



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสกัดและใช้ประโยชน์ของสารสกัดจากรำข้าว
เพื่อเป็นส่วนผสมในการปรับปรุงคุณภาพขนมปัง

นางสาวสударัตน์ เจียมยังยีน

มิถุนายน 2546

สัญญาเลขที่ MRG 4580025

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสกัดและใช้ประโยชน์ของสารสกัดจากรำข้าว
เพื่อเป็นส่วนผสมในการปรับปรุงคุณภาพขนมปัง

นางสาวสุดารัตน์ เจียมยังยืน

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยทบวงมหาวิทยาลัย และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ทบวง และ สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานที่ให้เงินสนับสนุนการวิจัย คือ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และทบวงมหาวิทยาลัย รวมทั้งขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี รวมทั้ง ดร. สมชาย แสงอำนาจเดช อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือในการวิจัยและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมากต่องานวิจัย

นอกจากนี้ งานวิจัยครั้งนี้ สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษานักวิจัยสองท่าน คือ รองศาสตราจารย์วรณัฐ ศรีเจษฎารักษ์ อาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ Prof. Dr. W. J. Harper อาจารย์ประจำ Department of Food Science and Technology, The Ohio State University, USA. ที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ ให้ความเอาใจใส่เป็นอย่างดี รวมทั้งให้กำลังใจในการทำงานวิจัยครั้งนี้ให้สมบูรณ์และมีคุณค่า

คุณค่าและประโยชน์จากงานวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นเครื่องบูชาแต่บิดา มารดา ญาติ พี่น้อง ครู อาจารย์ ผู้มีพระคุณ ตลอดจนผู้มีส่วนร่วมทุกท่านที่ให้ความรู้และความร่วมมือในการทำงานวิจัยครั้งนี้ด้วยดีตลอดมา

ผู้วิจัย

30 มิถุนายน 2546

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	i
สารบัญตาราง.....	iv
สารบัญภาพ.....	v
บทคัดย่อ.....	vi
บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	2
วัสดุอุปกรณ์.....	4
วิธีการทดลอง	
1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว	
1.1 การสกัดไขมันจากรำข้าว.....	5
1.2 การคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว	
1.2.1 วางแผนและออกแบบการทดลอง.....	7
1.2.2 วิเคราะห์ผลการทดลอง.....	10
1.2.3 สรุปผลการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัด..	11
2. การใช้โปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวเป็นส่วนผสมในขนมปัง	
2.1 การผลิตขนมปังและการศึกษาการเติมโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว	
ในระดับที่เหมาะสม.....	11
2.2 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของขนมปัง.....	11
2.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของขนมปัง.....	12
2.4 การศึกษาสมบัติทางจุลินทรีย์ของขนมปัง.....	12
2.5 การศึกษาอายุการเก็บของขนมปัง.....	12
2.6 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของขนมปัง.....	12
2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	13

สารบัญ (ต่อ)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว

1.1 การสกัดไขมันจากรำข้าว.....	13
1.2 การคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว	
1.2.1 ผลการสกัดโดยใช้วิธีการทางเคมี.....	14
1.2.2 ผลการสกัดโดยใช้เอนไซม์.....	17

2. การใช้โปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวเป็นส่วนผสมในขนมปัง

2.1 สมบัติทางกายภาพของขนมปัง.....	21
2.2 องค์ประกอบทางเคมีของขนมปัง.....	22
2.3 สมบัติทางจุลินทรีย์ของขนมปัง.....	24
2.4 อายุการเก็บของขนมปัง.....	25
2.5 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของขนมปัง.....	26

สรุปผลการทดลอง.....	27
---------------------	----

ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการ.....	28
----------------------------------	----

เอกสารอ้างอิง.....	28
--------------------	----

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี Proximate analysis...	30
ภาคผนวกที่ 2 Specifications ของเอนไซม์ Filtrase® BR.....	36
ภาคผนวกที่ 3 สูตรและวิธีการทำขนมปัง.....	37
ภาคผนวกที่ 4 การหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Total plate count.....	38
ภาคผนวกที่ 5 การทดสอบทางประสาทสัมผัส.....	39
ภาคผนวกที่ 6 ตารางผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน.....	44

Output ที่ได้จากโครงการ.....	48
------------------------------	----

บทความสำหรับการเผยแพร่.....	49
-----------------------------	----

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ค่ารหัสของจุดหรือสิ่งทดลองสำหรับแผนการทดลอง 2 ตัวแปรที่มีการ วางรูปแบบสภาวะการทดลองแบบ 6 เหลี่ยม.....	8
2. ค่าจริงของจุดหรือสิ่งทดลองสำหรับแผนการทดลอง 2 ตัวแปรที่มีการ วางรูปแบบสภาวะการทดลองแบบ 6 เหลี่ยม.....	8
3. องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวสาคูและรำข้าวที่ผ่านการสกัดไขมัน.....	13
4. ปริมาณโปรตีนและผลผลิตของโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวที่สกัดได้โดย วิธีการทางเคมี.....	14
5. ปริมาณโปรตีนและผลผลิตของโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวที่สกัดโดย ใช้เอนไซม์.....	18
6. สมบัติทางกายภาพของขนมปัง.....	21
7. องค์ประกอบทางเคมีของขนมปัง.....	23
8. ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ของขนมปัง.....	24
9. อายุการเก็บของขนมปัง.....	25
10. คะแนนเฉลี่ยความชอบที่มีต่อคุณลักษณะต่าง ๆ ของขนมปัง.....	26

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ขั้นตอนการสกัดน้ำมันออกจากรำข้าว.....	6
2. ขั้นตอนการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวโดยใช้วิธีทางเคมี.....	9
3. ขั้นตอนการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวโดยใช้เอนไซม์.....	10
4. รำข้าวไขมันเต็มและรำข้าวที่ผ่านการสกัดไขมันออก.....	14
5. กราฟ RSM ของปริมาณโปรตีนในโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวที่ได้จากการสกัดโดยใช้วิธีทางเคมี.....	15
6. กราฟ RSM ของเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวที่ได้จากการสกัดโดยใช้วิธีทางเคมี.....	16
7. กราฟ RSM ของปริมาณโปรตีนในโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวที่ได้จากการสกัดโดยใช้เอนไซม์.....	18
8. กราฟ RSM ของเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวที่ได้จากการสกัดโดยใช้เอนไซม์.....	19
9. โปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว.....	21
10. ขนบับสูตรควบคุมและขนบับสูตรผสมโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว.....	22

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG4580025

ชื่อโครงการ: การสกัดและใช้ประโยชน์ของสารสกัดจากรำข้าวเพื่อเป็นส่วนผสมในการปรับปรุงคุณภาพขนมปัง

ผู้วิจัย: นางสาวสุดาร์ตน์ เจียมยังยืน

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

โทรศัพท์ (055) 261-000-4 ต่อ 2733 โทรสาร (055) 261-040

E-Mail Address: sudaratjiam@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ: 1 กรกฎาคม 2545 – 30 มิถุนายน 2546

งานวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว โดยวิธีการทางเคมีและใช้เอนไซม์ และใช้โปรตีนที่สกัดได้เป็นส่วนผสมในสูตรขนมปัง เพื่อปรับปรุงคุณภาพของขนมปังและเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค การสกัดโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว ใช้แผนการทดลองแบบ Central Composite Design และแสดงผลโดยวิธีการตอบสนองโครงร่างพื้นผิว วิธีการทางเคมีใช้การสกัดโดยปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 2-12 เวลา 30-60 นาที ส่วนการใช้เอนไซม์ ใช้เอนไซม์ Filtrase® ในปริมาณ 0-1% เวลา 30-60 นาที ผลปรากฏว่าการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวด้วยวิธีทางเคมี ให้ปริมาณโปรตีนและผลผลิตมากกว่าการใช้เอนไซม์ สภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ pH 11 ระยะเวลาสกัด 45 นาที เมื่อนำโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวที่สกัดโดยสภาวะดังกล่าว ไปทดแทนแป้งสาลีในสูตรขนมปัง โดยทดแทนในปริมาณ 1-5 % พบว่า การเติมโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวในขนมปัง เมื่อเทียบกับขนมปังสูตรมาตรฐาน ช่วยลดการสูญเสียไอน้ำระหว่างการอบ และลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ตรวจพบ อันเนื่องจากคุณสมบัติในการอุ้มน้ำของโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว การเพิ่มปริมาณโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวจาก 1-5 % ช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนและเอนไซม์ของขนมปัง อย่างไรก็ตาม ผลจากการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่า การเติมโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวในสูตรขนมปังมากกว่า 1% มีผลทำให้คะแนนความชอบด้านสี กลิ่น รสชาติ และความชอบรวมที่มีต่อขนมปังลดลง ดังนั้น ปริมาณที่เหมาะสมในการเติม ไม่ควรเกิน 1% ผลิตภัณฑ์จึงจะอยู่ในเกณฑ์ที่ผู้บริโภคยอมรับได้ ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาศักยภาพและสมบัติทางหน้าที่ของโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวและการใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์ชนิดอื่น ซึ่งในอนาคต ควรมีการศึกษาสมบัติทางหน้าที่ของโปรตีนเข้มข้นจากอย่างละเอียดต่อไป

คำหลัก: รำข้าว โปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว Central Composite Design การตอบสนองโครงร่างพื้นผิว ขนมปัง

Abstract

Project Code: MRG4580025

Project Title: Extraction and utilization of rice bran extract as a food additive to improve bread quality

Investigator: Miss Sudarat Jiamyangyuen

Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture, Natural Resource and Environment
Naresuan University, Phitsanulok Thailand 65000

Telephone (055) 261-000-4 ext. 2733. Fax. (055) 261-040

E-mail Address: sudaratjiam@yahoo.com

Project Period: July 1, 2002 – June 30, 2003

The objectives of this study were to (1) determine the optimal extracting conditions of rice bran protein concentrate (RBPC) using chemical and enzymatic methods, (2) apply RBPC in a bread recipe in order to improve bread quality and make an acceptable product to consumers. The design used in extraction method was a Central Composite Design. The Response Surface Methodology was chosen to graphically express relationship between pH or amount of enzyme used, extracting time and protein content as well as percent yield of RBPC. In chemical extraction, the slurry of rice bran was adjusted to different pH ranged from 2-12 and 30-60 min., respectively. In enzymatic method, different amounts of Filtrase® ranging from 0-1% and extraction time ranging from 30-60 min. were used. It was found that chemical extraction gave a higher protein content and percent yield of RBPC. The optimal conditions were pH 11 and 45 min. When incorporating RBPC in a bread recipe 1-5%, it was found that RBPC could reduce the weight loss and amount of microbial found in bread, which is due to the water holding capacity of RBPC. The higher protein content and fiber in bread was corresponding to the amount of RBPC added. However, results of sensory evaluation showed that adding more than 1% of RBPC could decrease the liking scores of color, taste, odor, texture, and overall liking. The results of this study could be used as a basic knowledge of RBPC utilization in other food applications. However, it is recommended that the functional property of RBPC should be studied in details in the future.

Keywords: Rice bran, Rice bran protein concentrate, Central Composite Design, Response Surface Methodology, Bread.

บทนำ

การผลิตข้าวของโลกมีมากกว่า 500 เมตริกตันต่อปีและประเทศไทยถือเป็นผู้ผลิตข้าวอันดับใหญ่ของโลก ในกระบวนการแปรรูปจากข้าวเปลือกเป็นข้าวขาวเพื่อการบริโภคนั้น จะได้รำข้าว (rice bran) เป็นผลผลิตพลอยได้ (by-product) และเป็นวัสดุเหลือทิ้ง ในปัจจุบันโรงสีข้าวส่วนใหญ่จะขายรำไปเป็นอาหารสัตว์ (อรอนงค์, 2542) จึงถือได้ว่าปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จากรำข้าวได้ไม่เต็มที่นัก

เมื่อพิจารณาด้านโภชนาการของรำข้าว จะพบว่ารำข้าวเป็นส่วนที่มีคุณค่าทางอาหารสูง กล่าวคือ รำข้าวมีส่วนประกอบของสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย อันได้แก่ โยอาหาร เกลือแร่ วิตามิน และกรดไขมัน (Hamada, 1997) มีรายงานว่าในรำข้าวมีปริมาณน้ำมัน 18-23% ที่ประกอบด้วยกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวประเภท polyunsaturates และ monounsaturates ที่มีความคงตัวต่อความร้อน น้ำมันที่สกัดได้จากรำข้าว (rice bran oil) มีกรดไขมันที่จำเป็น ได้แก่ กรดลิโนเลอิก และ ลิโนเลนิกที่จำเป็นสำหรับสุขภาพ ยังมีรายงานจากงานวิจัยที่พบว่าในรำข้าวประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่ได้รับความสนใจในการศึกษาอย่างมาก ได้แก่ วิตามิน E (tocopherols) tocotrienols และ oryzanol มีรายงานเกี่ยวกับประโยชน์ของสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ว่ามีส่วนช่วยในการลดการดูดซับโคเลสเตอรอล และมีส่วนช่วยในการป้องกันมะเร็ง (Lloyd และคณะ 2000)

นอกจากคุณค่าทางโภชนาการที่กล่าวไปแล้ว รำข้าวยังมีสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายเป็นส่วนที่มีโปรตีนประมาณ 12-15 % (Saunders, 1990) และมีปริมาณกรดอะมิโนไลซีน (lysine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายในปริมาณสูง (Lasztity, 1986) นอกจากนี้ยังพบว่ารำข้าวประกอบด้วยโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็น hypoallergenic ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการผลิตสูตรอาหารสำหรับเด็กอ่อน ที่เหมาะสมสำหรับเด็กที่มีแนวโน้มที่เกิดการแพ้เนื่องมาจากอาหาร (food allergy) (Wang และคณะ, 1999)

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์ขนมอบ (Bakery products) เป็นผลิตภัณฑ์อาหารชนิดหนึ่งที่มีความสนใจในการบริโภค ผลิตภัณฑ์ขนมอบมีหลายชนิด เช่น ขนมปัง บิสกิต แครกเกอร์ คุกกี้ และ เค้ก แนวโน้มในการผลิตผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ได้มีการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางที่เข้มงวดในการเลือกใช้วัตถุดิบ ซึ่งได้แก่ แป้ง และส่วนผสมอื่น ๆ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ตามความต้องการของผู้บริโภค เช่น การเลือกวัตถุดิบที่มีคุณภาพเน้น nutrition labeling การเลือกใช้สารทดแทนไขมันและน้ำตาลทราย การใช้เอนไซม์ทดแทน chemical oxidizing agent และ emulsifiers และการเลือกใช้สารจากธรรมชาติหรือสารที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ เป็นต้น

ถึงแม้ว่าจะมีข้อมูลปรากฏเกี่ยวกับคุณค่าทางโภชนาการของรำข้าว แต่การใช้ประโยชน์จากรำข้าวเพื่อเป็นส่วนผสมของอาหารเพื่อการบริโภคในประเทศไทยนั้นยังไม่ได้ได้รับการศึกษา

ค้นคว้าอย่างกว้างขวางและจริงจัง แสดงถึงการใช้ประโยชน์อย่างไม่เต็มที่ (underutilization) ของรำข้าว การนำเสนองานวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นแนวทางในการศึกษาการเพิ่มมูลค่าของรำข้าว ซึ่งถือเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่มีราคาต่ำ โดยจะเน้นศึกษาถึงการใช้ประโยชน์เพิ่มเติมในอุตสาหกรรมอาหารประเภทขนมอบ เนื่องจากในปัจจุบันนี้ยังไม่มีข้อมูลที่ได้รับการศึกษาและเผยแพร่โดยคนไทย ในแง่ปริมาณการใช้ ตลอดจนวิธีการศึกษาเพื่อยืนยันว่าสารสกัดจากรำข้าวสามารถมีคุณสมบัติในการปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ขนมอบ ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาในต่างประเทศแล้วบ้างบางส่วน แต่วัตถุดิบและกระบวนการประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ของไทยยังไม่ได้มีการศึกษาอย่างแท้จริง และอาจแตกต่างจากข้อมูลที่มีอยู่ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จะทำการสกัดสารสกัดจากรำข้าวที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก โดยใช้วิธีสกัดด้วยด่างและตกตะกอนที่จุด isoelectric point และทำให้แห้งโดยวิธี freeze dry เพื่อใช้เป็นตัวปรับสภาพโด (dough conditioner) ในการทำขนมปัง และศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ เพื่อประเมินประโยชน์และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ เปรียบเทียบกับสูตรที่ไม่มีการใช้สารสกัดจากรำข้าว ซึ่งผลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้จะสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเกี่ยวกับศักยภาพของคุณสมบัติทางหน้าที่ (functional property) และการใช้ประโยชน์จากรำข้าวในผลิตภัณฑ์ชนิดอื่น ๆ อย่างกว้างขวางต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดจากรำข้าว (โปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว) โดยวิธีการทางเคมีและใช้เอนไซม์
2. เพื่อปรับปรุงคุณภาพของขนมปัง ที่มีสารสกัดจากรำข้าวเป็นส่วนผสมในสูตร
3. เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมในการใช้สารสกัดจากรำข้าวเป็นส่วนผสมในสูตร เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค
4. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเกี่ยวกับศักยภาพของคุณสมบัติทางหน้าที่ (functional property) และการใช้ประโยชน์จากสารสกัดจากรำข้าวในผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นต่อไป
5. ศึกษาการทดสอบทางประสาทสัมผัส และการยอมรับของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในแง่ของการศึกษาการสกัดโปรตีนจากรำข้าวทั้งในรูปของ rice bran protein concentrate และ rice bran protein isolate มีการศึกษาถึงปริมาณโปรตีน และคุณสมบัติทางฟังก์ชัน (functional properties) ซึ่งได้แก่ คุณสมบัติทาง emulsification, foaming, nitrogen solubility และ surface hydrophobicity (Wang และคณะ 1999; Gnanasambandam และ Hettiarachcay, 1995 ; Bera และ Mukherjee, 1989) Bera และ Mukherjee (1989) รายงานว่า โปรตีนเข้มข้นที่สกัดได้จากรำข้าวสามารถจะถูกใช้เป็นส่วนผสมที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ (protein ingredient) ในอาหาร นอกจากนี้นักวิจัยกลุ่มนี้ยังเสนอว่าโปรตีนสกัดจากรำข้าวนี้มีคุณสมบัติ

สมบัติเกี่ยวกับอิมัลซิไฟเออร์ที่ดีและมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ได้เช่นเดียวกับอิมัลซิไฟเออร์ที่ได้จากไขมัน (fat emulsifier) ในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ด้วย

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Bera และ Mukherjee (1989) ที่ทำการศึกษาคูณสมบัติทางการละลาย การเกิดอิมัลซิฟิเคชัน และการเกิดโฟมของ rice bran protein concentrate พบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำโปรตีนดังกล่าวมาใช้เป็นส่วนผสมของอาหาร โดยเฉพาะใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ LaBell (1998) การวิจัยโดย James และคณะ (1989) ที่ทำการใช้ส่วนผสมของรำข้าวและถั่วเหลืองเพื่อทดแทนการใช้แป้งสาลีและเป็นการเพิ่มปริมาณโปรตีนเมื่อเปรียบเทียบกับคุกกี้สูตรมาตรฐานที่ใช้แป้งสาลี 100 % พบว่าคุกกี้ที่มีส่วนผสมของรำข้าวและถั่วเหลืองมีสีเข้มกว่า มีความกรอบ (crisp) น้อยกว่า และมีความเหนียว (chewy) มากกว่าสูตรมาตรฐาน และยังพบว่าปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 6% เป็น 9%

มีรายงานจากบริษัท RIBUS, Inc. (<http://ribus.com>) ประเทศสหรัฐอเมริกาว่ามีการสกัดสารจากรำข้าว (rice bran extract) เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์จากธรรมชาติที่ประกอบด้วยส่วนของโปรตีนที่ผ่านการทำให้คงตัวด้วยเอนไซม์ (enzymatically stabilized proteins) ส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) และส่วนที่เป็นไขมันจากรำข้าว (rice bran oil) จุดประสงค์ของการใช้สารสกัดดังกล่าวนี้ในอุตสาหกรรมอาหารมี 2 อย่าง ได้แก่ (1) ใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์เพื่อเป็นสารหล่อลื่นและยืดอายุการใช้งานของเครื่องเอกทรูเดอร์ (extruder) ในการผลิตผลิตภัณฑ์กรอบพองชนิดต่าง ๆ พบว่าสารสกัดจากรำข้าวนี้สามารถช่วยให้มีความคงตัวของมวลของวัตถุดิบ และให้ผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำหนักเบาและมีความพองกรอบมากขึ้น ปริมาณการใช้อยู่ในช่วง 0.25-0.50% นอกจากนี้ยังสามารถใช้อิมัลซิไฟเออร์ในรูปผง (powdered emulsifier) และใส่ในส่วนผสมที่เป็นผงส่วนอื่น ๆ ในสูตรการผลิตด้วย และ (2) ใช้เป็นตัวปรับคุณภาพของโดในการทำผลิตภัณฑ์ขนมอบต่าง ๆ เช่น ขนมปัง

โดยทั่วไปแล้ว ตัวปรับปรุงสภาพโด (dough conditioner) ในอุตสาหกรรมขนมอบ จะหมายถึง สารที่สามารถทำหน้าที่เป็นตัวช่วยในกระบวนการผลิต และเพิ่มคุณภาพให้กับผลิตภัณฑ์ ตัวปรับปรุงคุณภาพของโดซึ่งเป็นส่วนผสมของสารหลายชนิดที่นิยมใช้ ได้แก่ วิทกลูเตน (wheat gluten) อาหารของยีสต์ (yeast nutrient) สารบัฟเฟอร์ของเกลือ (buffer salts) ออกซิไดซิ่ง และรีดิวซิ่งเอเจนต์ (oxidizing and reducing agents) เอนไซม์ (enzymes) และอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifiers)

ในรายละเอียดของการใช้ประโยชน์จากสารสกัดจากรำข้าว (rice bran extract) นั้น บริษัท RIBUS, Inc. นี้ได้ทำการผลิตสารสกัดนี้ และใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ ซึ่งได้แก่ เค้ก ขนมอบ ขนมปังที่ทำจากแป้งสาลีและใช้ยีสต์ และขนมปังกรอบ โดยมีจุดประสงค์เพื่อปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ พบว่ามีการใช้สารสกัดจากรำข้าวในปริมาณที่แตกต่างกัน

ขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์ และจุดประสงค์ที่ต้องการพัฒนาคุณภาพเช่น เพื่อยืดอายุการเก็บ เพิ่มปริมาตรของแป้งโด เพิ่มอัตราการเก็บน้ำและความสามารถในการนวด (water retention and machinability) เป็นต้น ซึ่งในการทดลองเกี่ยวกับคุณสมบัติทางฟังก์ชันของสารสกัดจากรำข้าวดังกล่าวนี้ ทางบริษัทกล่าวว่าจะสามารถใช้สารสกัดจากรำข้าวเป็นส่วนผสมในสูตร โดยจุดประสงค์หลักเพื่อใช้เป็นตัวปรับสภาพโด เพื่อทดแทนการใช้ส่วนผสมทางเคมี (chemical additives) ตัวอย่างเช่น กลูเตน (gluten) ออกซิไดซิงเอเจนต์ (oxidizing agents) เอนไซม์ (enzymes) และสารอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifiers) และการใช้สารสกัดจากรำข้าวในสูตรเพื่อทดแทนสารกลุ่มดังกล่าว สามารถลดปริมาณการใช้จาก 5 ไปเป็น 2% และยังมีผลดีในการกล่าวถึงส่วนผสมบนฉลากว่ามีการใช้สารที่สกัดจากธรรมชาติ (natural conditioner) ในปริมาณที่ต่ำกว่า เพื่อทดแทนสารที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี และเป็นการลดจำนวนของส่วนประกอบที่ต้องบอกบนฉลาก ทำให้ส่วนประกอบบนฉลากมีจำนวนน้อยลงและอ่านฉลากได้ง่ายขึ้น (clean label) นอกจากนี้ยังพบว่าเป็นการลดต้นทุนการผลิตโดยรวม และเป็นการเพิ่มผลผลิต โดยเป็นผลมาจากส่วนประกอบของ rice bran extract ในการเพิ่มความสามารถในการดูดน้ำ ยืดอายุการเก็บ การเพิ่มความแข็งแรงของ flour และทำให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้มีความนุ่มเมื่อรับประทานด้วย

วัสดุและอุปกรณ์

(1) สารเคมี

- สารละลายเฮกเซน (Hexane Solution)
- กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)
- กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid)
- ซีลีเนียม (Selenium)
- กรดบอริก (Boric acid)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)
- เอนไซม์ Filtrase® BR (Food grade)

(2) วัสดุอุปกรณ์

- เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ (Refrigerated centrifuge; Sorvall® RC 28 Soupont)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Spectrophotometer; Perkin Elmer, Lambda 20)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Poly science® Model 25 L-M)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter model HORIBA Model F-21)
- เครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer; Flexi-Dry™ FTS system)
- เครื่องวัดสี Hunter Lab (Model DP-12000)
- ตู้อบลมร้อนแบบสุญญากาศ (Vacuum oven; Shel lab Model 1375 fx)

- เตาเผา (Muffle furnace; Fisher scientific Model 10-650-126)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- ชุดวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Kjeldahl digestion unit; Buchi Model B 435)
- ชุดวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Soxhlet apparatus; Gerhardt)
- เครื่องบดอาหาร (Blender standmixer Model 241 moulinex)
- ชุดวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใย (Velp scientific Model five 6)
- เครื่องอัลตราโซนิก (Sonicor; Microcomputer heater-timer controller)
- เตาให้ความร้อน (Halogen stirrer HT2 Bibby)
- เตาอบและอุปกรณ์การทำขนมปัง
- เครื่องคอมพิวเตอร์
- ซอฟต์แวร์วิเคราะห์ผลทางสถิติ (SPSS for Windows version 10.0, และ Statistica version 5.0)
- อุปกรณ์เครื่องแก้วเพื่อใช้ในการทดลอง
- อุปกรณ์งานบ้านงานครัว

สถานที่ทำการทดลอง

- ห้องปฏิบัติการทางเคมี โรงงานต้นแบบ (Pilot plant) และ ห้องวิจัย 1 และ 2 ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
- ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
- ห้องปฏิบัติการ Molecular ภาควิชาชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว

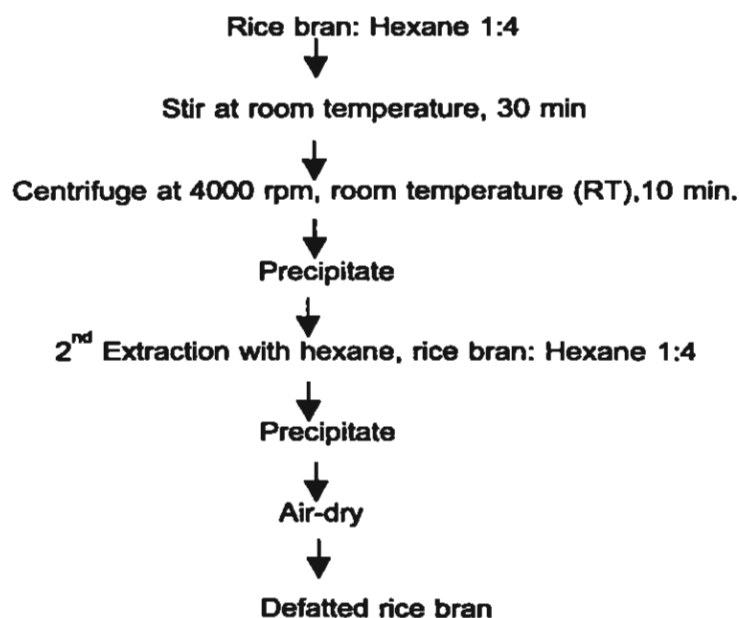
ใช้ตัวอย่างรำข้าวพันธุ์ กข ซึ่งเป็นรำของข้าวจากหลาย ๆ พันธุ์ที่ได้จากโรงสีข้าวในเขตอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบต่าง ๆ (proximate composition) ของรำข้าวสด ได้แก่

- ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl (AOAC 40.1.06, 1995)
- ปริมาณไขมัน โดยวิธี Soxhlet extraction (AOAC 40.1.05, 1995)
- ปริมาณความชื้น (AOAC 40.1.04, 1995)
- ปริมาณเถ้า (AOAC 40.1.03, 1995)
- ปริมาณเยื่อใย (AOAC 40.1.07, 1995)

- ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (คำนวณจากผลต่างของ 100 และผลรวมทั้งหมด)
- วิธีการศึกษาได้อธิบายไว้ในภาคผนวกที่ 1

1.1 การสกัดไขมันออกจากรำข้าว

ขั้นตอนแรกในการเตรียมตัวอย่างคือการสกัดไขมันออกจากรำข้าว เพื่อป้องกันการเกิดกลิ่นหืนในระหว่างการเก็บรักษา และเพื่อช่วยส่งเสริมให้การสกัดโปรตีนได้มากยิ่งขึ้น (Chen และ Houston, 1970) การสกัดไขมันออกจากรำข้าว ทำได้โดยใช้สารละลายเฮกเซน ในอัตราส่วนรำข้าวต่อเฮกเซน เท่ากับ 1: 4 โดยการคนตลอดเวลานาน 30 นาที และทำการปั่นเหวี่ยง ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง แยกตะกอนออกจากสารละลายเฮกเซน และทำการสกัดซ้ำอีกครั้งตามวิธีข้างต้น และผึ่งให้แห้งในตู้ดูดควัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการบดรำด้วยเครื่องบดอาหาร และเก็บรำในถุงพลาสติก (polyethylene) ปิดผนึกปากถุงให้สนิท โดยเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว สรุปวิธีการสกัดไขมัน ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการสกัดน้ำมันออกจากรำข้าว

1.2 การคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว

- 1.2.1 วางแผนและออกแบบการทดลอง ใช้การวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)
- 1.2.2 วิเคราะห์ผลการทดลอง โดยใช้การตอบสนองโครงร่างพื้นผิว (Response Surface Methodology; RSM)
- 1.2.3 สรุปผลการทดลองสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว

1.2.1 วางแผนและออกแบบการทดลอง

การวางแผนการทดลองแบบ CCD มีการจัดสิ่งทดลองสำหรับแผนการทดลอง 2 ตัวแปร คือ pH และเวลาที่ใช้ในการสกัด แบบหุ่นกำลังสอง ชนิดกำลังสองแบบหมุน (rotatable design) และมีการจัด design point แบบ Hexagon Design

แผนการทดลองแบบ CCD เป็นแผนการทดลองที่อาศัยหลักการของการจัดการสิ่งทดลองแบบ Factorial ที่ตัวแปรมี 2 ระดับ ที่มี 2^k สิ่งทดลอง โดยมีการเพิ่มจุด 2k (จุดดาว หรือ star points) เพื่อเพิ่มการประมาณของส่วนโค้ง (curvature) และจุดกลาง (center point) ซึ่งจุดกลางนี้มักจะถูกทำซ้ำในการทดลองมากกว่า 1 ครั้ง

ในการใช้แผนการทดลองแบบ CCD นี้ จะมีการตั้ง “ค่ารหัส” (coded variable) เพื่อเป็นตัวแทนของ “ค่าจริง” (true variables) การคำนวณค่า coded variable ทำได้โดย

$$\text{Coded variable} = \frac{\text{Natural} - \text{Average}}{\text{Mid value}}$$

โดยที่ Natural คือ ค่าจริงที่ใช้ในการทดลอง

$$\text{Average} = (\text{high} + \text{low}) / 2$$

$$\text{Mid value} = (\text{high} - \text{low}) / 2$$

ในการทดลองนี้ จะทำการเปรียบเทียบการใช้วิธีการสกัดทางเคมี และการใช้เอนไซม์ การใช้สารเคมีสกัด จะกำหนดตัวแปรอิสระคือ pH (X) และเวลา (Y) โดยมีช่วงของ pH และเวลา ที่ศึกษา คือ ระดับต่ำที่ pH 2 และระดับสูงที่ pH 12 และ เวลา ระดับต่ำที่ 30 นาที และระดับสูงที่ 60 นาที สำหรับการใชเอนไซม์ จะกำหนดตัวแปรอิสระคือ ปริมาณเอนไซม์ (X) และเวลา (Y) โดยมีระดับต่ำที่ 0% และระดับสูงที่ 1% (w/w) และช่วงเวลาที่ใช้ เช่นเดียวกับวิธีการทางเคมี คือ 30-60 นาที สำหรับตัวแปรตาม (Z) นั้น จะแยกวิเคราะห์ 2 ค่า คือ ปริมาณโปรตีน และผลผลิต ซึ่งค่าทั้งสองระบุหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

จุดหรือสิ่งทดลองสำหรับแผนการทดลอง 2 ตัวแปรชนิดกำลังสองแบบหมุนของแบบ 6 เหลี่ยม มีค่ารหัสสำหรับการทดลอง ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่ารหัสของจุดหรือสิ่งทดลองของตัวแปรอิสระ 2 ตัว ที่มีการวางรูปแบบสภาวะการทดลองแบบ 6 เหลี่ยม

สภาวะการทดลองที่	X	Y	หมายเหตุ
1	1.000	0	-ตัวแปรอิสระ X (pH หรือปริมาณเอนไซม์ในการสกัด) มี 5 ระดับ
2	0.500	0.866	
3	-0.500	0.866	
4	-1.000	0	
5	0.500	-0.866	- ตัวแปรอิสระ Y (เวลาในการสกัด) มี 3 ระดับ
6	0	-0.866	
7	0	0	

มีการทำซ้ำของจุดกึ่งกลาง (สภาวะการทดลองที่ 7) จำนวน 4 ครั้ง ดังนั้น จะมีสภาวะการทดลองทั้งหมด 10 สภาวะ โดยที่สภาวะที่ 7-10 เป็นสภาวะเดียวกัน

จุดหรือสิ่งทดลองสำหรับแผนการทดลอง 2 ตัวแปรชนิดกำลังสองแบบหมุน มีค่าจริงในการทดลองเป็นดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าจริงของสิ่งทดลองสำหรับแผนการทดลอง 2 ตัวแปรที่มีการวางรูปแบบสภาวะการทดลองแบบ 6 เหลี่ยม

สภาวะการทดลองที่	pH	ปริมาณเอนไซม์ (%)	เวลา (นาที)	หมายเหตุ
1	12	1	45	- ตัวแปร pH ในการสกัด มี 5 ระดับ คือ pH 2, 4.5, 7, 9.5 และ 12
2	9.5	0.75	58	
3	4.5	0.25	58	
4	2	0	45	
5	9.5	0.75	32	- ตัวแปรเอนไซม์ ในการสกัด มี 5 ระดับ คือ 0, 0.25, 0.50, 0.75, และ 1% (w/w)
6	7	0.5	32	
7	7	0.5	45	
8	7	0.5	45	
9	7	0.5	45	- ตัวแปร เวลาในการสกัด มี 3 ระดับ คือ เวลา 32, 45 และ 58 นาที
10	7	0.5	45	

(1) การสกัดโดยใช้วิธีทางเคมี

ขั้นตอนการคัดเลือกสภาวะการสกัดโดยวิธีการทางเคมี แสดงในภาพที่ 2 โดยมีรายละเอียด ดังนี้

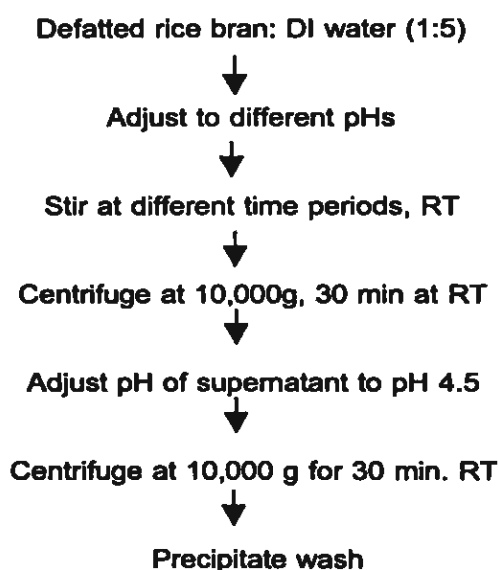
1. ชั่งน้ำหนักรำข้าวที่ผ่านการสกัดไขมันออกแล้ว 5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ (distilled deionized water) โดยอัตราส่วนของรำข้าวต่อน้ำ คือ 1 : 5 ทำการสกัดโปรตีนจากรำข้าวด้วยด่าง (alkali extraction) โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 N (NaOH 1.0 N) โดยปรับค่า pH ของสารละลาย ให้มีค่าตามที่ได้อ้างไว้ใน CCD ทำการคนตลอดเวลาโดยวางบนเครื่อง magnetic stirrer และควบคุมค่า pH ให้คงที่ตลอดระยะเวลาที่ต้องการศึกษา

2. นำสารละลายไปผ่านเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 30 นาที ที่สภาวะอุณหภูมิห้องเพื่อแยกตะกอนออกจากส่วนใส นำส่วนใสมาตกตะกอนที่จุดไอโซอิเล็กทริกที่ pH 4.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.0 N (HCl 1.0 N)

3. นำสารละลายที่ผ่านการตกตะกอนไปผ่านเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 30 นาที ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง เพื่อแยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอนและล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ pH 7

4. ทำตัวอย่างให้แห้งโดยใช้เครื่อง Freeze dryer และเก็บตัวอย่างในถุงพลาสติกปิดปากถุงให้สนิท และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

5. ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสารที่สกัดได้ โดยวิธี Kjeldahl (AOAC 40.1.06, 1995) และคำนวณปริมาณผลผลิตของโปรตีนเข้มข้นที่สกัดได้



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวโดยวิธีการทางเคมี

(2) การสกัดโดยใช้เอนไซม์

ขั้นตอนการคัดเลือกสภาวะการสกัดโดยใช้เอนไซม์ เอนไซม์ที่ใช้ คือ เอนไซม์Filtrase® BR ซึ่งอยู่ในรูปของเหลวที่ประกอบด้วย protease hemicellulase และ beta-glucanase ส่วนรายละเอียดอื่น ๆ ของเอนไซม์ แสดงไว้ในภาคผนวกที่ 2 วิธีการศึกษาการสกัดโดยใช้เอนไซม์ ได้ดัดแปลงจากวิธีของ Wang และคณะ (1999) และ Hamada (1999) ภาพที่ 3 แสดงขั้นตอนการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวโดยใช้เอนไซม์ โดยมีรายละเอียด ดังนี้

1. ชั่งน้ำหนักรำข้าว 5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์อัตราส่วนรำข้าวต่อน้ำ คือ 1 : 5 และเติมเอนไซม์ Filtrase® BR ในปริมาณที่ศึกษาให้มีค่าตาม

ที่ได้วางแผนไว้ใน CCD ทำการย่อยบนเครื่องเขย่าแบบหมุนวน (orbital shaker) ตามระยะเวลาที่ศึกษาโดยศึกษาที่สภาวะ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

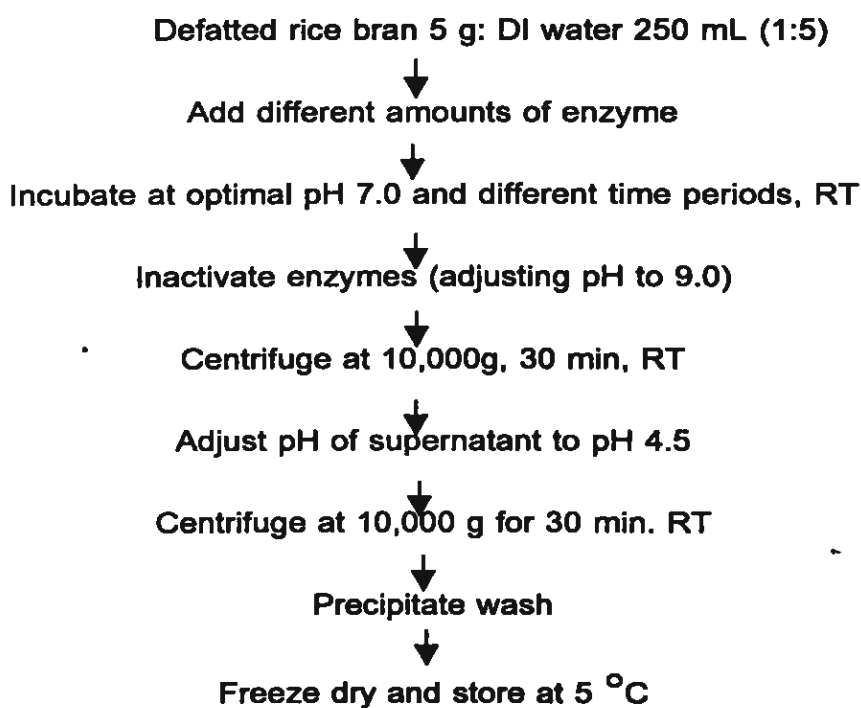
2. เมื่อย่อยโปรตีนครบตามเวลาที่กำหนด หยุดปฏิกิริยาโดยปรับ pH ของสารละลายเท่ากับ pH 9 จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 30 นาที เพื่อแยกตะกอนและส่วนใส

3. นำส่วนใสมาตกตะกอนที่จุดไอโซอิเล็กทริกที่ pH 4.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1.0 N

4. นำสารละลายที่ผ่านการตกตะกอนไปผ่านเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 30 นาที ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง เพื่อแยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอนและล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ pH 7

5. ทำตัวอย่างให้แห้งโดยใช้เครื่อง Freeze dryer และเก็บตัวอย่างในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิท และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

6. ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสารที่สกัดได้ โดยวิธี Kjeldahl (AOAC 40.1.06, 1995) และคำนวณเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของโปรตีนเข้มข้นที่สกัดได้



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวโดยใช้เอนไซม์

1.2.2 วิเคราะห์ผลการทดลอง

1. นำผลผลิตสุดท้าย ซึ่งเรียกว่า “โปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว” หรือ Rice Bran Protein Concentrate (RBPC) ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (protein content) โดยใช้วิธี Kjeldahl โดย

ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ใช้ conversion factor สำหรับคำนวณเปอร์เซ็นต์โปรตีน จากเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน คือ 5.95 และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิต (percent yield) โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักของรำข้าวเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักของโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว}}{\text{น้ำหนักของรำข้าวเริ่มต้น}} \times 100$$

2. นำข้อมูลปริมาณโปรตีนและเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้ ไปแสดงผลเป็นกราฟ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Statistica ในการวาดกราฟการตอบสนองโครงร่างพื้นผิว ซึ่งแสดงผลโดยใช้พื้นผิว (surface) และเส้นโค้ง (contour) แสดงในกราฟเดียวกัน ซึ่งในการใช้โปรแกรม Statistica นี้ จะได้สมการ regression ที่เป็นรูปเต็ม (full model) ด้วย

1.2.3 สรุปผลการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัด

ใช้การซ้อนทับกันของกราฟที่ได้จากวิธีการแสดงผลแบบการตอบสนองโครงร่างพื้นผิวของปริมาณโปรตีนและปริมาณผลผลิตเพื่อหาสภาวะการสกัดที่ให้ทั้งผลผลิตและปริมาณโปรตีนสูงที่สุดของแต่ละวิธี จากนั้นเลือกวิธีการที่ดีที่สุดจากสองวิธีที่ให้ปริมาณโปรตีนและผลผลิตสูงที่สุด เพื่อใช้เป็นต้นแบบของสภาวะการสกัดที่จะใช้ในการเตรียมโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวต่อไป

2. การประยุกต์ใช้โปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวในการทำขนมปัง

2.1 การผลิตขนมปังและการศึกษาการเติมโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวในระดับที่เหมาะสม

เมื่อคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวได้จากข้อ 1 แล้ว จึงทำการผลิต RBPC ในปริมาณที่มากขึ้น และใช้เป็นส่วนผสมในขนมปัง ทำโดยเลือกระดับการทดแทนที่เหมาะสม (1-5%) ของเปอร์เซ็นต์ของแป้งสาลี สูตรและวิธีการทำขนมปังแสดงในภาคผนวกที่ 3

2.2 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของขนมปัง

(1) ปริมาตรจำเพาะของขนมปัง (specific volume)

ชั่งน้ำหนักขนมปังที่จะตรวจสอบหลังจากขนมปังมีอุณหภูมิลดลงมาประมาณอุณหภูมิห้อง (27°C) ใส่ขนมปังลงในภาชนะที่มีความสูงและความกว้างมากกว่าขนาดของขนมปังที่จะตรวจสอบ

นำน้ำเติมลงในภาชนะที่มีความสูงและความกว้างมากกว่าขนาดของขนมปังที่จะตรวจสอบให้เต็มและเกลี่ยให้ผิวหน้าของภาชนะเรียบ จากนั้นเทน้ำทั้งหมดลงในกระบอกตวงที่มีขีดแบ่งปริมาตร เพื่อที่จะทราบปริมาตรของน้ำที่เติมภาชนะ

น้ำหนักบั้งที่ต้องการวัดค่าปริมาตรจำเพาะ ใส่ในพิมพ์เปล่าดังกล่าว จากนั้น ใส่เมล็ดงา เพื่อเติมส่วนที่เป็นช่องว่างให้เต็ม และเกลี่ยให้ผิวหน้าของภาชนะเรียบ เเทงที่ใช้ในขั้นตอนนี้ทั้งหมดลงในกระบอกตวงที่มีขีดแบ่งปริมาตร เพื่อที่จะทราบปริมาตรของงาที่เติมเต็มในภาชนะที่บรรจุขนมบั้ง ซึ่งน้ำหนักของขนมบั้งเพื่อแทนในสูตรการคำนวณหาปริมาตรจำเพาะของขนมบั้ง (cm^3/g) ดังนี้

$$\text{ปริมาตรจำเพาะ} = \frac{\text{ปริมาตรของงาที่เติมภาชนะ} - \text{ปริมาตรของงาที่เติมเต็มในภาชนะที่บรรจุขนมบั้ง}}{\text{น้ำหนักของขนมบั้ง}}$$

(2) การวัดร้อยละการสูญเสียน้ำระหว่างการอบ (weight loss)

ชั่งน้ำหนักของโดขนมบั้งก่อนอบ และน้ำหนักของขนมบั้งหลังจากอบ และนำออกจากพิมพ์ทันที และทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำมาชั่งน้ำหนัก นำค่าน้ำหนักของโดก่อนอบและน้ำหนักขนมบั้งหลังอบมาคำนวณหาร้อยละการสูญเสียน้ำระหว่างการอบ ดังนี้

$$\text{ร้อยละการสูญเสียน้ำระหว่างการอบ} = \frac{\text{น้ำหนักของโดก่อนอบ} - \text{น้ำหนักขนมบั้งหลังอบ}}{\text{น้ำหนักของโดก่อนอบ}} \times 100$$

2.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของขนมบั้ง

ศึกษาปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า เยื่อใย ความชื้น และคาร์โบไฮเดรต โดยใช้วิธีเดียวกับข้อ 1.

2.4 การศึกษาสมบัติทางจุลินทรีย์ของขนมบั้ง

สมบัติทางจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษา คือ จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ ทำได้โดยวิธี Total Plate Count รายละเอียดของวิธีการ แสดงในภาคผนวกที่ 4

2.5 การศึกษาอายุการเก็บของขนมบั้ง

โดยปกติแล้ว ขนมบั้งมีอายุการเก็บที่สั้นประมาณไม่เกิน 2 สัปดาห์ ถ้าเก็บที่อุณหภูมิห้อง ในการทดลองนี้ เนื่องจากสูตรขนมบั้งที่ใช้นั้นไม่มีส่วนผสมของสารกันเสีย (food additive) ใด ๆ ดังนั้น ผู้ทดลองจึงสนใจศึกษาอายุการเก็บของขนมบั้ง ที่ 2 สภาวะ คือ (1) ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ $25-27^\circ\text{C}$ และ (2) เก็บที่อุณหภูมิ 4°C (refrigerated temperature)

2.6 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของขนมบั้ง

ในการทดสอบทางประสาทสัมผัสของขนมบั้งสูตรผสมโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวนี้ ได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมเกี่ยวกับการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (เลขที่โครงการ/รหัส 46 02 04 0005) โดยมีผู้ทดสอบที่เป็นนิสิตและบุคลากรของคณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จำนวน 20 คน ซึ่งมีอายุระหว่าง 18-

36 ปี ก่อนเริ่มทดสอบ ผู้ทดสอบแต่ละคนจะได้รับทราบคำชี้แจงเกี่ยวกับกระบวนการและผลิตภัณฑ์ที่จะทดสอบ โดยใช้แบบฟอร์มของข้อมูลสำหรับอาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย หลังจากได้รับการชี้แจงแล้ว ผู้ทดสอบจะลงนามในใบแสดงความยินยอมการเข้าร่วมในโครงการวิจัย (Informed consent form)

วิธีการที่ใช้สำหรับการทดสอบความชอบหรือการยอมรับ คือวิธีที่เรียกว่า Hedonic Test วิธีนี้เป็นการทดสอบเพื่อหาอัตราความชอบ ซึ่งผู้ทดสอบจะรายงานอัตราของความชอบออกมาเป็นสเกลของความชอบที่เรียกว่า Hedonic scale สเกลที่ใช้จะแบ่งระดับของความชอบออกเป็นหลายระดับ อาจเป็น 5 7 หรือ 9 ระดับ ซึ่งแต่ละระดับจะมีทั้งที่เป็นคำบรรยายและจะมีการเปลี่ยนระดับนั้น ๆ เป็นตัวเลขเพื่อใช้ในการคำนวณและแสดงผลต่อไปได้ ผู้ทดสอบจะประเมินความชอบที่มีต่อคุณลักษณะต่าง ๆ ของตัวอย่าง ได้แก่ สี กลิ่น รสชาติ ลักษณะเนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม ข้อมูลเกี่ยวกับการทดสอบทางประสาทสัมผัส แสดงไว้ในภาคผนวกที่ 5

2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ทำได้โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) การทดสอบใช้ระดับนัยสำคัญที่ 5% ($\alpha=0.05$) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 10.0 และถ้ามีความแตกต่างระหว่างคู่ใด ๆ ของการทดสอบ จะใช้วิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT) เพื่อหาว่าค่าเฉลี่ยของตัวอย่างคู่ใดบ้างที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว

1.1 การสกัดไขมันออกจากรำข้าว

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวสดและรำข้าวที่ผ่านการสกัดไขมัน เป็นดังตารางที่ 3 และรูปของรำข้าวทั้งสองแบบแสดงในภาพที่ 4

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวสดและรำข้าวที่ผ่านการสกัดไขมัน

Composition (%)	รำข้าวสด	รำข้าวสกัดไขมัน
Moisture	8.5	12.43
Protein	12.6	13.89
Fat	21.13	1.92
Crude fiber	5.59	6.03
Ash	8.97	10.13
Carbohydrate	43.12	55.6

ปริมาณไขมันในรำข้าวที่ผ่านการสกัดไขมันปริมาณลดลงจาก 21.13% เป็น 1.92 % คิดเป็นปริมาณการลดลงประมาณ 90% ส่วนปริมาณสารอื่นๆ มีการเปลี่ยนแปลงบ้าง นอกจากนี้สิ่งที่สังเกตเห็นได้ชัด คือ สีของรำข้าวที่ผ่านการสกัดไขมันจะมีสีจางกว่ารำข้าวไขมันเต็ม



ภาพที่ 4 รำข้าวไขมันเต็ม (ซ้าย) และรำข้าวที่ผ่านการสกัดไขมันออก (ขวา)

1.2 การเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด RBPC

1.2.1 ผลการสกัดโดยใช้วิธีการทางเคมี

นำรำข้าวที่ผ่านการสกัดไขมันแล้วมาทำการสกัดโปรตีน โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีการทางเคมี โดยทดลองที่ pH 2, 4.5, 7, 9.5, 12 และระยะเวลาการสกัด 32 45 และ 58 นาที นำโปรตีนรำข้าวเข้มข้นที่สกัดได้ไปหาปริมาณโปรตีน และเปอร์เซ็นต์ผลผลิต ได้ผลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณโปรตีนและผลผลิตของโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวที่สกัดได้โดยวิธีการทางเคมี

สภาวะการทดลองที่	pH	เวลา (นาที)	ปริมาณโปรตีน (%)	ผลผลิต (%)
1	12	45	70.43	12.20
2	9.5	58	72.63	9.60
3	4.5	58	6.75	1.36
4	2	45	14.95	3.65
5	9.5	32	71.59	9.58
6	7	32	63.09	7.82
7	7	45	63.44	7.89
8	7	45	64.88	7.60
9	7	45	63.16	7.88
10	7	45	64.13	7.87

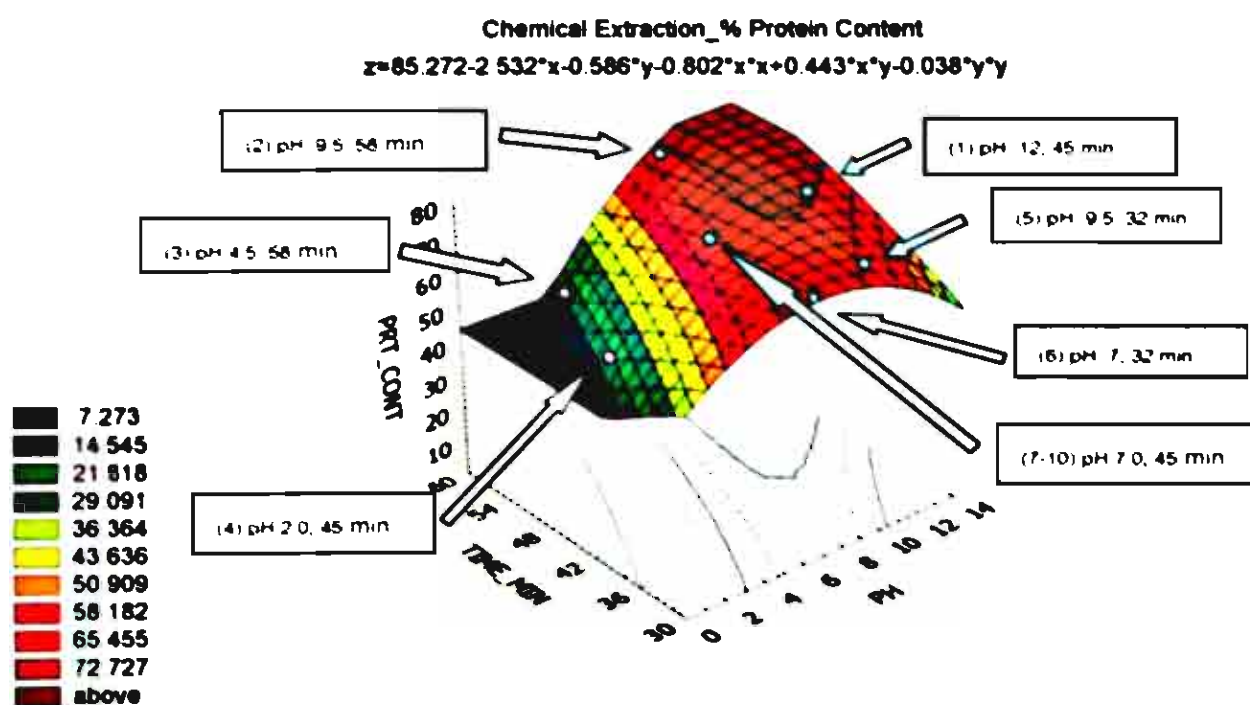
(1) การพิจารณาปริมาณโปรตีนของ RBPC ที่ได้

เมื่อนำข้อมูลปริมาณโปรตีนไปแสดงผลเป็นกราฟ โดยใช้โปรแกรม Statistica จะได้สมการกำลังสองที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน กับ pH และเวลา ที่เป็นรูปแบบเต็ม (full model) คือ

$$\text{Protein} = 85.272 - 2.532 \cdot \text{pH} - 0.586 \cdot \text{time} - 0.802 \cdot \text{pH}^2 + 0.443 \cdot \text{pH} \cdot \text{time} - 0.038 \cdot \text{time}^2$$

$R^2 = 0.977$(สมการที่ 1)

วิธีการที่ใช้แสดงผลในการวาดกราฟความสัมพันธ์ของสภาวะการสกัดและปริมาณโปรตีนที่ได้ คือ การตอบสนองโครงร่างพื้นผิว ภาพที่ 5 แสดงโครงร่างพื้นผิว และเส้นโค้ง contour ของความสัมพันธ์ดังกล่าว



ภาพที่ 5 กราฟ RSM ของปริมาณโปรตีนในโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวที่ได้จากการสกัดโดยใช้วิธีทางเคมี

จากกราฟ พื้นผิวและเส้น contour จะสอดคล้องกัน กล่าวคือ บริเวณที่เป็นเส้นโค้งรูปตัว U จะเป็นบริเวณที่มีปริมาณโปรตีนสูงสุด บริเวณดังกล่าว เป็นการสกัดที่สภาวะ pH สูง (pH ตั้งแต่ 9 ขึ้นไป) และใช้เวลาในการสกัดนานประมาณ 42-60 นาที ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้มีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นเมื่อ pH และระยะเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น จากสภาวะจริงในการทดลอง พบว่าโปรตีนในโปรตีนรำข้าวเข้มข้นที่สกัดได้มีปริมาณมากที่สุดที่ pH 9.5 เวลาในการสกัด 58 นาที (สภาวะการสกัดที่ 2) ซึ่งมีค่า 72.63% ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ที่มีค่าต่ำที่สุดอยู่ที่ pH 4.5 เวลา

ในการสกัด 58 นาที (สภาวะการสกัดที่ 3) ซึ่งมีค่า 6.75% เนื่องจากที่ pH 4.5 โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงประจุทำให้ประจุสุทธิเป็นศูนย์ จึงเกิดการจับตัวกันและตกตะกอน ที่ระดับ pH เท่ากับ 2 ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อยคือ 14.95% เนื่องจาก phytase ซึ่งเป็นเอนไซม์ประกอบที่พบในรำข้าวสามารถละลายน้ำได้ในระดับความเป็นกรดต่างที่เป็นกรดและฟอร์มคอมเพล็กซ์ (form complex) กับ cationic protein ได้ดี จึงเป็นสาเหตุให้โปรตีนละลายได้น้อย (Bera และ Mukherjee, 1989)

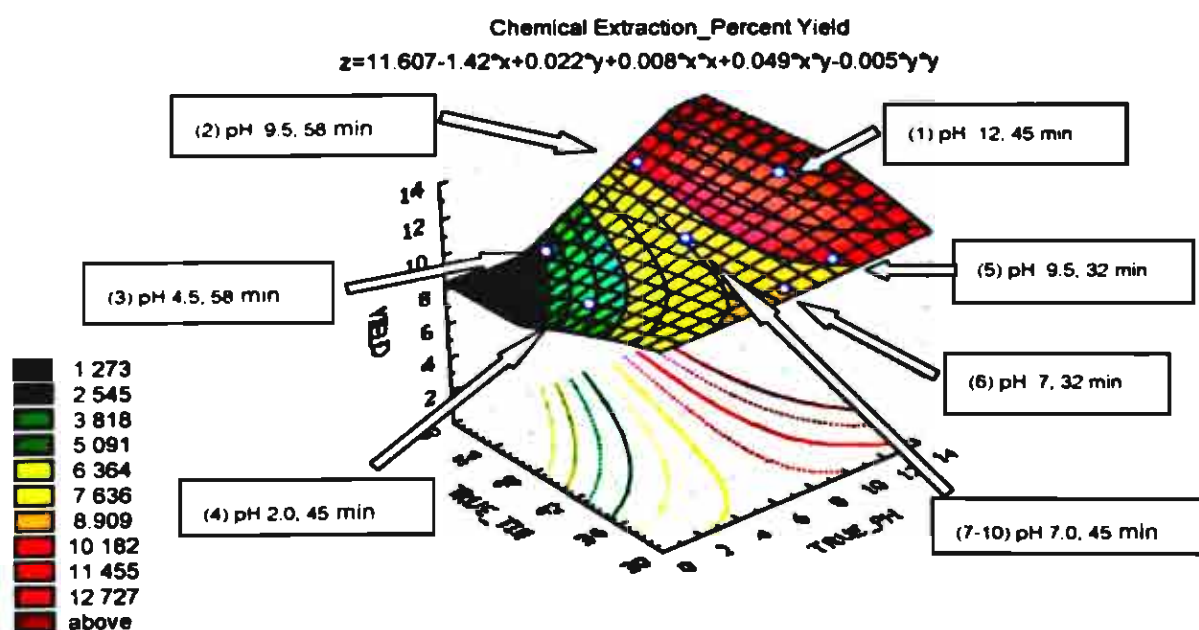
(2) การพิจารณาปริมาณผลผลิตของ RBPC

เมื่อนำข้อมูลผลผลิตที่สกัดได้ที่สภาวะต่าง ๆ มาศึกษาในทำนองเดียวกันกับการศึกษาปริมาณโปรตีน พบว่าสมการการถดถอยแบบ full model ที่ได้ คือ

$$\text{Yield} = 11.607 - 1.42 \cdot \text{pH} + 0.222 \cdot \text{time} + 0.008 \cdot \text{pH}^2 + 0.049 \cdot \text{pH} \cdot \text{time} - 0.005 \cdot \text{time}^2$$

; $R^2 = 0.995$(สมการที่ 2)

กราฟของการตอบสนองโครงร่างพื้นผิว แสดงดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 กราฟ RSM ของเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวที่ได้จากการสกัดโดยใช้วิธีการทางเคมี

จากภาพที่ 6 การพิจารณาพื้นผิว ร่วมกับเส้น contour ของเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้ พบว่าที่สภาวะการสกัดที่ pH ต่ำ ๆ เช่น pH 2-4.5 จะให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ต่ำ และเปอร์เซ็นต์ผลผลิตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อค่า pH และระยะเวลาในการสกัดที่เพิ่มขึ้น ที่สภาวะการทดลองสกัดที่

pH 12 เวลา 45 นาที และที่ pH 4.5 เวลา 58 นาที ให้ผลผลิตสูงสุดและต่ำที่สุด คือ 12.2 และ 1.36 % ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม จะเห็นว่าปริมาณผลผลิตที่ได้จากการสกัดจะมีเปอร์เซ็นต์น้อยมาก แสดงให้เห็นว่าในการสกัดเพื่อให้ได้ปริมาณผลผลิตสุดท้ายในปริมาณที่มากนั้น ต้องเริ่มต้นจากวัตถุดิบที่มีปริมาณสูงมาก

ในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนเข้มข้น โดยวิธีการทางเคมีในการทดลองนี้จะพิจารณา RSM ของภาพที่ 4 และ 5 พร้อมกัน โดยการซ้อนกราฟทั้งสอง จะเห็นได้ว่าจะมีส่วนที่คาบเกี่ยวกัน (intersection) นั่นคือสภาวะการสกัดที่ให้ปริมาณโปรตีน และผลผลิตที่สูงที่สุดมีสองสภาวะ คือ ที่สภาวะ pH 12 เวลา 47 นาที และ pH 11 เวลา 45 นาที โดยรูปแบบการสกัดโปรตีนเข้มข้นที่ได้สอดคล้องกับการรายงานของ Chen และ Houston (1970) ซึ่งรายงานว่า ปริมาณของโปรตีนที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงจากระดับความเป็นกรดต่าง 7.5 ถึง 11 และจะลดลงที่ระดับความเป็นกรดต่าง 12 เนื่องจากการละลายของไนโตรเจนที่ไม่ใช่ของค์ประกอบของโปรตีน (non-protein nitrogen) ทำให้ความบริสุทธิ์ของโปรตีนจะลดลงเมื่อสกัดที่ระดับความเป็นกรดต่าง 12 และมีผลทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ ในสภาวะที่เป็นต่างอาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงหลายๆ อย่างในกรดอะมิโน และเป็นผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ lysinoalanine และ lanthionine และทำให้คุณค่าทางโภชนาการลดลง การใช้ระดับความเป็นกรดต่างสูงๆ พร้อมๆ กับการใช้อุณหภูมิสูงๆ ทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพและเกิดกลิ่นรสที่ไม่ต้องการได้ จากเหตุผลดังกล่าวแสดงว่าปริมาณผลผลิตที่เพิ่มมากขึ้นอาจเนื่องจากการละลายของสารประกอบที่ไม่ใช่โปรตีน ดังนั้นจึงเลือกสภาวะในการสกัดคือ ค่าความเป็นกรดต่าง 11 ระยะเวลา 45 นาที ที่จะทำให้ผลการสกัดได้ปริมาณโปรตีนสูงถึง 76.34 % และผลผลิตสูงถึง 12.2 % ซึ่งค่าที่ระบุนี้ เป็นค่าที่อ่านได้จากการซ้อนทับกันของกราฟ RSM ดังกล่าว

1.2.2 ผลการสกัดโดยใช้เอนไซม์

การใช้เอนไซม์ในการสกัด มีวิธีวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับการสกัดโดยวิธีทางเคมี นั่นคือ วาดกราฟความสัมพันธ์ โดยใช้ RSM และโดยการซ้อนทับกันของกราฟทั้งสอง จะได้สภาวะการสกัดที่ให้ปริมาณโปรตีนและปริมาณผลผลิตสูงสุด ตารางที่ 5 แสดงปริมาณโปรตีนและผลผลิตที่ได้จากการทดลองที่สภาวะการสกัดต่าง ๆ โดยใช้เอนไซม์

ตารางที่ 5 ปริมาณโปรตีนและผลผลิตของโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวที่สกัดโดยใช้เอนไซม์

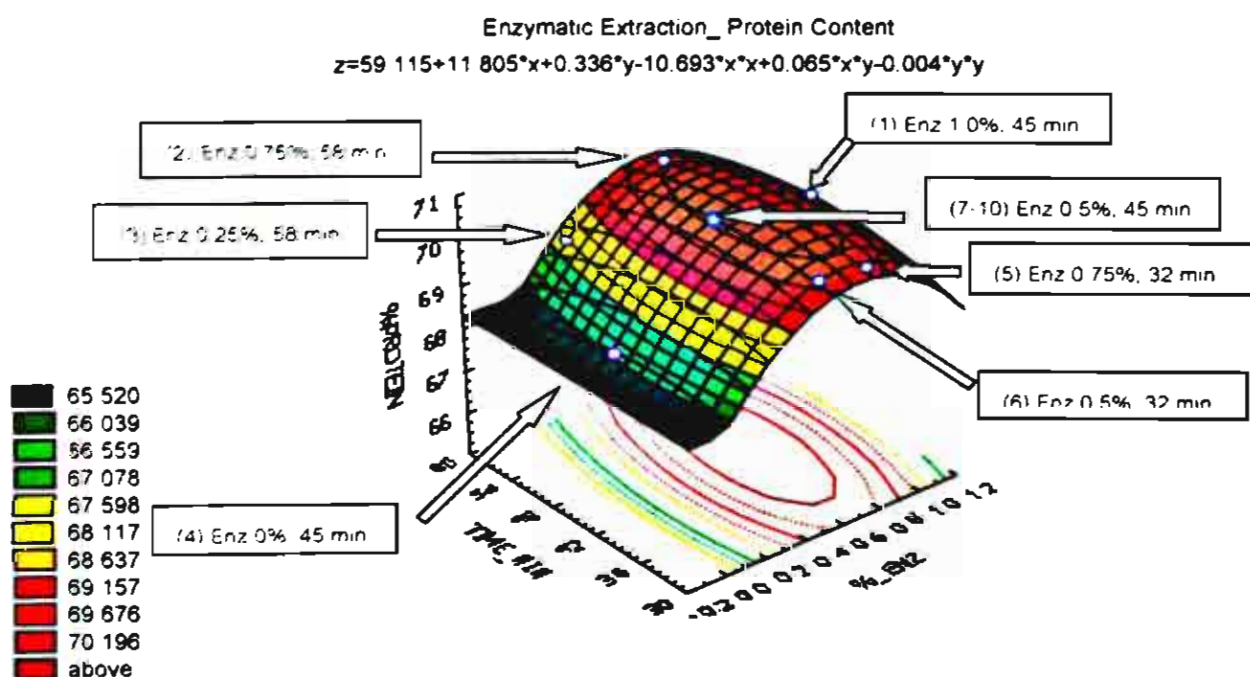
สภาวะการทดลองที่	ปริมาณเอนไซม์ (%)	เวลา (นาที)	ปริมาณโปรตีน (%)	ผลผลิต (%)
1	1	45	69.78	8.03
2	0.75	58	69.91	8.02
3	0.25	58	67.64	7.61
4	0	45	65.59	7.56
5	0.75	32	69.76	8.07
6	0.5	32	69.96	7.97
7	0.5	45	70.39	8.06
8	0.5	45	70.25	8.05
9	0.5	45	70.35	8.06
10	0.5	45	70.32	8.05

(1) การพิจารณาปริมาณโปรตีนของ RBPC ที่ได้

สมการ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนที่สกัดโดยใช้เอนไซม์กับปริมาณเอนไซม์และเวลา และเมื่อวาดกราฟ RSM ได้ดังภาพที่ 7

$$\text{Protein} = 59.115 + 11.805 \cdot \text{enz} + 0.336 \cdot \text{time} - 10.693 \cdot \text{enz}^2 + 0.065 \cdot \text{enz} \cdot \text{time} - 0.004 \cdot \text{time}^2$$

$R^2 = 0.998$ (สมการที่ 3)



ภาพที่ 7 กราฟ RSM ของปริมาณโปรตีนในโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวที่ได้จากการสกัดโดยใช้เอนไซม์

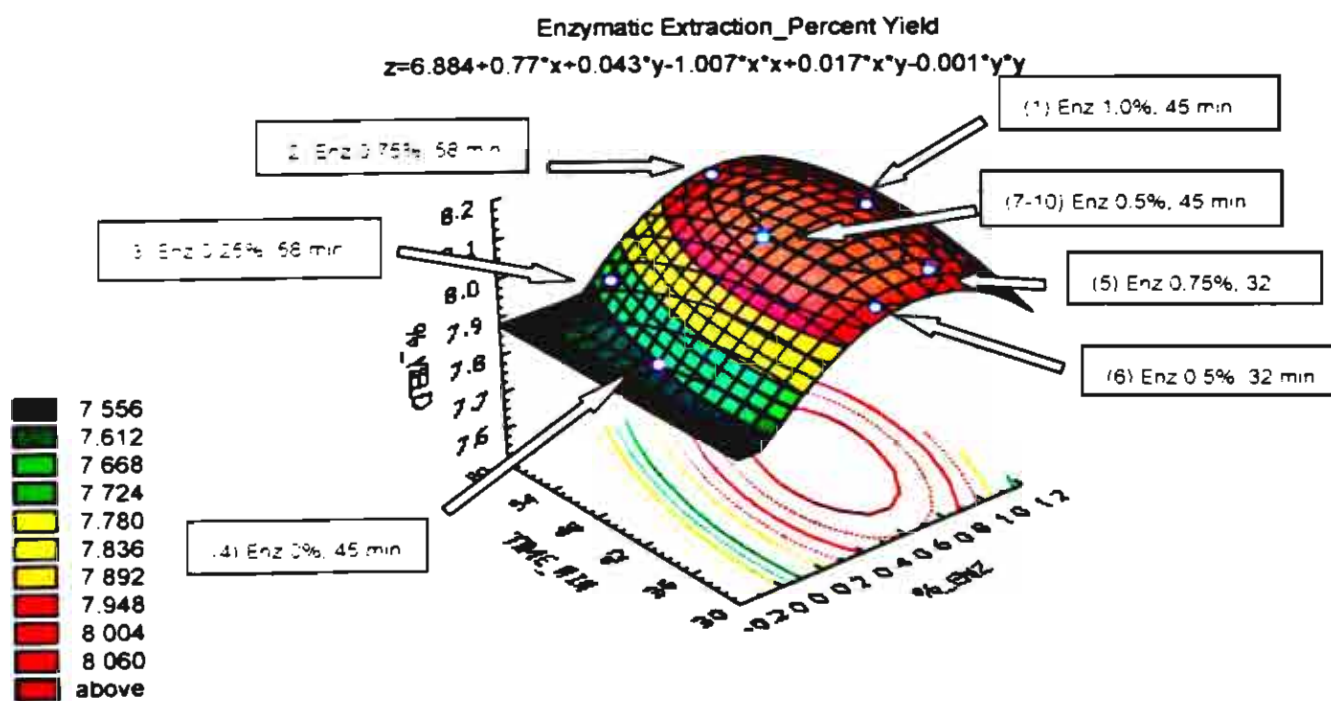
จากภาพที่ 7 เมื่อพิจารณาพื้นผิวและเส้น contour ของแนวโน้มของปริมาณโปรตีน พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ในการสกัดในปริมาณเพิ่มมากขึ้นปริมาณโปรตีนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเช่นกัน เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เท่ากับ 0.5 % ระยะเวลา 42 นาที ที่ระดับ 0.7 % ระยะเวลา 34 - 56 นาที และที่ระดับ 1.0 % ระยะเวลา 42 นาที คือ สภาวะในการสกัดที่ให้ปริมาณโปรตีนสูงสุดซึ่งอยู่ในเส้น contour เดียวกัน จะเห็นได้ว่าแม้จะเพิ่มปริมาณเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น แต่ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เนื่องจากโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบอยู่ในรำข้าว ในส่วนที่สามารถละลายได้ถูกย่อยสลายใกล้ถึงจุดสมดุลระหว่างวัตถุเริ่มต้นคือโปรตีนในรำข้าว และตัวกระตุ้นการย่อยสลายคือปริมาณเอนไซม์ ฉะนั้นแม้จะเพิ่มปริมาณเอนไซม์ก็ไม่มีผลต่อการเพิ่มค่าการละลายของโปรตีน และอาจจะมีผลจากปัจจัยอื่นร่วมด้วย เช่น เกิดจากการยับยั้งการละลายของโปรตีนจากผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Wang และคณะ, 1999)

(2) การพิจารณาปริมาณผลผลิตของ RBPC

สมการที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ผลผลิตกับปริมาณเอนไซม์และเวลาในการสกัด และเมื่อวาดกราฟ RSM ได้ดังภาพที่ 8

$$\text{Percent yield} = 6.884 + 0.770 \cdot \text{enz} - 0.043 \cdot \text{time} - 1.007 \cdot \text{enz}^2 + 0.017 \cdot \text{enz} \cdot \text{time} - 0.001 \cdot \text{time}^2$$

($R^2 = 0.991$) (สมการที่ 4)



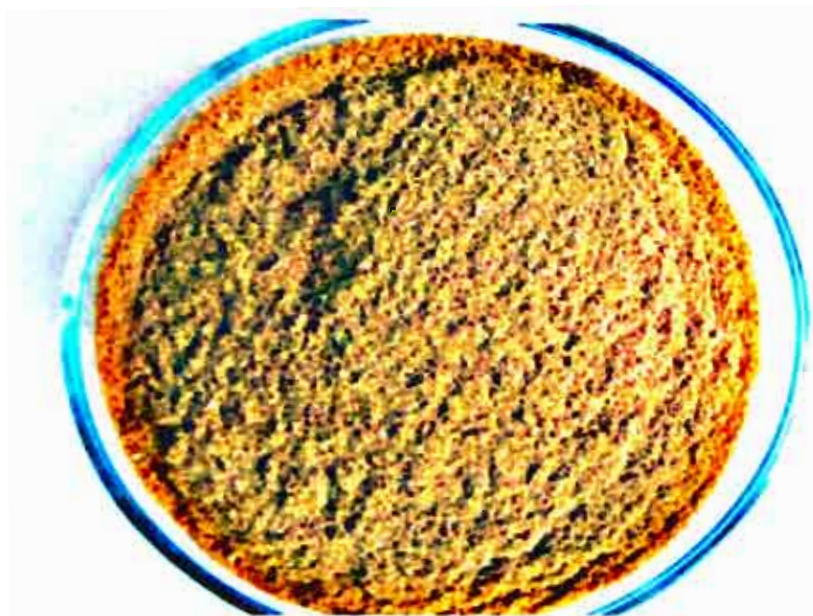
ภาพที่ 8 กราฟ RSM ของปริมาณผลผลิตของโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวที่ได้จากการสกัด โดยใช้เอนไซม์

จากภาพที่ 8 ปริมาณผลผลิตของโปรตีนที่สกัดได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ และระยะเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น ช่วงปริมาณเอนไซม์ช่วง 0.5 – 1.0 % ระยะเวลาในการสกัด 34 – 54 นาที เป็นสภาวะในการสกัดที่มีผลทำให้ได้ปริมาณผลผลิตสูงสุด เมื่อพิจารณาภาพที่ 4 และ 5 พร้อมกันโดยการวางซ้อนทับกัน พบว่าจะมีส่วนที่คาบเกี่ยวกัน สภาวะดังกล่าวคือสภาวะการสกัดโปรตีนด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ที่ให้ปริมาณโปรตีน และปริมาณผลผลิตที่สูงที่สุดคือ ที่ปริมาณเอนไซม์ 0.5% ระยะเวลา 40 นาที และปริมาณเอนไซม์ 0.6% ระยะเวลา 35 นาที ซึ่งทั้งสองสภาวะมีปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ไม่มีค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นเพื่อเป็นการประหยัดปริมาณเอนไซม์ ซึ่งเป็นต้นทุนในการผลิตจึงเลือกสภาวะการสกัดที่ปริมาณเอนไซม์ 0.5 % ระยะเวลา 40 นาที ทำให้สกัดโปรตีนได้ในปริมาณสูงถึง 70.71% และปริมาณผลผลิตสูงถึง 7.5 % ซึ่งค่าที่ระบุนี้ เป็นค่าที่อ่านได้จากการซ้อนทับกันของกราฟ RSM ดังกล่าว

จากผลการทดลองเปรียบเทียบการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว ด้วยวิธีทางเคมีและการใช้เอนไซม์ โดยพิจารณาสภาวะที่ดีที่สุดจากทั้งสองวิธี พบว่า การใช้วิธีการทางเคมีให้ปริมาณโปรตีนและเปอร์เซ็นต์ผลผลิตสูงกว่าทั้งที่สภาวะการทดลองจริงและการใช้สมการ regression ในการทำนาย ดังนั้น จึงเลือกการสกัดโดยใช้วิธีการทางเคมี โดยใช้ pH 11 และเวลา 45 นาที ในการศึกษาต่อไป

เมื่อทดลองสกัดโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวซ้ำอีกครั้ง โดยใช้สภาวะที่คัดเลือกแล้ว ได้ผลิตภัณฑ์ที่ใช้สำหรับเป็นส่วนผสมในการทำขนมปัง ที่มีองค์ประกอบทางเคมี คือ ปริมาณโปรตีน 72.69 % ไขมัน 3.31 % ความชื้น 2.25 % เถ้า 1.98 % เยื่อใย 1.40 % และคาร์โบไฮเดรต 18.37 % และเมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีน ปรากฏว่าปริมาณโปรตีนที่ได้ (72.69 %) มีค่าน้อยกว่าค่าที่ทำนายโดยใช้ผลจาก RSM (76.34%) ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากสาเหตุหลายประการ เช่น ความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นในการทดลอง เนื่องมาจากการสกัด เช่น (1) การปรับ pH (2) การหาค่าปริมาณโปรตีน (3) การทำนายค่า โดยใช้กราฟ RSM เป็นต้น ดังนั้น เพื่อเพิ่มความถูกต้องให้กับการทำนายค่าจากสมการ regression สำหรับการทดลองในอนาคต จึงควรสกัด RBPC ที่สภาวะนี้หลาย ๆ ครั้ง แล้ววิเคราะห์ผลทางสถิติ เพื่อตรวจสอบว่าค่าทำนายกับค่าจริงที่ได้จากการทดลองนั้น มีความสัมพันธ์กันหรือไม่ เพียงใด

ผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากการนำ defatted rice bran ไปสกัดให้เหลือเฉพาะส่วนที่เป็นโปรตีน ได้เป็น โปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว เป็นผงละเอียดสีน้ำตาลอ่อน แสดงในภาพที่ 9 ซึ่ง RBPC นี้ จะถูกนำไปใช้เป็นส่วนผสมในการทำขนมปังต่อไป



ภาพที่ 9 โปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว

2. . การใช้โปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวเป็นส่วนผสมในขนมปัง

ตัวอย่างขนมปังสูตรมาตรฐาน (ไม่มีการเติมโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว) และขนมปังสูตรที่มีการเติมโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวตั้งแต่ 1-5% ถูกนำมาศึกษาสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี ทางจุลินทรีย์ อายุการเก็บ และสมบัติทางประสาทสัมผัส ได้ผลดังตารางที่ 6-10

2.1 สมบัติทางกายภาพของขนมปัง

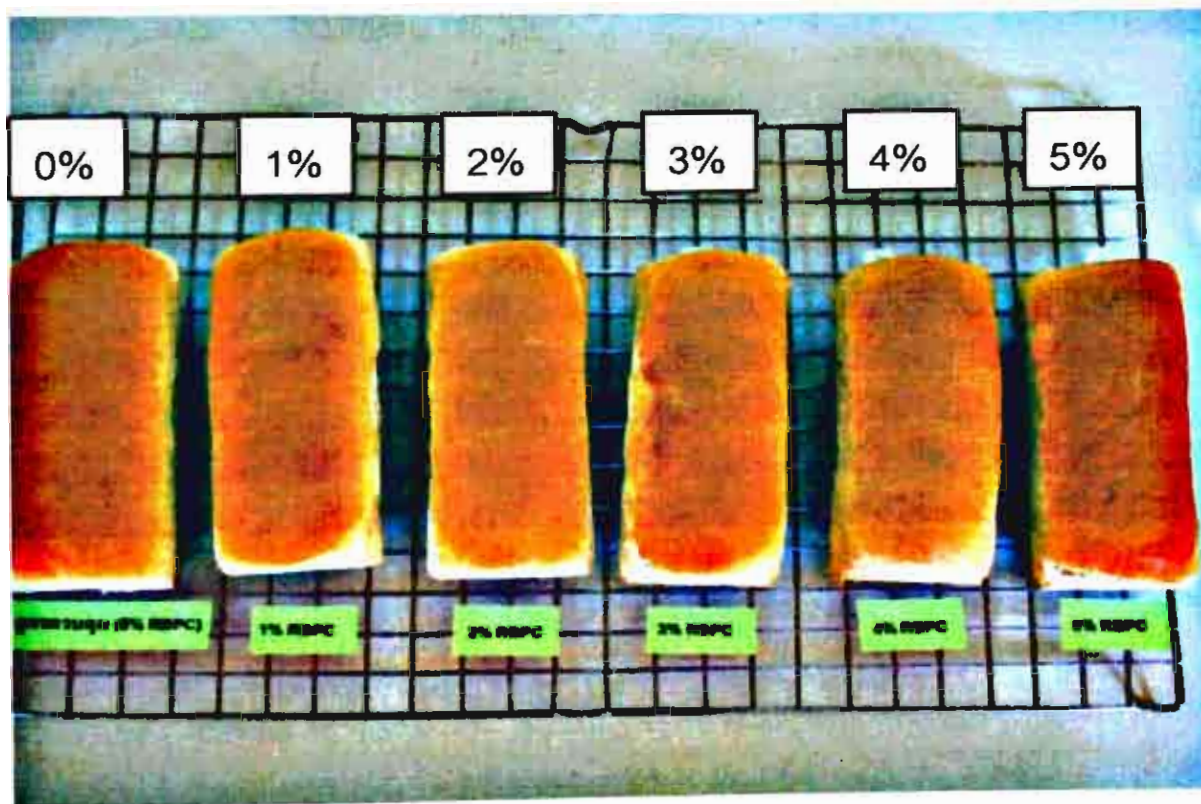
ผลของสมบัติทางกายภาพที่ทำการศึกษา แสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สมบัติทางกายภาพของขนมปัง

% Substitution	Specific volume (cm ³ /g)	Weight loss (%)
0.0	4.650	43.95
1.0	4.545	42.16
2.0	4.361	45.19
3.0	4.295	42.73
4.0	4.185	40.17
5.0	4.128	30.42

ปริมาตรจำเพาะของขนมปังสูตรมาตรฐาน (0% RBRC) มีค่ามากที่สุด และปริมาตรจำเพาะของขนมปังสูตรที่มีการเติมโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวปริมาณที่มากขึ้น จะมีลดลงเป็นลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 10 แต่อย่างไรก็ตาม การเพิ่มปริมาณโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว จะช่วย

ในการลดเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่สูญเสียระหว่างการอบของขนมปัง เป็นที่น่าสังเกตว่า เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างขนมปัง พบว่าการเติมโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวในปริมาณที่มากขึ้น จะทำให้แป้งมีความเหนียวมากขึ้น ในขณะที่น้ำหนักของโดลดลง เนื่องจากโปรตีนดังกล่าวสามารถจับตัวกับน้ำที่มีอยู่ในส่วนผสมได้ดี และอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้ขนมปังสามารถอุ้มน้ำได้ดี แต่มีผลทำให้ขนมปังมีการฟูน้อยลง หรือกล่าวได้ว่า มีความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity) จึงเป็นผลทำให้ลดค่าปริมาตรจำเพาะและลดเปอร์เซ็นต์การสูญเสีย น้ำระหว่างการอบได้



ภาพที่ 10 ขนมปังสูตรควบคุม (0%) และขนมปังสูตรผสมโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว (1-5%)

2.2 องค์ประกอบทางเคมีของขนมปัง

ตารางที่ 7 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของขนมปัง ซึ่งประกอบด้วยไขมัน เถ้า โปรตีน ความชื้น เยื่อใย และคาร์โบไฮเดรต

ตารางที่ 7 องค์ประกอบทางเคมีของขนมปัง

% RBPC	ไขมัน (%)	เถ้า (%)	โปรตีน (%)	ความชื้น (%)	เยื่อใย (%)	คาร์โบไฮ เดรต (%)
0	7.53 ± 0.20 ^a	0.69 ± 0.01 ^a	9.01 ± 0.05 ^a	28.53 ± 0.27 ^c	0.49 ± 0.02 ^a	53.86 ± 0.11 ^c
1.0	7.67 ± 0.22 ^a	0.71 ± 0.01 ^a	9.84 ± 0.16 ^b	29.74 ± 0.04 ^a	1.68 ± 0.15 ^b	50.25 ± 0.00 ^b
2.0	7.71 ± 0.02 ^a	0.70 ± 0.02 ^a	10.16 ± 0.15 ^c	30.55 ± 0.17 ^f	2.00 ± 0.01 ^c	49.03 ± 0.46 ^a
3.0	7.63 ± 0.56 ^a	0.69 ± 0.02 ^a	10.52 ± 0.15 ^d	28.82 ± 0.01 ^d	2.19 ± 0.12 ^c	50.07 ± 0.30 ^b
4.0	7.95 ± 0.32 ^a	0.67 ± 0.02 ^a	11.59 ± 0.12 ^e	27.81 ± 0.05 ^b	2.50 ± 0.01 ^d	49.65 ± 0.17 ^{ab}
5.0	8.31 ± 0.21 ^a	0.70 ± 0.02 ^a	12.10 ± 0.02 ^f	27.17 ± 0.11 ^a	2.59 ± 0.13 ^d	49.08 ± 0.21 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 5% โดยวิธี DMRT

จากตารางที่ 7 เมื่อพิจารณาองค์ประกอบแต่ละชนิด พบว่า ปริมาณไขมัน และปริมาณเถ้าของทุกตัวอย่างมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงด้วยตัวอักษรยกที่เหมือนกัน ตารางของผลการวิเคราะห์ ANOVA แสดงในภาคผนวกที่ 6

เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนและความชื้น พบว่าผลการทดลองมีผลเหมือนกัน กล่าวคือ ตัวอย่างทุกตัวอย่างที่ทำการศึกษามีปริมาณโปรตีนและความชื้นที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่การเพิ่มปริมาณ RBPC ในสูตรขนมปัง มีผลทำให้ปริมาณโปรตีนในขนมปังมีค่ามากขึ้นเป็นลำดับ ในขณะที่ปริมาณความชื้นมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นลง โดยที่ขนมปังสูตร 5% RBPC และ 2% RBPC มีปริมาณความชื้นน้อยที่สุดและมากที่สุด คือ 27.17% และ 30.55% ตามลำดับ

ปริมาณเยื่อใยของขนมปังสูตรมาตรฐาน มีค่าต่ำที่สุดคือ 0.49% และมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณ RBPC แต่เป็นที่สังเกตว่าปริมาณเยื่อใยของขนมปังคู่ที่มี 2% และ 3% RBPC และขนมปังคู่ที่มี 4% และ 5% RBPC มีค่าสูงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากรำข้าวถือเป็นแหล่งของกากอาหารหรือไฟเบอร์ที่ดี และมีประโยชน์ต่อระบบขับถ่ายของมนุษย์ (สรจักร, 2544) จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของ RBPC ที่เติมในขนมปัง พบว่า RBPC มีปริมาณเยื่อใย 1.40% ดังนั้น จากผลการทดลองนี้ การเติม RBPC ลงในขนมปัง แสดงให้เห็นว่าสามารถช่วยเพิ่มปริมาณกากอาหาร ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการบริโภคได้

2.3 สมบัติทางจุลินทรีย์ของขนมปัง

ตารางที่ 8 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (cfu/ml) ของขนมปังที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

DAY	0 % RBPC	1 % RBPC	2 % RBPC	3 % RBPC	4% RBPC	5% RBPC
1	2.00×10^3 ^{b(A)}	7.00×10^3 ^{c(A)}	9.50×10^2 ^{ab(A)}	1.00×10^2 ^{a(A)}	2.45×10^3 ^{b(A)}	1.15×10^3 ^{ab(A)}
2	3.50×10^4 ^{b(A)}	3.65×10^3 ^{a(A)}	9.50×10^2 ^{a(A)}	3.50×10^2 ^{a(A)}	1.20×10^3 ^{a(A)}	4.00×10^2 ^{a(A)}
3	1.27×10^6 ^{d(AB)}	6.75×10^5 ^{c(B)}	1.80×10^5 ^{b(A)}	1.95×10^5 ^{b(B)}	6.00×10^4 ^{a(A)}	2.50×10^4 ^{a(A)}
4	1.63×10^6 ^{b(B)}	5.70×10^5 ^{a(B)}	6.90×10^5 ^{ab(B)}	2.80×10^5 ^{a(B)}	5.10×10^5 ^{a(B)}	1.35×10^5 ^{a(B)}
Mean	7.35×10^6 ^b	3.13×10^6 ^a	2.17×10^6 ^a	1.18×10^6 ^a	1.43×10^6 ^a	4.03×10^5 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษร Small letters ที่แตกต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($\alpha = 5\%$) โดยวิธี DMRT ตัวอักษร Capital letters (ในวงเล็บ) ที่แตกต่างกันในแนวดิ่ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($\alpha = 5\%$) โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 8 แสดงปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ของขนมปังที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ในแต่ละวันที่สังเกตนั้น พบว่า วันที่ 1 ขนมปัง มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์อยู่ระหว่าง 1.0×10^2 cfu/ml (3% RBPC) และ 7.0×10^3 cfu/ml (1% RBPC) จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันอย่างเด่นชัดระหว่างขนมปังสูตรควบคุมและสูตรทดลอง ปรากฏในวันที่ 2 โดยที่จำนวนเชื้อของขนมปังสูตรควบคุมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับขนมปังสูตรทดลองทุกสูตร (1-5% RBPC)

ในวันที่ 3 จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ของขนมปังสูตรควบคุมมีมากกว่าขนมปังสูตรทดลองทุกสูตรเช่นเดียวกับวันที่ 2 แต่อย่างไรก็ตาม ขนมปังสูตรที่เติม 2% และ 3% RBPC มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่พบไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับขนมปังสูตรที่เติม 4% และ 5% RBPC (แสดงด้วยตัวอักษรยกที่เหมือนกัน)

ในวันที่ 4 นั้น จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่พบมีแนวโน้มคล้ายคลึงกับวันที่ 3 คือจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ของขนมปังสูตรควบคุมมีมากกว่าขนมปังสูตรทดลองทุกสูตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เมื่อมีการเพิ่มปริมาณ RBPC ทำให้จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในตัวอย่างขนมปังมีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบ ปรากฏว่าขนมปังสูตรที่มีการเติม 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, และ 5% RBPC มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เฉลี่ยที่พบทั้ง 4 วัน เท่ากับ 7.35×10^6 , 3.13×10^6 , 2.17×10^6 , 1.18×10^6 , 1.43×10^6 และ 4.03×10^5 cfu/ml ตามลำดับ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ของขนมปังสูตรควบคุมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับขนมปังสูตรทดลองทุกสูตร ในขณะที่ขนมปังสูตรทดลองแต่ละสูตร มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การเติม RBPC ในสูตรขนมปังมีส่วนช่วยในการลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ตรวจพบได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อพิจารณาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในขนมปังสูตรเดียวกันแต่เวลาแตกต่างกัน ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 4 ซึ่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษ (capital letter) ที่ต่างกัน การพิจารณาเช่นนี้ จะช่วยในการตรวจสอบแนวโน้มของการเสื่อมเสีย เนื่องจากจำนวน เชื้อจุลินทรีย์ว่าขนมปังเริ่มมีการเสื่อมเสียรวดเร็วเพียงใด เมื่อเพิ่มเวลาในการเก็บ จำนวนเชื้อจุลินทรีย์จะมากขึ้นตามลำดับ จากผลการทดลอง ขนมปังสูตรควบคุม สูตรที่เติม 1% RBPC และสูตรที่เติม 3% เริ่มมีปริมาณจุลินทรีย์ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวันที่ 2 ปรากฏ ณ วันที่ 3 ที่ทำการทดลอง ในขณะที่ขนมปังสูตรที่เติม 2% 4% และ 5% RBPC มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่แตกต่างจากวันเริ่มสังเกต ปรากฏ ณ วันที่ 4 ซึ่งแสดงว่าขนมปังที่เติม RBPC ในปริมาณสูง สามารถเก็บรักษาได้นานกว่าขนมปังสูตรควบคุม ผลการทดลองดังกล่าวสามารถใช้เป็นแนวทางคร่าว ๆ เกี่ยวกับการตัดสินใจว่าการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เป็นเวลากี่วัน จึงจะปฏิเสธการยอมรับ (reject) ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวอันเนื่องจากการเสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์

2.4 อายุการเก็บของขนมปัง

การศึกษาอายุการเก็บ ศึกษาที่อายุการเก็บที่อุณหภูมิห้อง ($25-27^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 4 วัน และอุณหภูมิตู้เย็น (4°C) เป็นเวลา 15 วัน พบว่า โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า (visual observation) ขนมปังที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง เกิดการเสื่อมเสียภายใน 4 วัน นั่นคือ เริ่มสังเกตเห็นเชื้อราสีขาวหรือสีเขียว ในวันที่ 4 นับจากวันผลิต โดยมีระดับของการเสื่อมเสียที่สังเกตได้ด้วยตาแตกต่างกัน ขนมปังสูตรมาตรฐานและสูตรที่มีการเติม 1% RBPC มีการเสื่อมเสียมากที่สุด การเติม RBPC ในขนมปังในปริมาณที่มากขึ้น มีการเสื่อมเสียที่สังเกตได้ในระดับน้อยลง ส่วนขนมปังที่เก็บที่อุณหภูมิตู้เย็น ไม่สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ภายในระยะเวลา 15 วัน ที่ทำการสังเกต ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 อายุการเก็บของขนมปัง

% Substitution	Ambient temperature	Refrigerated temperature
0.0	++++	-
1.0	++++	-
2.0	+	-
3.0	+	-
4.0	++	-
5.0	++	-

หมายเหตุ + คือ ขนมปังมีการเสื่อมเสียน้อย
 ++ คือ ขนมปังมีการเสื่อมเสียปานกลาง
 +++ คือ ขนมปังมีการเสื่อมเสียมากที่สุด
 - คือ ไม่พบการเสื่อมเสียของขนมปัง

2.5 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของขนมปัง

สำหรับการทดสอบทางประสาทสัมผัส คณะผู้เชี่ยวชาญความชอบของผู้ทดสอบชิมทั้ง 20 คน ที่มีต่อคุณลักษณะด้านสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบรวมของขนมปัง แสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 คณะผู้เชี่ยวชาญความชอบที่มีต่อคุณลักษณะต่าง ๆ ของขนมปัง

คุณลักษณะที่ทดสอบ	% ของโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวในสูตรขนมปัง					
	0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
ด้านสี	7.35 ± 1.87 ^b	6.25 ± 1.37 ^a	6.10 ± 0.97 ^a	6.05 ± 0.94 ^a	5.60 ± 1.76 ^a	6.35 ± 1.46 ^a
ด้านกลิ่น	6.75 ± 1.61 ^b	5.75 ± 1.74 ^a	5.85 ± 1.13 ^a	5.20 ± 1.82 ^a	5.25 ± 1.48 ^a	5.50 ± 1.73 ^a
ด้านรสชาติ	7.47 ± 0.91 ^b	6.70 ± 1.65 ^{ab}	6.07 ± 1.54 ^a	6.20 ± 1.05 ^a	5.90 ± 1.91 ^a	6.42 ± 1.38 ^a
ด้านเนื้อสัมผัส	6.95 ± 1.87 ^b	6.85 ± 1.26 ^{ab}	6.15 ± 1.46 ^{ab}	5.85 ± 1.81 ^{ab}	5.80 ± 1.93 ^a	6.00 ± 2.05 ^{ab}
ความชอบรวม	7.55 ± 1.39 ^c	6.80 ± 1.28 ^{bc}	5.90 ± 1.51 ^a	6.10 ± 1.20 ^{ab}	5.80 ± 1.60 ^a	6.25 ± 1.33 ^{ab}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผู้ทดสอบ 20 คน

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 5% โดยวิธี DMRT

จากตารางที่ 10 พบว่า ตัวอย่างที่มีการเติมโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวทุกสูตร ได้รับคะแนนความชอบด้านสีและกลิ่น ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างจากตัวอย่างสูตรมาตรฐาน

คะแนนเฉลี่ยความชอบด้านรสชาติ มีข้อสรุปคล้ายคลึงกับด้านสีและกลิ่น ยกเว้นคะแนนเฉลี่ยความชอบของตัวอย่างที่เติม 1 % RBPC มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับตัวอย่างสูตรมาตรฐาน

ด้านเนื้อสัมผัส เมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างที่มีการเติมโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวกับสูตรมาตรฐาน พบว่า ทุกตัวอย่าง ยกเว้นตัวอย่างที่เติม 4 % RBPC มีคะแนนความชอบเฉลี่ยไม่แตกต่างจากสูตรมาตรฐาน

ด้านความชอบโดยรวม พบว่า ตัวอย่างสูตรมาตรฐาน ได้รับคะแนนเฉลี่ยความชอบไม่แตกต่างจากตัวอย่างที่มีการเติมโปรตีนเข้มข้น 1 % แต่แตกต่างจากตัวอย่างสูตรอื่น ๆ

เมื่อพิจารณาในภาพรวม พบว่า ตัวอย่างที่ได้รับคะแนนเฉลี่ยความชอบด้านต่าง ๆ สูงที่สุด คือ ตัวอย่างสูตรมาตรฐาน และตัวอย่างที่เติม 1 % RBPC ได้รับคะแนนความชอบที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในด้านรสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมจากตัวอย่างมาตรฐาน จึงสรุปได้ว่าเป็นตัวอย่างขนมปังที่มีการเติมโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวในระดับที่ผู้บริโภคยอมรับมากที่สุด การเติมโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวในสูตรขนมปังปริมาณมากกว่า 1% มีผลทำให้คะแนนความชอบลดลง อาจเนื่องมาจากขนมปังมีสีเข้มขึ้น และมีกลิ่นของโปรตีน

จากรำข้าวที่ชัดเจนขึ้น ซึ่งผู้บริโภคกลุ่มนี้ไม่ชอบลักษณะดังกล่าว แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า การเติมโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวไม่มีผลต่อความชอบของลักษณะเนื้อสัมผัสในตัวอย่างขนมปัง

เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ มีกลุ่มผู้ทดสอบชิมมีจำนวนเพียง 20 คน จึงถือว่าเป็นตัวแทนของผู้บริโภคเพียงกลุ่มย่อยกลุ่มหนึ่ง (pilot consumer) เท่านั้น การที่จะได้ข้อสรุปที่ชัดเจนยิ่งขึ้น เกี่ยวกับความชอบ รวมทั้งข้อมูลเพิ่มเติมต่าง ๆ ในอนาคต อาจทำได้ดังนี้

1. เพิ่มจำนวนผู้ทดสอบชิมให้มากขึ้น หรือมีความหลากหลายในด้านอายุ ฐานะของผู้ทดสอบ เพื่อให้เป็นตัวแทนของกลุ่มผู้บริโภคอย่างแท้จริง การทดสอบดังกล่าว ควรใช้การทดสอบที่เรียกว่า Consumer test ซึ่งเป็นการทดสอบกับคนกลุ่มใหญ่ แต่ต้องมีค่าใช้จ่ายมากขึ้น และมีการเตรียมการทดสอบที่ยุ่งยากขึ้นด้วย

2. ในกรณีที่ต้องการข้อมูลที่เป็นข้อเท็จจริง (facts) เกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ โดยไม่รวมด้านความชอบ ควรทำการทดสอบแบบพรรณนา (descriptive analysis) ซึ่งเป็นการทดสอบกับคนกลุ่มเล็กประมาณ 10-15 คนที่ผ่านการฝึกฝนเป็นอย่างดี (trained panel) การทดสอบแบบนี้ จะให้ข้อมูลที่เป็นจริงด้านต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์ ซึ่งจะเป็นคำศัพท์ที่เป็นประโยชน์ในการใช้บรรยายลักษณะของผลิตภัณฑ์อย่างละเอียด สามารถใช้เพื่อจุดประสงค์ในเพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไปในอนาคตได้

สรุปผลการทดลอง

การสกัดโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว โดยใช้วิธีการทางเคมี และการใช้เอนไซม์ มีการวางแผนการทดลองแบบ CCD และใช้กราฟที่ได้จาก RSM เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดพบว่า เมื่อใช้กราฟที่ได้จาก RSM ในการทำนายสภาวะการสกัดที่ให้ปริมาณโปรตีนและปริมาณผลผลิตของโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวสูงสุด จะได้จากการสกัดโดยวิธีทางเคมีที่ pH 11.0 และใช้เวลาสกัด 45 นาที โดยได้โปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวที่มีปริมาณโปรตีน 76.34 % และปริมาณผลผลิตสูงถึง 12.2 % โปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวที่สกัดได้ เป็นผงละเอียด สีน้ำตาล เมื่อนำไปเติมในขนมปัง โดยทดแทนแป้งสาลีในปริมาณ 1-5% พบว่ามีผลทำให้สมบัติทางกายภาพ เคมี จุลินทรีย์ อายุการเก็บ รวมทั้งการยอมรับทางประสาทสัมผัสเปลี่ยนแปลงไป โดยพบว่าการเติม RBPC มากขึ้น ช่วยลดเปอร์เซ็นต์การสูญเสียไนโตรเจนระหว่างการอบ และช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ตรวจพบซึ่งผลดังกล่าว มาจากการที่ RBPC มีสมบัติในการอุ้มน้ำที่อาจมีส่วนช่วยในการยืดอายุการเก็บของขนมปัง การเติม RBPC มากขึ้น ยังช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนและใยอาหารในตัวอย่างขนมปังอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับขนมปังสูตรมาตรฐาน อย่างไรก็ตาม การเติม RBPC ในสูตรขนมปัง มากกว่า 1% มีผลทำให้คะแนนความชอบด้านสี กลิ่น รสชาติ และความชอบรวมที่มีต่อขนมปังลดลง ดังนั้น ปริมาณ RBPC ที่เหมาะสมในการเติม ไม่ควรเกิน 1% ผลิตภัณฑ์จึง

จะอยู่ในเกณฑ์ที่ผู้บริโภคยอมรับได้ โดยขนมปังสูตรที่เดิม 1% RBPC มีปริมาณโปรตีน และใยอาหารคือ 9.84% และ 1.68% ตามลำดับ

ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการ

1. โปรตีนรำข้าวเข้มข้นที่สกัดได้ ซึ่งมีความสามารถในการอุ้มน้ำ ช่วยลดเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำระหว่างการอบของขนมปัง และช่วยยืดอายุการเก็บรักษาให้เก็บได้นานขึ้น
2. นอกเหนือจากสมบัติทางหน้าที่ การเติมโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวในสูตรขนมปังสามารถช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนและเยื่อใยให้กับผลิตภัณฑ์
3. เป็นองค์ความรู้พื้นฐานเพื่อศึกษาศักยภาพของการใช้ประโยชน์จากสารสกัดจากรำข้าวในอาหารชนิดอื่น ๆ ที่ต้องการคุณสมบัติทางหน้าที่ที่เป็น water holding capacity ของโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว
4. เป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งจากการสีข้าว คือรำข้าว เพื่อเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหาร และเป็นการเพิ่มบทบาทของรำข้าวเพื่อการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร
5. เพื่อลดการใช้ส่วนผสมทางเคมี (chemical additives) ในผลิตภัณฑ์อาหาร และช่วยในการลดการนำเข้าของส่วนผสมดังกล่าว และยังเป็นการใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบที่มีราคาถูกและหาได้ง่ายในประเทศ
6. สามารถเพิ่มการใช้ประโยชน์จากสารสกัดที่ได้จากพืช โดยเฉพาะจากรำข้าว
7. หน่วยงานวิจัยที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ ได้แก่ สถาบันการศึกษา โรงงานอุตสาหกรรมอาหาร และสถาบันประกอบการ เช่น โรงสีข้าว

เอกสารอ้างอิง

- สรจักร ศิริบริรักษ์ 2544 รำข้าว จมูกข้าว ของดีที่ถูกทิ้ง วารสารไกล้มอ 25 (11) พฤศจิกายน
 อรอนงค์ นัยวิกุล และ อรศิริ ทุติยภาค 2542 ข้าว:ทิศทางการส่งออก อุตสาหกรรมเกษตร 10
 (2) พฤษภาคม-สิงหาคม
- AOAC International. (1995). Official Methods of Analysis of the AOAC International, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA. USA.
- Bera, M. B. and Mukherjee, R. K 1989. Solubility, emulsifying, and foaming properties of rice bran protein concentrates. J. of Food Sci. Jan/Feb 54:1, p. 142-145.
- Chen, L., and Houston, D.F. 1970. Solubilization and recovery of proteins from defatted rice bran. Cereal Chem., 47, 72-79.

- Gnanasambandam, R. and Hettiarachchy, N. S. 1995. Protein concentrates from unstabilized and stabilized rice bran: preparation and properties. *J. of Food Science*, Sept/Oct. v. 60(5) p. 1066-1069.
- Hamada, J. S. 1997. Characterization of protein fractions of rice bran to devise effective methods of protein solubilization. *Cereal Chemistry*, 74, 662-668.
- James, C., Courtney, D. L. D., and Lornrenz, K. 1989. Rice bran-soy blends as protein supplements in cookies. *Int. J. Food Sci. Technol.* 24, 495-502.
- LaBell, F. 1998. Rice Extract Enhanced Snacks. *Prepared Foods*, February.
- Lasztity, R. 1984. Rice Protein Ch. 8 in *The chemistry of cereal protein*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Lloyd, B. J., Siebenmorgen, T.J. and Beers, K. W. 2000. Effects of commercial processing on antioxidants in rice bran. *Cereal Chem.* 77 (5), 551-555.
- <http://www.ribus.com>
- Saunders, R. M. 1990 The properties of rice bran as a foodstuff. *Cereal Foods World*, 35 (7), 632-635.
- Wang, M., Hettiarachchy, N. S., Qi, M., Burks, W. and Siebenmorgen, T. 1999. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* 47, 411-416.

ภาคผนวกที่ 1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี Proximate analysis

(1) การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น จากวิธีของ AOAC 40.1.04

อุปกรณ์

- ตู้อบลมร้อน
- ถ้วยอลูมิเนียมพร้อมฝา
- โถดูดความชื้น

วิธีการทดลอง

1. ชั่งน้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมพร้อมฝาที่ผ่านการอบแห้งจนมีน้ำหนักคงที่แล้ว บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน
2. ตักตัวอย่างใส่ลงในถ้วยอลูมิเนียมประมาณ 2 กรัม เกลี่ยให้ตัวอย่างแผ่ด้วยความหนาสม่ำเสมอ ปิดฝา บันทึกน้ำหนัก
3. วางตัวอย่างในตู้อบลมร้อนโดยเปิดฝาด้วยอลูมิเนียมบางส่วน อบที่อุณหภูมิ 130°C นาน 3 ชั่วโมง
4. เมื่อครบเวลา ปิดฝาด้วย แล้วนำตัวอย่างใส่ในโถที่มีสารดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง (ใช้เวลาประมาณ 45 นาที)
5. นำตัวอย่างออกมาชั่ง บันทึกน้ำหนัก
6. นำตัวอย่างเข้าอบอีกครั้งประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนักถ้าน้ำหนักเปลี่ยนแปลงไปจากครั้งแรกน้อยกว่า 0.003 กรัม ให้ยุติการอบ บันทึกน้ำหนักสุดท้าย
7. คำนวณหาปริมาณความชื้นจากน้ำหนักที่หายไป

$$\text{ความชื้น (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มแรก} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มแรก}} \times 100$$

(2) การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า จากวิธีของ AOAC 40.1.03

อุปกรณ์

- เตาเผา
- Hot plate
- ถ้วยกระเบื้องพร้อมฝา
- โถดูดความชื้น

วิธีการทดลอง

1. ชั่งน้ำหนักถ้วยกระเบื้องพร้อมฝา ซึ่งผ่านการเผาในเตาเผา ที่อุณหภูมิ 550°C เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จนกระทั่งน้ำหนักคงที่แล้วบันทึกน้ำหนัก
2. ตักตัวอย่างใส่ลงในถ้วยกระเบื้องประมาณ 3-5 กรัม ปิดฝา บันทึกน้ำหนัก
3. หยดน้ำกลั่นปริมาณเล็กน้อยลงบนตัวอย่างให้ตัวอย่างที่เป็นผงแห้งมีความชื้นและเกาะกันเพื่อป้องกันการฟุ้งกระจายเมื่อให้ความร้อน
4. วางถ้วยตัวอย่างลงบนเตา hot plate เปิดฝาดูออก ค่อยๆ เพิ่มระดับความร้อนในการเผาไหม้ตัวอย่าง (ขั้นตอนนี้ต้องทำในตู้ดูดควัน) จนกระทั่งเผาไหม้หมดควัน
5. นำถ้วยตัวอย่างที่ปิดฝาใส่ในเตาเผา เผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 550°C จนกว่าจะได้เถ้าสีขาวหรือสีเทา
6. นำถ้วยตัวอย่างออกมาใส่ในตู้อบลมร้อน 1 ชั่วโมง แล้วนำออกวางในโถดูดความชื้นตามลำดับ เพื่อค่อยๆ ลดอุณหภูมิของตัวอย่างลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง
7. ชั่งตัวอย่างพร้อมฝา บันทึกน้ำหนัก
8. คำนวณปริมาณเถ้า

$$\text{เถ้าทั้งหมด (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$