Published Online: 14 OCT 2026

การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซทจากข้าวกล้องสังข์หยดด้วยเอนไซม์โบรมิเลน

Preparation of Protein Hydrolysates from Sang Yod Brown Rice Catalyzed by Bromelain Enzyme

หนึ่งฤทัย เคนดา

อีเมล: 6551701281@lamduan.mfu.ac.th

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สริตา สังข์ทอง

อีเมล: sarita.san@mfu.ac.th

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซทจากข้าวกล้องสังข์หยดด้วยเอนไซม์โบรมิเลน ผ่านกระบวนการสกัด 2 วิธี ได้แก่ การสกัดด้วยเอนไซม์โบรมิเลน และการสกัดด่างกับเอนไซม์โบรมิเลน โดยแปรความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ร้อยละ 0, 5, 10 และ 15 และระยะเวลาในการไฮโดรไลซ์ที่ 0, 3 และ 6 ชั่วโมง จากผลการศึกษาพบว่าการสกัดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 เวลาไฮโดรไลซ์ 6 ชั่วโมง ให้ร้อยละผลผลิตสูงสุด เท่ากับ 39.30 ± 1.31 เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมทั้งหมดด้วยวิธี Bradford assay พบว่า การสกัดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 เวลาไฮโดรไลซ์ 3 ชั่วโมง มีค่าปริมาณโปรตีนสูงสุด เท่ากับ 22.77 ± 0.13 มิลลิกรัม BSA/กรัมสารสกัด ขณะที่การสกัดด้วยด่างและเอนไซม์โบรมิเลนที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 เวลาไฮโดรไลซ์ 3 ชั่วโมง มีค่าปริมาณโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 21.98 ± 0.12 มิลลิกรัม BSA/กรัมสารสกัด การวิเคราะห์น้ำหนักมวลโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าเมื่อถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์โบรมิเลนทำให้มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10, 15, 20, 25, 28, 30 และ 35 kDa เมื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ assay แสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดด้วยด่างกับเอนไซม์โบรมิเลน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 เวลาไฮโดรไลซ์ 6 ชั่วโมง ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 43.33 ± 0.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการศึกษานี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการคัดเลือกสภาวะการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซทเพื่อพัฒนาต่อยอดเป็นวัตถุดิบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสำหรับประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและเวชสำอางในอนาคต

คำสำคัญ: ข้าวกล้องสังข์หยด, โปรตีนไฮโดรไลเซท, เอนไซม์โบมิเลน, การสกัดด้วยด่าง, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

This study aimed to investigate the preparation of protein hydrolysates from Sang Yod brown rice using two extraction methods: bromelain-assisted extraction and alkaline extraction followed by bromelain hydrolysis. Both methods were investigated at varying enzyme concentrations (0, 5, 10, and 15%) and hydrolysis times (0, 3, and 6 h). The results showed that bromelain-assisted extraction at an enzyme concentration of 15% and a hydrolysis time of 6 h produced the highest yield of 39.30 ± 1.31%. Total protein content, determined using the Bradford assay, was highest at 22.77 ± 0.13 mg BSA/g extract for bromelain-assisted extraction at an enzyme concentration of 10% and a hydrolysis time of 3 h. In comparison, alkaline extraction followed by bromelain hydrolysis at an enzyme concentration of 15% and a hydrolysis time of 3 h resulted in the highest protein content of 21.98 ± 0.12 mg BSA/g extract for this method. Molecular weight analysis using SDS-PAGE revealed protein bands with approximate molecular weights of 10, 15, 20, 25, 28, 30, and 35 kDa following bromelain hydrolysis. Antioxidant activity, evaluated using the $ABTS^{\bullet+}$ radical scavenging assay, was highest in the hydrolysate obtained through alkaline extraction followed by bromelain hydrolysis at an enzyme concentration of 15% and a hydrolysis time of 6 h, with an IC_{50} value of 43.33 ± 0.58 µg/mL. These findings provide a basis for selecting suitable conditions for the preparation of protein hydrolysates and their further development as antioxidant ingredients for potential applications in cosmetic and cosmeceutical products.

Keywords Sang Yod Brown Rice Protein Hydrolysate Bromelain Enzyme Alkaline Extraction Antioxidant activity

บทนำ/หลักการและเหตุผล

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของโลกรวมถึงประเทศไทย ข้าวส่วนใหญ่ที่นำมาบริโภคเป็นข้าวขาวหรือข้าวขัดสี ประกอบด้วยส่วนเอนโดสเปริ์ม ซึ่งมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลัก แต่สารอาหารและสารสำคัญอื่น ๆ น้อยกว่าข้าวกล้อง ข้าวกล้อง คือ ข้าวที่ผ่านการ

กะเทาะเปลือกออก (แกลบ) แต่ไม่ได้ผ่านการขัดสี โดยยังมีส่วนของจมูกข้าวและเยื่อหุ้มเมล็ด (รำข้าว) เหลืออยู่ ทำให้มีคุณค่าทางโภชนาการและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในปริมาณสูง เช่น เส้นใย แร่ธาตุ วิตามิน กาบา (γ-Amino Butyric Acid, GABA) และยังมีปริมาณโปรตีนสูงร้อยละ 15-20 นอกจากนี้โปรตีนจากข้าวเป็นโปรตีนพืชที่ไม่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ จึงเป็นอีกแหล่งโปรตีนจากพืชที่มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นสารที่มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่และการพัฒนาเป็นเปปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สำหรับอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อาหาร และเภสัชกรรม (Roy et al., 2023)

ข้าวสังข์หยด (Sang Yod Rice) เป็นข้าวพื้นเมืองที่ปลูกเฉพาะทางภาคใต้ของไทย ซึ่งเป็นข้าวที่ถูกประกาศให้เป็น สินค้าบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ หรือ ข้าว GI ข้าวสังข์หยดมีลักษณะเด่น คือ เมล็ดข้าวมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวปนแดงอ่อน ๆ จนถึงแดงเข้ม เมล็ดเรียวเล็ก ท้ายงอน มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยมีกากใย โปรตีน ฟอสฟอรัส ธาตุเหล็ก มีวิตามิน B1, B2, B3 และยังมีสารกลุ่มต้านอนุมูลอิสระพวก แกมมา-โอรีซานอล ซึ่งช่วยในการชะลอความแก่ (อมรรัตน์ ถนนแก้ว, 2552) นอกจากนี้ อุไรวรรณ วัฒนกุล และคณะ (2559) รายงานว่าข้าวสังข์หยดมีสารประกอบฟีนอลิก แอนโทไซยานิน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จึงทำให้เป็นวัตถุดิบทางการเกษตรที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาโปรตีนจากข้าวและการเพิ่มมูลค่าในรูปของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

โปรตีนไฮโดรไลเซท เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายพันธะเพปไทด์ของโปรตีนให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง เกิดเป็นเปปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งอาจส่งผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพ-ทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีน การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์เป็นวิธีที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากสามารถควบคุมสภาวะการย่อยได้และมีความจำเพาะต่อพันธะเปปไทด์ โดยเอนไซม์โบรมิเลน (Bromelain) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอสที่สามารถย่อยโปรตีนให้เป็นเปปไทด์ขนาดเล็กได้ (Tacias-Pascacio et al., 2023) มีรายงานข้าวกล้องหอมมะลิ 105 ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนทำให้เปปไทด์มีขนาดเล็กและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Selamassakul et al., 2020) Chen et al. (2020, 2021) ศึกษาคุณสมบัติโปรตีนไฮโดรไลเซทจากข้าวด้วยจากการย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่ามีฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส และนอกจากนี้การสกัดด้วยด่างเป็นการทำให้โปรตีนละลายที่ค่า pH สูงมากกว่า 10 สภาวะที่เป็นด่างนี้จะช่วยทำลายพันธะไดซัลไฟด์, พันธะเอไมด์ และพันธะไฮโดรเจน ของโปรตีน ซึ่งส่งผลให้การสกัดโปรตีนมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นและช่วยเพิ่มผลผลิตของการสกัดได้ (Roy et al., 2023) กรรณานุช ศรีกอก (2555) ศึกษาการสกัดโปรตีนจากรำข้าวสังข์หยดเมืองพัทลุงที่ผ่านการสกัดน้ำมันโดยใช้สารละลายด่าง พบว่าโปรตีนที่สกัดได้มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ เช่น ความสามารถในการละลาย การเกิดโฟม และการเกิดอิมัลชัน และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่นำมาทบทวนยังไม่เพียงพอที่จะอธิบายผลของการเปรียบเทียบวิธีการสกัด ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์และ

ระยะเวลาไฮโดรไลซ์ที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะผลต่อปริมาณร้อยละผลผลิต ปริมาณโปรตีน การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงศึกษาการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซทจากข้าวกล้องสังข์หยดด้วยเอนไซม์โบรมิเลน โดยเปรียบเทียบ 2 วิธี คือ การสกัดด้วยเอนไซม์โบมิเลนเพียง และการสกัดด้วยด่างร่วมกับเอนไซม์โบมิเลน ที่ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 0, 5, 10 และ 15 และเวลาไฮโดรไลซ์ 0, 3 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นประเมินผลผลิต ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford การกระจายน้ำหนักโมเลกุลด้วย SDS-PAGE และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS การศึกษานี้มีความสำคัญ เพราะคาดว่าจะได้สภาวะที่เหมาะสมและแนวทางเลือกวิธีเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซท เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

1. การเตรียมข้าวกล้องสังข์หยด

การเตรียมข้าวกล้องสังข์หยดดัดแปลงจาก Chen et al. (2021) นำเมล็ดข้าวกล้องสังข์หยดที่สมบูรณ์โดยที่ไม่มีรอยแหว่งของเมล็ด จากนั้นนำมาบดด้วยเครื่องลดขนาดและร่อนผ่านตะแกรง 60 เมช และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การไฮโดรไลซ์โปรตีนไฮโดรไลเซทจากข้าวกล้องสังข์หยดด้วยเอนไซม์โบรมิเลน

ดัดแปลงวิธีจาก Selamassakul et al. (2016, 2020) โดยนำผงข้าวตัวอย่าง 10 กรัม ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.8) ในอัตราส่วน 1:10 (กรัมต่อมิลลิลิตร) นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์โบรมิเลน (2500 GDU/g , K-MUCH Industry Company Limited) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 5, 10 และ 15 (น้ำหนักเอนไซม์ต่อน้ำหนักผงข้าว) ควบคุมเวลาในการไฮโดรไลซ์ที่ 0, 3 และ 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยความร้อนที่ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที กรองสารละลายส่วนใสด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ภายใต้สภาวะสุญญากาศ จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง (Freeze Drying) เพื่อเตรียมวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีต่อไป

3. การไฮโดรไลซ์โปรตีนไฮโดรไลเซทจากข้าวกล้องสังข์หยดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนด่างกับเอนไซม์โบรมิเลน

ดัดแปลงวิธีจาก Meza et al. (2024), Selamassakul et al. (2020) และพัสตราภรณ์ ทองอิ่มพงษ์ และคณะ (2559) นำผงข้าวตัวอย่าง 500 กรัม สกัดด้วยสารละลาย 0.1 N NaOH ในอัตราส่วน 1:10 (ร้อยละน้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับ pH ให้เท่ากับ 10 ด้วย 1.0 N HCl กวนด้วยเครื่อง Overhead Stirrer ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 rpm

เป็นเวลา 15–20 นาที นำส่วนใสมาตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก (pI) โดยปรับ pH เป็น 4.5 ด้วย 1.0 N HCl แช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนมาปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย 1 N NaOH แล้วอบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำโปรตีนไอโซเลทที่เตรียมได้ จำนวน 2 กรัม มาย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 5, 10 และ 15 (น้ำหนักเอนไซม์ต่อน้ำหนักโปรตีนไอไซเลท) ควบคุมเวลาในการไฮโดรไลซ์ที่ 0, 3 และ 6 ชั่วโมง (ดำเนินการต่อตามขั้นตอนเช่นเดียวกันกับข้อ 2)

4. ปริมาณร้อยละผลผลิต (%yield)

วิเคราะห์ปริมาณร้อยละผลผลิตโดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มาทำแห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer มาชั่งน้ำหนักและคำนวณร้อยละผลผลิตจากไฮโดรไลเซทและโปรตีนไอโซเลตที่ได้เทียบกับน้ำหนักผงข้าวเริ่มต้นตามสูตร

$$\text{ปริมาณร้อยละผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักโปรตีนไฮโดรไลเซท}}{\text{น้ำหนักผงข้าวเริ่มต้น}} \times 100$$

5. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด โดยวิธี Bradford protein assay (Bradford, 1976) เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Standard protein) โดยใช้ BSA (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 1 mg/ml และเตรียมสารละลาย Bradford reagent ด้วยสาร Coomassie Brilliant Blue G-250 ปริมาตร 0.10 กรัม ละลายในเอทานอล 95% เติมสารละลายกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) 85% แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้ครบ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นทำการละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทปริมารตร 20 mg/ml แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 300 เติมสารละลาย Bradford reagent ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer) แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณปริมาณโปรตีนเทียบกับกราฟมาตรฐาน (BSA Standard curve)

6. การวิเคราะห์ขนาดโปรตีนด้วย SDS-PAGE

การวิเคราะห์ขนาดโปรตีนด้วย Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel Electrophoresis (SDS-PAGE) โดยดัดแปลงวิธีจาก (Chen et al., 2021; Pantoa et al., 2020; Xia et al., 2012) เตรียมโพ-ลีอะคริลาไมด์เจล ที่ประกอบด้วย Separating gel ความเข้มข้น 12% และ stacking gel ความเข้มข้น 4% คำนวณหาปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทก่อนนำมาผสมกับ loading buffer ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงและทำการโหลดตัวอย่างโปรตีนลง well ปริมาณ 5 µg ควบคู่กับโปรตีนมาตรฐาน (Protein marker) และรันโปรตีน (Run Protein) ใน running buffer ใช้กระแสไฟ 120 V เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วยสี

ย้อม Coomassie Brilliant Blue G-250 ความเข้มข้น 0.1% และล้างสีย้อมด้วย de-staining เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง นำเจลที่ได้ทำการบันทึกภาพและเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

7. การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS โดยใช้สาร 2, 2'-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic ($ABTS^{+\bullet}$) โดยดัดแปลงวิธีจาก (Selamassakul et al., 2020; Chen et al., 2021) เตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7mM ผสมกับสารละลาย 2.45 mM โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) บ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 จนสามารถวัดค่าดูดกลืนแสงได้ในช่วง 0.700-0.800 ± 0.030 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ปิเปตสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มาทำการเจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในปริมาตรที่กำหนดผสมกับสารละลายอนุมูล $ABTS^{+\bullet}$ ลงใน 96-well microplate ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 เป็นสารละลาย Blank คำนวณปริมาตรการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{+\bullet}$ ดังสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \left(\frac{A_{Control} - A_{Sample}}{A_{Control}} \right) \times 100$$

โดยที่ $A_{Control}$ = ค่าดูดกลืนแสงของ control (ฟอตเฟสบัฟเฟอร์ pH 7.4 + $ABTS^{+\bullet}$)

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (ตัวอย่าง + $ABTS^{+\bullet}$)

ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดังสมการและคำนวณหาค่า IC_{50} และแสดงผลในรูปค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D)

8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลปริมาณร้อยละผลผลิต (%yield) ปริมาณโปรตีนรวม (Total Protein Content) และประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ ANOVA ร่วมกับวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ($p < 0.05$) โดยโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statics version 29

ผลวิจัยและอภิปรายผล (Results and Discussion)

1. ลักษณะกายภาพของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทจากข้าวกล้องสังข์หยดในรูปแบบแห้ง

จากการศึกษาลักษณะกายภาพของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากข้าวกล้องสังข์หยดผ่านเทคนิคการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze-dried) พบว่า ผงโปรตีนที่สกัดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนอย่างเดียวในทุกสภาวะมีลักษณะเป็นเกล็ดสีครีมอ่อนอมเหลือง ขณะกลุ่มที่สกัดด้วยด่างกับเอนไซม์โบรมิเลนทุก

สภาวะมีลักษณะเป็นเกล็ดสีน้ำตาลอ่อนอมเหลือง นอกจากนี้ การสกัดด้วยด่างก่อนย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนจะให้ผงโปรตีนไอโซเลตที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีน้ำตาลแดง (ภาพที่ 1)

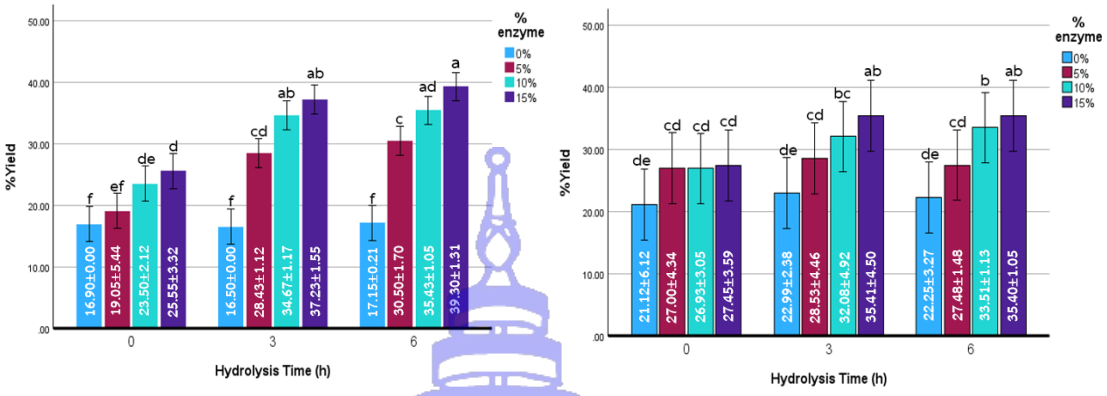


ก ข ค

ภาพที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทจากข้าวกล้องสังข์หยด (ก) สารสกัดด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (ข) สารสกัดด้วยด่างและเอนไซม์โบรมิเลน (ค) ผงโปรตีนไอโซเลตจากการสกัดด่างก่อนนำมาย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน

2. ปริมาณร้อยละผลผลิตของโปรตีนไฮโดรไลเซท

จากการศึกษาการสารสกัดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนพบว่า การใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 15 ที่เวลาไฮโดรไลซ์ 6 ชั่วโมง มีค่าร้อยละผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 39.30 ± 1.31 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รองลงมาที่ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 15 ที่เวลาไฮโดรไลซ์ 3 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าร้อยละผลผลิตเท่ากับ 37.23 ± 1.55 ทั้งนี้ การเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาในการไฮโดรไลซ์ส่งผลให้ร้อยละผลผลิตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ee et al. (2024) พบว่าร้อยละผลผลิตมีความสัมพันธ์กับระดับการไฮโดรไลซ์ (Degree of hydrolysis; DH) เนื่องจากเอนไซม์ช่วยตัดพันธะเปปไทด์และปลดปล่อยเปปไทด์ออกมาในปริมาณที่มากขึ้นตามระยะเวลาที่นานขึ้น ดังภาพที่ 2 อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างการสกัดด้วยด่างกับการใช้เอนไซม์โบรมิเลน ที่ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 15 ที่เวลาไฮโดรไลซ์ 3 และ 6 ชั่วโมง พบว่ามีร้อยละผลผลิตเท่ากับ 35.41 ± 4.50 และ 35.40 ± 1.05 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างวิธีการสกัดทั้ง 2 วิธีการสกัด



(ก) (ข)

ภาพที่ 2 ปริมาณร้อยละผลผลิตของโปรตีนไฮโดรไลเซท (ก) การสกัดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนเพียงอย่างเดียว (ข) สกัดด้วยด่างกับเอนไซม์โบรมิเลน

3. ปริมาณโปรตีนรวมทั้งหมด

จากการศึกษาปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี Bradford protein assay พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาในการไฮโดรไลซ์ส่งผลต่อปริมาณโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การสกัดด้วยด่างร่วมกับเอนไซม์โบรมิเลนให้ปริมาณโปรตีนสูงสุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่เวลา 3 ชั่วโมง เท่ากับ 22.77 ± 0.13 มิลลิกรัม BSA/กรัมสารสกัด ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้ความเข้มข้นร้อยละ 15 ที่เวลา 3 ชั่วโมง (21.91 ± 0.30 มิลลิกรัม BSA/กรัมสารสกัด) ในขณะที่การสกัดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนอย่างเดียวพบปริมาณโปรตีนสูงสุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 ที่เวลา 3 ชั่วโมง เท่ากับ 21.98 ± 0.12 มิลลิกรัม BSA/กรัมสารสกัด (ดังตารางที่ 1) ระยะเวลา 3 ชั่วโมงถือเป็นจุดที่เหมาะสมที่สุด (Optimum time) เนื่องจากการไฮโดรไลซ์ที่นานขึ้นทำให้เอนไซม์ตัดพันธะเปปไทด์ของโปรตีนสายยาวจนกลายเป็นเปปไทด์สายสั้นหรือกรดอะมิโนอิสระ ส่งผลให้ได้โปรตีนที่ละลายได้ (Soluble protein) มากขึ้น ส่วนความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นจนเพียงพอจะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาคงที่เนื่องจากปริมาณโปรตีนตั้งต้นลดลง (Moreno และ Cuadrado, 1993; ปราณี อ่านเปรื่อง, 2558; จรินทร์ สว่างแจ้ง, 2544) อย่างไรก็ตาม กลุ่มควบคุมที่สกัดด้วยด่างแต่ไม่เติมเอนไซม์ ที่เวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณโปรตีนสูงกว่ากลุ่มที่เติมเอนไซม์ โดยมีค่าเท่ากับ 27.69 ± 0.56, 27.45 ± 0.41 และ 22.08 ± 0.17 มิลลิกรัม BSA/กรัมสารสกัดตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากการใช้ด่างช่วยสลายพันธะไดซัลไฟด์ พันธะเอไมด์ และพันธะไฮโดรเจนของกลูเตลิน (Glutelin) ซึ่งเป็นโปรตีนหลักในข้าวที่มีน้ำหนักโมเลกุลใหญ่ (45–150 kDa) และละลายได้ดีในสภาวะด่าง pH สูงกว่า 10 จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนได้เป็นอย่างดีแม้ไม่ได้เติมเอนไซม์ (Roy et al., 2023) โดยสรุป โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนอย่างเดียวมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดที่สภาวะความเข้มข้นร้อยละ 15 ที่เวลา 3 ชั่วโมง

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Bradford protein assay

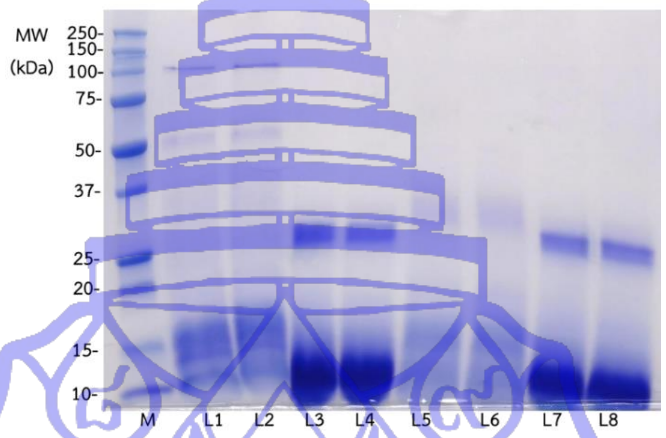
วิธีการสกัด	ความเข้มข้นเอนไซม์ (ร้อยละต่อน้ำหนักตัวอย่าง)	ปริมาณโปรตีน มก.BSA/ กรัมสารสกัด		
		เวลาไฮโดรไลซ์ (ชั่วโมง)		
		0	3	6
เอนไซม์โบรมิเลน	0	12.50 ± 0.25^{bA}	12.18 ± 0.18^{dA}	8.40 ± 0.10^{dB}
	5	9.68 ± 0.23^{dC}	14.79 ± 0.17^{cA}	13.01 ± 0.13^{cB}
	10	15.98 ± 0.06^{cB}	17.31 ± 0.02^{bA}	15.05 ± 0.45^{bC}
	15	21.12 ± 0.25^{aB}	21.98 ± 0.12^{aA}	17.23 ± 0.37^{aC}
ด่างและเอนไซม์	0	27.69 ± 0.56^{aA}	27.45 ± 0.41^{aA}	22.08 ± 0.17^{aB}
โบรมิเลน	5	16.56 ± 0.11^{dB}	17.78 ± 0.10^{cA}	13.65 ± 0.17^{cC}
	10	19.24 ± 0.15^{cB}	22.77 ± 0.13^{bA}	16.64 ± 0.19^{bC}
	15	20.27 ± 0.06^{bB}	21.91 ± 0.30^{bA}	16.21 ± 0.45^{bC}

หมายเหตุ Mean±S.D (n=3) ตัวอักษรยกพิมพ์เล็ก (a–d) ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันในความเข้มข้นเอนไซม์โบรมิเลนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และตัวอักษรยกพิมพ์ใหญ่ (A–C) ในแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันในเวลาไฮโดรไลซ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$ ANOVA DMRT)

4. วิเคราะห์น้ำหนักมวลโมเลกุล (Molecular Weight)

ผลการวิเคราะห์น้ำหนักมวลโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากข้าวกล้องสังข์หยดด้วยวิธี SDS-PAGE (ภาพที่ 3) พบว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่เติมเอนไซม์ (Lane L1–L2) มีน้ำหนักมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ในช่วง 50–100 kDa พร้อมลักษณะ smear ที่ 10–15 kDa ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Selamassakul et al. (2016) เนื่องจากไม่มีเอนไซม์ช่วยตัดพันธะเปปไทด์ โปรตีนจึงยังคงอยู่ในรูปโมเลกุลใหญ่หรือเกิดการรวมตัวกัน (Protein aggregation) เช่น โปรกลูเตลินและโพรลามิน ในขณะที่กลุ่มสกัดด้วยด่างที่ไม่เติมเอนไซม์ (Lane L5–L6) แสดงแถบโปรตีนที่ 30–35 kDa และ smear ช่วง 10–20 kDa คาดว่าจะเป็นกลุ่มโปรตีนชนิดกลูเตลิน แอลฟา-ซับยูนิต และโพรลามิน สอดคล้องกับรายงานของ Jayaprakash et al. (2022) และการสกัดด้วยด่างช่วยทำลายพันธะไดซัลไฟด์และทำให้การรวมตัวของกลูเตลินแตกตัว ส่งผลให้แถบโปรตีนที่ 100 kDa หายไป แม้จะยังไม่เกิดการตัดพันธะเปปไทด์อย่างสมบูรณ์ (Roy et al., 2023) นอกจากนี้การสกัดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนความเข้มข้นร้อยละ 15 ที่เวลา 3 ชั่วโมง (Lane L3–L4) พบน้ำหนักมวลโมเลกุลอยู่ที่ 27–32 kDa และมี smear หนาแน่นช่วง 10–18 kDa ส่วนกลุ่มที่สกัดด้วยด่างกับเอนไซม์โบรมิเลน (Lane L7–L8) พบแถบน้ำหนักโมเลกุลต่ำในช่วง 25–28 kDa และ smear เข้มข้นในช่วงต่ำกว่า 10–15 kDa ซึ่งจากขนาดมวลโมเลกุลดังกล่าว คาดว่าน่าจะเป็นกลุ่มโปรตีนกลูเตลินเบต้า-ซับยูนิต โกลบูลิน และ

โพรลามิน ตามลำดับทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์โบรมิเลนมีความจำเพาะในการตัดพันธะระหว่างอาร์จินีน–อะลานีน และอะลานีน–กรดกลูตามิก ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีปริมาณสูงในโปรตีนกลูเตลิน ส่งผลให้โปรตีนขนาดใหญ่ถูกย่อยสลายเป็นเปปไทด์ขนาดเล็กลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Selamassakul et al., 2016) นอกจากนี้ เปปไทด์ขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ที่มีน้ำหนักมวลโมเลกุลในช่วง 10–35 kDa ซึ่งเป็นขนาดที่ไม่สามารถซึมผ่านชั้นผิวหนังกำพร้าได้นั้น จะส่งผลให้มีคุณสมบัติในการสร้างฟิล์มเคลือบผิว (Film-forming effect) ช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิว (Moisturizing effect) และทำหน้าที่เป็นสารปรับสภาพเส้นผม (Hair conditioning) ได้เป็นอย่างดี (Goddard & Gruber, 1999)



ภาพที่ 3 SDS-PAGE (M) Protein MW marker (kDa); Protein standards 10-250 kDa (L1-L2) โปรตีนไฮโดรไลเซทจากข้าวกล้องสังข์หยดด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (กลุ่มควบคุมที่ไม่เติมเอนไซม์ ที่เวลาการไฮโดรไลซ์ 3 ชั่วโมง) (L3-L4) ความเข้มข้นร้อยละ 15 ที่เวลาไฮโดรไลซ์ 3 ชั่วโมง) (L5-L6) โปรตีนไฮโดรไลเซทจากข้าวกล้องสังข์หยดด้วยด่างกับเอนไซม์โบรมิเลน (กลุ่มควบคุมที่ไม่เติมเอนไซม์ ที่เวลาการไฮโดรไลซ์ 3 ชั่วโมง) (L7-L8) ความเข้มข้นร้อยละ 15 ที่เวลาไฮโดรไลซ์ 3 ชั่วโมง)

5. การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$

ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์โบรมิเลนและระยะเวลาในการไฮโดรไลซ์ส่งผลให้ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) หรือทำให้ค่า IC_{50} ลดลง เมื่อเปรียบเทียบทั้งสองวิธีการสกัด พบว่าสภาวะการสกัดด้วยด่างกับเอนไซม์โบรมิเลนที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 ที่เวลา 6 ชั่วโมง ให้ค่า IC_{50} ต่ำที่สุดเท่ากับ 43.33 ± 0.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือการสกัดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนอย่างเดียวที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 ที่เวลา 6 ชั่วโมง (IC_{50} เท่ากับ 50.67 ± 2.31 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และการสกัดด้วยด่างกับเอนไซม์โบรมิเลนร้อยละ 15 ที่เวลา 3 ชั่วโมง (IC_{50} เท่ากับ 54.33 ± 1.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ

พัสตราภรณ์ ทองอิ่มพงษ์ (2559) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น การที่เอนไซม์โบรมิเลนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระเนื่องจากมีความสามารถในการย่อยโปรตีนขนาดใหญ่ให้เป็นเปปไทด์ขนาดเล็ก อีกทั้งยังมีความจำเพาะในการตัดพันธะที่ตำแหน่งกรดอะมิโนจำพวกไลซีน อาร์จินีน ฟีนิลอะลานีน และไทโรซีน ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวให้โปรตอนและอิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระเพื่อให้เกิดความเสถียร (Selamassakul et al., 2018; Chen et al., 2021) นอกจากนี้ การใช้ด่างร่วมด้วยช่วยสลายพันธะไดซัลไฟด์ พันธะเอไมด์ และพันธะไฮโดรเจน ทำให้โครงสร้างโปรตีนคลายตัว ส่งผลให้เอนไซม์เข้าถึงตำแหน่งได้ดีขึ้น เกิดเป็นเปปไทด์สายสั้นที่มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น (Roy et al., 2023; Ren et al., 2021) โดยสรุป โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนร้อยละ 15 ที่เวลา 6 ชั่วโมง จะได้เปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง ส่งผลให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งอนุมูลอิสระ

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS แสดงในรูปค่า IC_{50}

วิธีการสกัด	ความเข้มข้นเอนไซม์ (ร้อยละต่อน้ำหนักตัวอย่าง)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เวลาไฮโดรไลซ์ (ชั่วโมง)		
		0	3	6
เอนไซม์โบรมิเลน	0	880.00 ± 10.00^{cA}	1113.33 ± 15.27^{dB}	1160.00 ± 17.32^{dC}
	5	106.67 ± 3.21^{bA}	146.67 ± 0.58^{cB}	146.00 ± 3.00^{cB}
	10	70.67 ± 3.79^{aA}	114.00 ± 2.00^{bC}	97.00 ± 2.65^{bB}
	15	61.00 ± 6.08^{aB}	93.33 ± 1.15^{aC}	50.67 ± 2.31^{aA}
ด่างและเอนไซม์โบรมิเลน	0	456.00 ± 8.00^{cB}	490.33 ± 10.02^{cC}	350.67 ± 1.15^{dA}
	5	115.33 ± 1.15^{bc}	106.33 ± 3.21^{bB}	77.33 ± 2.89^{cA}
	10	69.67 ± 1.15^{aB}	58.33 ± 3.51^{aA}	68.33 ± 3.06^{bB}
	15	73.00 ± 1.00^{aC}	54.33 ± 1.15^{aB}	43.33 ± 0.58^{aA}

หมายเหตุ Mean±S.D (n=3) ตัวอักษรยกพิมพ์เล็ก (a–d) ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันในความเข้มข้นเอนไซม์โบรมิเลนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และตัวอักษรยกพิมพ์ใหญ่ (A–C) ในแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันในเวลาการไฮโดรไลซ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$ ANOVA DMRT)

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทจากข้าวกล้องสังข์หยดด้วยวิธีการเอนไซม์โบรมิเลนเพียงอย่างเดียวและวิธีสกัดด้วยด่างกับเอนไซม์โบรมิเลน สรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุด

สำหรับการสกัดทั้งสองวิธีคือความเข้มข้นร้อยละ 15 ที่เวลาไฮโดรไลซ์ 3 ชั่วโมง ซึ่งให้ร้อยละผลผลิตสูงสุดและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่สภาวะดังกล่าว พบว่าวิธีใช้เอนไซม์โบรมิเลนให้ปริมาณโปรตีน 21.98 ± 0.12 มิลลิกรัม BSA ต่อกรัมสารสกัด และวิธีสกัดด้วยด่างกับเอนไซม์โบรมิเลนให้ปริมาณโปรตีน 21.91 ± 0.30 มิลลิกรัม BSA ต่อกรัมสารสกัด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาการไฮโดรไลซ์ 3 ชั่วโมง คือจุดที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทในเกือบทุกสภาวะ สำหรับการวิเคราะห์น้ำหนักมวลโมเลกุล พบว่ากระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์โบรมิเลนช่วยลดขนาดโปรตีนโมเลกุลใหญ่ให้มีขนาดเล็กลง และมีการกระจายตัวของเปปไทด์ในหลายช่วงขนาด ได้แก่ 10, 15, 20, 25, 28, 30 และ 35 kDa ซึ่งคาดว่าจะเป็นโปรตีนกลุ่มโพรลามิน โกลบูลิน กลูเตลิน เบต้า-ซับยูนิต และกลูเตลิน แอลฟา-ซับยูนิต นอกจากนี้ เมื่อประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่าสารสกัดจากทั้งสองวิธีมีค่า IC_{50} เท่ากับ 50.67 ± 2.31 และ 43.33 ± 0.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การที่กระบวนการย่อยสลายทำให้เกิดเปปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้นนี้ จึงส่งผลให้สารสกัดมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทจากข้าวกล้องสังข์หยดมีความโดดเด่นทั้งด้านองค์ประกอบของเปปไทด์ขนาดเล็กและฤทธิ์ทางชีวภาพ ส่งผลให้มีศักยภาพสูงในการนำไปพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์สำหรับประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเวชสำอาง (cosmeceuticals) ในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

1. แยกบริสุทธิ์และวิเคราะห์คุณสมบัติของเปปไทด์ด้วยเทคนิค HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

2. วิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเปปไทด์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

3. การวิเคราะห์ขนาดโปรตีน SDS-PAGE ให้เพิ่มความเข้มข้นเจลพอลิอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide) ส่วนเจลชั้นล่าง (Separating Gel) ที่ความเข้มข้น 15% และ โปรตีนมาตรฐาน (Protein Marker) ที่มีช่วงขนาดน้ำหนักโมเลกุล 3-250 kDa

4. ควรมีการเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bicinchoninic Acid Assay (BCA assay) เนื่องจากสามารถตรวจวัดโปรตีนและเปปไทด์ขนาดเล็กได้ดี

รายการอ้างอิง

ปราณี อ่านเปรื่อง. (2558). *เอนไซม์ทางอาหาร*. (พิมพ์ครั้งที่ 5) โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์.

พัสตราภรณ์ ทองอิ่มพงษ์, ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์, และอรพิน เกิดชูชื่น. (2559). สมบัติต้านอนุมูลอิสระและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากกากทานตะวันที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์โบรมิเลนและ Flavourzyme. *วิจัยและพัฒนา มจธ*, *39*(4), 565-583.

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*(1-2), 248-254.

Chen, H. J., Dai, F. J., Chen, C. Y., Fan, S. L., Zheng, J. H., Huang, Y. C., . . . Chen, C. S. (2021). Evaluating the antioxidants, whitening and antiaging properties of rice protein hydrolysates. *Molecules*, *26*(12), 3605.

Ee, K. Y., Ng, W. J., Hew, P. S., Mah, K. S., Lim, L. X., Kee, S. Y., . . . Law, M. Y. (2024). Optimizing protein hydrolysates of rice bran: Physicochemical, antioxidant, antibacterial properties, and chemometric analysis for functional food potential. *Measurement: Food*, *13*, 100141.

Meza, S. L. R., Cañizares, L., Dannenberg, B., Peres, B. B., Rodrigues, L. A., Mardade, C., . . . de Oliveira, M. (2024). Sustainable rice bran protein: Composition, extraction, quality properties and applications. *Trends in Food Science & Technology*, *145*, 104355.

Roy, T., Singh, A., Sari, T. P., & Homroy, S. (2023). Rice protein: Emerging insights of extraction, structural characteristics, functionality, and application in the food industry. *Journal of Food Composition and Analysis*, *123*, 105581.

Selamassakul, O., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., & Ratanakhanokchai, K. (2016). A novel multi-biofunctional protein from brown rice hydrolysed by endo/endo-exoproteases. *Food & function*, *7*(6), 2635-2644.

Selamassakul, O., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., Yang, L., & Maier, C. S. (2020). Bioactive peptides from brown rice protein hydrolyzed by bromelain: Relationship between biofunctional activities and flavor characteristics. *Journal of Food Science*, *85*(3), 707-717.

Wang, B., Luo, J., Zhang, Q., Cao, X., Zhang, Y., Huang, Z., . . . Gan, T. (2023). Storage of brown rice and its physicochemical properties under high temperature and humidity negative air ions environment. *Journal of Cereal Science*, *112*, 103723.

Xia, N., Wang, J. M., Gong, Q., Yang, X. Q., Yin, S. W., & Qi, J. R. (2012). Characterization and In Vitro digestibility of rice protein prepared by enzyme-assisted microfluidization: Comparison to alkaline extraction. *Journal of Cereal Science*, *56*(2), 482-489.

