส้นผม (Hadmed & Castillo, 2015) จาก

การศึกษาของ Yu et al. (2020) ศึกษาการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากมอลต์โดยใช้เอนไซม์และคลื่นความถี่สูง (Ultrasound) พบว่าเมื่อเพิ่มเอนไซม์ Alcalase จาก 1-20 µl g-BSG จะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 34 เป็นร้อยละ 61.6 การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนร้อยละ 69.8 โดยคลื่นเสียงความถี่สูงช่วยลดการโหลดเอนไซม์ได้ร้อยละ 73 และลดระยะเวลาการบ่มได้ร้อยละ 56 อีกทั้งโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 15 kDa และความสามารถในการละลายสูงที่ pH 1-11 คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยทำให้โปรตีนละลายได้เกือบร้อยละ 90 มีกรดกลูตามิกและโปรลีนเป็นกรดอะมิโนที่พบมากที่สุดหลังจากการย่อยโปรตีน

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาการสกัดสารประกอบฟีนอลิก และเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากมอลต์ซึ่งถือเป็นวัสดุเศษเหลือที่มีมูลค่าต่ำ ตลอดจนการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกากมอลต์ ซึ่งมีความน่าสนใจที่จะนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยทำการศึกษาตัวทำละลายในการสกัดสารจากกากมอลต์ ศึกษาโปรตีนไฮโดรไลเสทจากการย่อยโดยเอนไซม์ปาเปน เพื่อนำสารสกัดที่ได้ไปประยุกต์ใช้เป็นสารสำคัญในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางต่อไป

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาผลของตัวทำละลายต่อการสกัดสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากกากมอลต์
2. เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดที่ได้จากกากมอลต์
3. เพื่อเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากมอลต์โดยใช้เอนไซม์ปาเปน

ขอบเขตของการศึกษา

1. เตรียมตัวอย่างแห้งจากกากมอลต์ โดยนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนจนน้ำหนักคงที่ นำกากมอลต์อบแห้งมาเตรียมสารสกัดฟีนอลิกด้วยวิธีการแช่โดยใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกันคือ น้ำ อะซิโตน อะซิโตนร้อยละ 60 โดยปริมาตร เอทานอล และเอทานอลร้อยละ 60 โดยปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ FRAP
2. นำกากมอลต์ที่กำจัดไขมันแล้วมาเตรียมสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยเอนไซม์ปาเปน วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและหาขนาดโมเลกุลด้วย SDS-PAGE

Published Online: 2 Dec 2020

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างกากมอลต์

นำกากมอลต์ที่ได้จาก ต. ลำสมมูพุง อ. มวกเหล็ก จ. สระบุรี มาอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 ± 1 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักตัวอย่างคงที่และนำไปบดเป็นผงละเอียด จากนั้นเก็บในที่แห้งและเย็น เพื่อนำไปใช้ในการสกัด

2. การเตรียมสารสกัดจากกากมอลต์

1) การเตรียมสารสกัดฟีนอลิกจากกากมอลต์ โดยนำตัวอย่างกากมอลต์ผงละเอียดมาทำการสกัดแบบวิธีเขย่า (Conventional shaking method) ด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ น้ำ อะซิโตน อะซิโตนร้อยละ 60 โดยปริมาตร เอทานอล และเอทานอลร้อยละ 60 โดยปริมาตร โดยใช้อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวสกัดเท่ากับ 1:10 น้ำหนักต่อปริมาตร สกัดบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 125 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยชุดเครื่องกรองสุญญากาศ เก็บตัวอย่างสารสกัดไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2) การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยเอนไซม์ปาเปน โดยนำตัวอย่างกากมอลต์ที่กำจัดไขมันออกแล้วมาเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 โดยใช้อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวสกัดเท่ากับ 1:10 น้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นเติมเอนไซม์ปาเปนในปริมาณที่ต่างกันคือ 2,500 5,000 และ10,000 ยูนิต โดยใช้เวลาในการไฮโดรไลซ์ที่ 0, 2, 4 และ8 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยความร้อน 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นกรองด้วยชุดเครื่องกรองสุญญากาศ เก็บตัวอย่างสารสกัดไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การวิเคราะห์สารสกัด

1) การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (Folin & Ciocalteu, 1927) นำสารสกัดจากกากมอลต์มาเตรียมเป็นสารละลายด้วยตัวทำละลายเดียวกับที่ใช้สกัด จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง แล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน เติมสารละลาย Folin-ciocalteu reagent และโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/VIS spectrophotometer คำนวณหาปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดกากมอลต์ในรูปมิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม (mg GAE/g extract)

2) การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminum chloride (Meneses et al., 2013) นำสารสกัดจากกากมอลต์ มาเตรียมเป็นสารละลายด้วยตัวทำละลายเดียวกับที่ใช้สกัด จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง ผสมกับน้ำปราศจากไอออน เติมโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้นร้อยละ 5 และอะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ตามลำดับ แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น

เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 4 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร แล้วตั้งทิ้งไว้ 8 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/VIS spectrophotometer นำค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดมาคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดกากมอลต์ในรูปมิลลิกรัมสมมูลเควอเซทินต่อสารสกัด 1 กรัม (mg QE/g extract)

3) การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (Bradford, 1996) นำสารสกัดจากกากมอลต์ มาเตรียมเป็นสารละลายด้วยตัวทำละลายเดียวกับที่ใช้สกัด จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง ผสมกับน้ำและแบรดฟอร์ด รีเอเจน ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV/VIS spectrophotometer คำนวณปริมาณโปรตีนของสารสกัดกากมอลต์ด้วยกราฟของสารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin

4) การวิเคราะห์ขนาดโปรตีนด้วย SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล ที่ประกอบด้วย separating gel ความเข้มข้นร้อยละ 12 น้ำหนักต่อปริมาตร และ stacking gel ความเข้มข้นร้อยละ 4 น้ำหนักต่อปริมาตร โดยมี 0.125 M Tris-Glycine เป็น running buffer จากนั้นเตรียมตัวอย่างโปรตีนโดยผสมกับ loading buffer ในอัตราส่วน 1:1 ให้แต่ละตัวอย่างมีปริมาณโปรตีนความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม เติมตัวอย่างโปรตีนที่ต้องการทดสอบหาขนาด ปริมาตร 10 ไมโครกรัม โดยทำพร้อมกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาดโมเลกุล ต่อขั้วไฟฟ้าของชุดทดสอบเข้ากับหม้อแปลงไฟฟ้ากระแสตรงปรับให้มีกระแสไฟฟ้าประมาณ 120 โวลต์ เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง นำเจลออกจากชุดทดสอบโดยค่อยๆ ลอกเนื้อเจลออกจากแม่แบบ และนำไปย้อมด้วยชุดสีย้อม Coomassie Brilliant Blue G-250 เป็นเวลา 30-45 นาที จากนั้นนำเจลที่ผ่านการย้อมแล้วมาล้างด้วยสารละลาย de-staining เป็นเวลา 30 นาที และตรวจสอบความบริสุทธิ์และขนาดของโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (10-254 kDa)

5) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ก. วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกากมอลต์ด้วยวิธี ABTS ดัดแปลงจากวิธีของ Arnao et al. (2001) นำสารสกัดกากมอลต์ มาเตรียมเป็นสารละลายด้วยตัวทำละลายเดียวกับที่ใช้สกัด จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง ผสมกับสารละลายABTS และฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ด้วยเครื่อง UV/VIS spectrophotometer นำมาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS (% Inhibition) ของสารสกัด เพื่อคำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกากมอลต์ในรูปมิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อสารสกัด 1 กรัม (mg TEAC/g extract)

ข. วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกากมอลต์ด้วยวิธี FRAP (Benzie & Strain, 1996) นำสารสกัดกากมอลต์ มาเตรียมเป็นสารละลายด้วยตัวทำละลายเดียวกับที่ใช้สกัด จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง ผสมกับ FRAP solution และอะซิเตท บัฟเฟอร์ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ด้วยเครื่อง UV/VIS spectrophotometer แล้วนำมาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ FRAP (% Inhibition) ของสารสกัด เพื่อคำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกากมอลต์ในรูปมิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อสารสกัด 1 กรัม (mg TEAC/g extract)

ผลวิจัยและอภิปรายผล

1. การเตรียมสารสกัดฟีนอลิกจากกากมอลต์

สารสกัดกากมอลต์ที่ได้ มีลักษณะเหนียวหนืด และมีสีน้ำตาลเข้ม ยกเว้นสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำเป็นตัวทำละลายจะมีสีน้ำตาลอ่อนกว่าสารที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น ทั้งนี้เป็นเพราะน้ำเป็นตัวทำลายที่มีขั้วจึงทำให้สารที่ละลายได้เท่านั้นที่ละลายออกมาได้ จากการคำนวณร้อยละผลผลิตพบว่า สารสกัดกากมอลต์ที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 60 โดยปริมาตร และอะซิโตนร้อยละ 60 โดยปริมาตร พบว่า มีร้อยละผลผลิตที่มากกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 13.46 ± 1.10 และ 12.00 ± 0.83 ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 ซึ่งปริมาณผลผลิตที่ได้จากตัวอย่างทั้งสองนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ทั้งนี้เนื่องจากตัวทำละลายทั้งสองชนิด เป็นตัวทำละลายที่ผสมกันระหว่างตัวทำละลายมีขั้วสูง (น้ำ) และตัวทำละลายขั้วต่ำกว่า (เอทานอล และอะซิโตน) จึงทำให้สารจากกากมอลต์ละลายออกมาได้ในปริมาณที่มากกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น

ตารางที่ 1 ร้อยละผลผลิตของสารสกัดกากมอลต์ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

ตัวทำละลาย	ลักษณะสารสกัด	ร้อยละผลผลิต
น้ำ	เหนียวหนืด สีน้ำตาลอ่อน	8.68 ± 0.40^{c}
เอทานอล	เหนียวหนืด สีน้ำตาลเข้ม	8.17 ± 0.09^{c}
เอทานอลร้อยละ 60	เหนียวหนืด สีน้ำตาลเข้ม	13.46 ± 1.10^{a}
อะซิโตน	เหนียวหนืด สีน้ำตาลเข้ม	9.88 ± 1.76^{bc}
อะซิโตนร้อยละ 60	เหนียวหนืด สีน้ำตาลเข้ม	12.00 ± 0.83^{ab}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

2. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์

สารสกัดกากมอลต์ที่สกัดด้วยอะซิโตนร้อยละ 60 โดยปริมาตร ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์สูงที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 8.01 ± 0.29 มก.สมมูลกรดแกลลิก/สารสกัด 1กรัม และ 2.63 ± 0.04 มก.สมมูลเคอร์เซทิน/สารสกัด 1 กรัม ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 ผลที่ได้จากการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Zuorro, Iannone & Lavecchia. (2019) ซึ่งได้ทำการสกัดกากมอลต์ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างน้ำกับอะซิโตน และน้ำกับเอทานอล ที่ความเข้มข้นต่างกัน ด้วยวิธีให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่า สารสกัดกากมอลต์ที่ได้จากการสกัดด้วยอะซิโตนร้อยละ 60 ปริมาตรต่อปริมาตร จะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 0.16 ± 0.005 มก.สมมูลกรดแกลลิก/สารสกัด 1 กรัม

ตารางที่ 2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ในสารสกัดกากมอลต์ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

ตัวทำละลาย	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g extract)	สารประกอบฟลาโวนอยด์ (mg QE/g extract)
น้ำ	6.52 ± 0.30^{c}	1.57 ± 0.04^{c}
เอทานอล	N/D	N/D
เอทานอลร้อยละ 60	7.17 ± 0.09^{b}	1.90 ± 0.03^{b}
อะซิโตน	N/D	N/D
อะซิโตนร้อยละ 60	8.01 ± 0.29^{a}	2.63 ± 0.04^{a}

หมายเหตุ 1. N/D หมายถึง ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในช่วงทดสอบ

2. ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ภายในวิธีทดสอบเดียวกัน

3. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกากมอลต์

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกากมอลต์โดยใช้การทดสอบ 2 วิธี ซึ่งได้แก่ วิธี ABTS และวิธี FRAP พบว่าสารสกัดกากมอลต์ที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 60 โดยปริมาตร ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเท่ากับ 1.09 ± 0.02 มก.สมมูลโทลอกซ์/สารสกัด 1 กรัม เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ดังตารางที่ 3 สารสกัดจากกากมอลต์จากตัวทำละลายอื่นๆให้ปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่น้อย และวิธี FRAP พบว่าสารสกัดจากกากมอลต์ที่สกัดด้วยตัวทำ

ละลายอะซิโตนร้อยละ 60 โดยปริมาตร ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เท่ากับ 5.81 ± 0.47 มก. สมมูลโทลอกซ์/สารสกัด 1 กรัม และพบว่าสารสกัดจากกากมอลต์ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำ และเอทานอลร้อยละ 60 โดยปริมาตร ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) เท่ากับ 3.93 ± 0.02 และ 3.57 ± 0.13 มก.สมมูลโทลอกซ์/สารสกัด 1 กรัม ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Meneses et al., (2013) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกากมอลต์ด้วยตัวทำละลายหลายชนิดที่แตกต่างกัน คือ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เฮกเซน เอทิลอะซิเตท น้ำ ด้วยวิธี DPPH และ FRAP การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดจากกากมอลต์ที่สกัดด้วยอะซิโตนร้อยละ 80 โดยปริมาตร และอะซิโตนร้อยละ 60 โดยปริมาตร ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) เท่ากับ 20.55 ± 1.53 และ 18.53 ± 0.95 เปอร์เซ็นการยับยั้ง ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกากมอลต์ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

ตัวทำละลาย	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	
	วิธี ABTS (mg TEAC/g extract)	วิธี FRAP (mg TEAC/g extract)
น้ำ	0.10 ± 0.00^{e}	3.93 ± 0.02^{b}
เอทานอล	0.51 ± 0.00^{c}	N/D
เอทานอลร้อยละ 60	1.09 ± 0.02^{a}	3.57 ± 0.13^{b}
อะซิโตน	0.40 ± 0.00^{d}	N/D
อะซิโตนร้อยละ 60	0.67 ± 0.02^{b}	5.81 ± 0.47^{a}

หมายเหตุ 1. N/D หมายถึง ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในช่วงทดสอบ

2. ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ภายในวิธีทดสอบเดียวกัน

4. การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากมอลต์ด้วยเอนไซม์ปาเปน

นำกากมอลต์ที่กำจัดไขมันแล้วมาเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสท โดยการนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนในปริมาณที่แตกต่างกัน (2,500 5,000 และ10,000 ยูนิต) เป็นระยะเวลานาน 2, 4 และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์ปาเปนทำหน้าที่ตัดพันธะเปปไทด์ (Peptide bond) ทำให้ได้

เปปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระ (Severin & Xia, 2006) ลักษณะกากมอลต์ที่ได้ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนแล้วพบว่า มีลักษณะเหนียวหนืด และมีสีน้ำตาลเข้ม

5. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนวิธี Bradford

เมื่อกากมอลต์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนในปริมาณ 5,000 ยูนิต เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง ได้ให้ปริมาณโปรตีนสูงสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 497.49 ± 4.63 มก.โปรตีน/สารสกัด 1 กรัม ในขณะที่กากมอลต์ที่ไม่ได้ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน จะมีปริมาณโปรตีนทั้งหมดท่ากับ 123.76 ± 2.43 มก. โปรตีน/สารสกัด 1 กรัม ผลจากการทดลองที่ได้ยังบ่งชี้ว่า เมื่อใช้ระยะเวลาในการย่อยกากมอลต์เพิ่มมากขึ้น ปริมาณโปรตีนที่ได้ก็เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วยในขณะที่ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม คือ 5,000 ยูนิต ในเวลา 8 ชั่วโมงสามารถให้ปริมาณโปรตีนได้มากกว่าการใช้เอนไซม์ 10,000 ยูนิต ดังตารางที่ 4

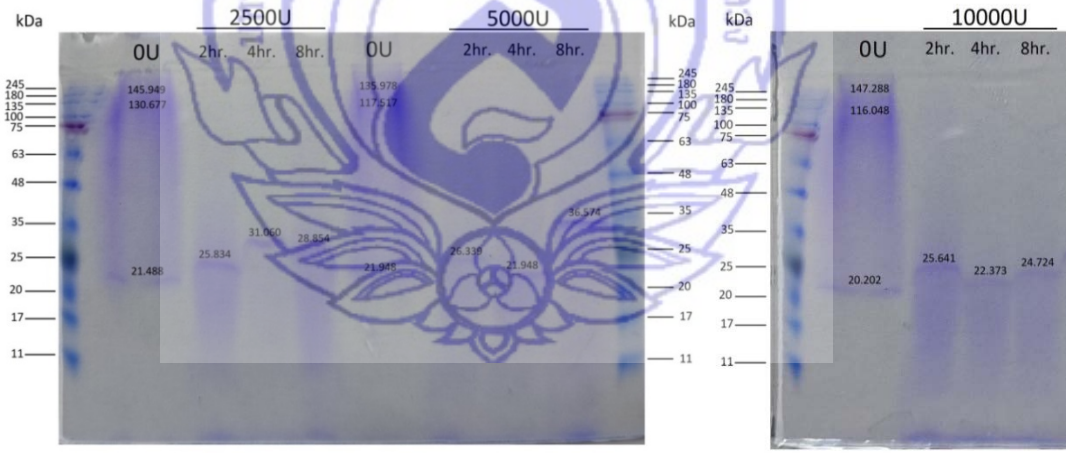
ตารางที่ 4 ปริมาณโปรตีนในสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากมอลต์ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน

ปริมาณเอนไซม์ (ยูนิต)	**ระยะเวลา (ชั่วโมง)**	**ปริมาณโปรตีน (mg Protein/g extract)**
0	0	123.76 ± 2.43^{I}
2,500	2	329.78 ± 5.39^{cF}
	4	360.92 ± 8.16^{bD}
	8	408.88 ± 4.16^{aC}
5,000	2	200.87 ± 3.92^{cH}
	4	326.00 ± 2.76^{bF}
	8	497.49 ± 4.63^{aA}
10,000	2	257.90 ± 6.39^{cG}
	4	342.40 ± 3.53^{bE}
	8	461.37 ± 10.91^{aB}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กและตัวใหญ่ที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบในปริมาณเอนไซม์ที่เท่ากันและเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างทุกชนิดตามลำดับ

6. การวิเคราะห์ขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

การวิเคราะห์ขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE หรือ Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลและรูปแบบของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากมอลต์ จากผลการวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างโปรตีนจากกากมอลลต์ที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนจะให้แถบโปรตีนบนแผ่นเจล ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเด่นชัด 3 ขนาดคือ ประมาณ 145.9, 130.7 และ 21.5 กิโลดาลตัน (kDa) ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน จะให้แถบโปรตีนบนแผ่นเจลเด่นชัดเพียงแถบเดียว ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 21 - 37 kDa สาเหตุที่ขนาดของโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสทมีขนาดเล็กลง เป็นผลมาจากการที่เอนไซม์ปาเปนไปย่อยพันธะเปปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีนที่ได้เตรียมจากกากมอลต์ จึงทำให้ได้โปรตีนที่มีขนาดเล็กลง และเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ปาเปนและระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยเพิ่มขึ้น พบว่าไม่มีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากมอลต์ ทำให้แถบโปรตีนที่ปรากฏบนแผ่นเจล ซึ่งมีตำแหน่งที่ใกล้เคียงกัน ดังภาพที่ 1 และจากการศึกษาของ Yu et al. (2020) ที่ได้เตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากมอลต์ โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase ร่วมกับการใช้เทคนิคอัลตร้าโซนิเคชั่น (Ultrasonication) พบว่า วิธีการนี้สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกโปรตีนออกจากกากมอลต์ได้เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสามารถช่วยลดต้นทุนการในผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากมอลต์ในเชิงอุตสาหกรรมได้ และเมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเสทดังกล่าวนี้ไปวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าโปรตีนที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลที่น้อยกว่า 15 kDa



ภาพที่ 1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลและรูปแบบของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากมอลต์ด้วยวิธี SDS-PAGE

Published Online: 2 Dec 2020

สรุปผลการวิจัย

การเตรียมสารสกัดฟีนอลิกจากกากมอลต์ โดยใช้ตัวทำละลาย คือ น้ำ เอทานอล เอทานอลร้อยละ 60 โดยปริมาตร อะซิโตน และอะซิโตนร้อยละ 60 โดยปริมาตร พบว่าสารสกัดจากกากมอลต์ที่ได้มีลักษณะเหนียวหนืด สีน้ำตาล ร้อยละผลผลิตของสารสกัดกากมอลต์ที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 60 โดยปริมาตร และอะซิโตนร้อยละ 60 โดยปริมาตร ให้ร้อยละผลผลิตที่สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 13.46 ± 1.10 และ 12.00 ± 0.83 ตามลำดับ ($p \leq 0.05$) เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโนวอยด์ของสารสกัดจากกากมอลต์ พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วย อะซิโตนความเข้มข้นร้อยละ 60 ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุดเท่ากับ 8.01 ± 0.29 มก.สมมูลกรดแกลลิก/สารสกัด 1 กรัม และปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุดเท่ากับ 2.63 ± 0.04 มก. สมมูลเคอร์เซทิน/สารสกัด 1 กรัม การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 60 ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเท่ากับ 1.09 ± 0.02 มก. สมมูลโทรลอกซ์ต่อสารสกัด 1 กรัม ขณะที่การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดที่สกัดด้วยอะซิโตนความเข้มข้นร้อยละ 60 ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเท่ากับ 5.81 ± 0.47 มก. สมมูลโทรลอกซ์ต่อสารสกัด 1 กรัม

การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากมอลต์โดยย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนที่ปริมาณ 2,500 5,000 และ 10,000 ยูนิต เป็นเวลา 2, 4 และ 8 ชั่วโมง พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยมีลักษณะเหนียวหนืด สีน้ำตาล เมื่อนำไปหาปริมาณโปรตีน พบว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากมอลต์ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนมีปริมาณโปรตีนในช่วง 200.87 ± 3.92 - 497.49 ± 4.63 มิลลิกรัมโปรตีนต่อสารสกัด 1 กรัม ซึ่งมีปริมาณมากกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อย (123.76 ± 2.43 มิลลิกรัมโปรตีนต่อสารสกัด 1 กรัม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อนำไปวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE เพื่อดูขนาดโมเลกุลโปรตีนที่ถูกย่อย พบว่าโปรตีนจากกากมอลต์ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนแสดงแถบโมเลกุลที่ช่วง 21.948-36.574 กิโลดาลตัน ซึ่งมีขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับสารสกัดที่ไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน และพบแถบโมเลกุลขนาดน้อยกว่า 11 กิโลดาลตัน ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากมอลต์ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนมีขนาดเล็กลงโดยมีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ระดับโพลีเปปไทด์เปปไทด์จนถึงเปปไทด์ขนาดเล็ก

ข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากกากมอลต์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในปริมาณที่น้อยจึงควรศึกษาวิธีที่เหมาะสมกว่านี้เพื่อนำสารสกัดไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้

2. จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสารสกัดจากกากมอลต์ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน พบประโยชน์ที่สามารถนำไปใช้ในเครื่องสำอาง อย่างไรก็ตามควรศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเพิ่มเติม

รายการอ้างอิง

Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food chemistry*, *73*(2), 239-244.

Benzie, I. F. & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, *239*(1), 70-76.

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248-254.

Folin, O. & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *73*(2), 627-650.

Husein el Hadmed, H. & Castillo, R. F. (2016). Cosmeceuticals: peptides, proteins, and growth factors. *Journal of Cosmetic Dermatology*, *15*(4), 514-519.

Meneses, N. G., Martins, S., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2013). Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology*, *108*, 152-158.

Mussatto, S. I. (2014). Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(7), 1264-1275.

Severin, S. & Xia, W. S. (2006). Enzymatic hydrolysis of whey proteins by two different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*, *30*(1), 77-97.

Yu, D., Sun, Y., Wang, W., O'Keefe, S. F., . . . Huang, H. (2020). Recovery of protein hydrolysates from brewer's spent grain using enzyme and ultrasonication. *International Journal of Food Science & Technology*, *55*(1), 357-368.

Xiros, C. & Christakopoulos, P. (2012). Biotechnological potential of brewers spent grain and its recent applications. *Waste and Biomass Valorization*, *3*(2), 213-232.

Zuorro, A., Iannone, A., & Lavecchia, R. (2019). Water-organic solvent extraction of phenolic antioxidants from brewers' spent grain. *Processes*, *7*(3), 126.