อิทธิพลของกระบวนการทางชีวภาพที่ส่งผลต่อการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในข้าวกล้องขาวดอกมะลิ 105 และข้าวฟ่างเฮกการี่

Influence of Biological Processes Affecting on Antioxidative Agents in Brown Rice 'Khao Dawk Mali 105' and Sorghum 'Hegari'

ภัสจนันท์ หิรัญ อรพิน เกิดชูชื่น* และ ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

Pasjanant Hiran, Orapin Kerdchoechuen* and Nuttha Laohakuljit
Department of Biochemical Technology, School of Bioresources and Thchnolgoy
King Mongkut's University of Technology Thonburi

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของกระบวนการงอกและกระบวนการหมักด้วย *Aspergillus oryzae* และ *Lactobacillus plantarum* ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารแกมม่าโอไรซานอล วิตามินอี ของข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวฟ่างพันธุ์เฮกการี่ รวมถึงศึกษาประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของข้าวกล้องและข้าวฟ่างงอกหมัก พบว่าข้าวกล้องงอกหมักด้วย *A. oryzae* หมักนาน 72 ชั่วโมง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด แกมม่าโอไรซานอล วิตามินอี และประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวกล้องงอกหมักด้วย *L. plantarum* อย่างไรก็ตามปริมาณสารสำคัญและประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของข้าวฟ่างงอกหมักด้วย *L. plantarum* นาน 72 ชั่วโมง มีปริมาณสูงกว่าข้าวฟ่างงอกหมักด้วย *A. oryzae* นอกจากนี้ยังพบสารแกมม่าโอไรซานอล สูงสุดในข้าวกล้องงอกหมักด้วย *A. oryzae* เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ส่วนข้าวฟ่างงอกหมักด้วย *L. plantarum* เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีวิตามินอีสูงสุด

คำสำคัญ : สารฟีนอลิคทั้งหมด วิตามินอี แกมม่าโอไรซานอล การงอก การหมัก

* ผู้ประสานงานหลัก (Corresponding Author)
e-mail: s

Abstract

This research aimed to study the effect of germination and fermentation with *Aspergillus oryzae* and *Lactobacillus plantarum* on total phenolics, gamma oryzanol, vitamin E contents, and antioxidant activities of 'Khao Dawk Mali 105' brown rice and 'Hegari' sorghum. Results showed that germinated brown rice fermented with *A. oryzae* for 72 h had greater total phenolics, gamma oryzanol, vitamin E and antioxidant activities than germinated brown rice fermented with *L. plantarum*. However, total phenolic contents, gamma-oryzanol, vitamin E and antioxidant activities in germinated sorghum fermented with *L. plantarum* for 72 h was higher than fermented germinated sorghum with *A. oryzae*. In addition, the maximum gamma-oryzanol content was found in germinated brown rice fermented with *A. oryzae* for 72 h but germinated sorghum fermented with *L. plantarum* for 72 h had the highest vitamin E content.

Keywords : total phenolics, vitamin E, gamma-oryzanol, fermention, germination

บทนำ

สารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) คือสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือสามารถกำจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกาย (Komutiban, 2014) แบ่งตามกลไกของการยับยั้งออกซิเดชันได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่ สารกลุ่มป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ (preventive antioxidant) สารกลุ่มทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น (scavenging antioxidant) และสารกลุ่มที่ทำให้ลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง (chain breaking antioxidant) ตัวอย่างของสารต้านออกซิเดชัน ได้แก่ วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิก ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เข้าทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl) และอนุมูลเพอออกซิล (peroxyl) ส่วนวิตามินอีเป็นวิตามินที่ละลายได้ในไขมันทำงานร่วมกับสารต้านออกซิเดชันอื่นๆ (เช่น วิตามินซี) วิตามินอี แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ โทโคฟีรอล (tocopherol) และโทโคไทอินอล (tocotrienol) สามารถลดอัตราเสี่ยงของโรคที่เกี่ยวกับหลอดเลือดสมองและหัวใจได้ (Kayahara et al., 2000) สารประกอบฟีนอลิค (phenolic compound) เป็นสารที่พบได้ในพืชทุกชนิดมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น สามารถละลายน้ำได้ มักพบอยู่รวมกับโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycosides) ในธรรมชาติพบหลายชนิดที่พบมากที่สุดเป็นกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และพอลิฟีนอลิค (polyphenoic) เช่น ลิกนิน (lignin) และ แทนนิน (tannin) ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในอาหารและเครื่องดื่มที่มาจากผัก ผลไม้ และธัญพืชแตกต่างกัน

ตามชนิดของพันธุ์พืช วิธีการปลูกและแหล่งที่ปลูก (Kritchevsky & Chen, 2005) สารประกอบฟีนอลิคมีประโยชน์หลายประการ เช่น มีส่วนช่วยป้องกันมะเร็ง ป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือดสมอง (Prior et al., 1998) เนื่องจากช่วยลดโคเลสเตอรอลชนิดไม่ดีหรือแอลดีแอล (LDL) และไตรกลีเซอไรด์ อีกทั้งยังช่วยเพิ่มระดับโคเลสเตอรอลชนิดดีหรือเอชดีแอล (HDL) ลดความดันโลหิตและระดับน้ำตาลในเลือด (Iqbal et al., 2005; Halliwell, 1991) สำหรับสารแกมม่าโอไรซานอล (gamma-oryzanol) เป็นสารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โอไรซานอลมีคุณสมบัติที่สำคัญคือเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและยังมีคุณสมบัติอื่นๆ อีกเช่น ลดระดับไขมันในเลือด กระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนสำหรับการเจริญเติบโต (growth hormone) เพิ่มการหลั่งสารที่ช่วยผ่อนคลาย (endorphin) ลดการสูญเสียแคลเซียมที่เป็นสาเหตุของโรคกระดูกพรุน เป็นต้น (Gerhardt & Gallo, 1998) จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าสารพฤกษเคมีในพืชมีสารสำคัญ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย แต่อย่างไรก็ตามปริมาณสารสำคัญในพืชมีปริมาณต่ำเมื่อเทียบกับการบริโภคในแต่ละวัน ซึ่งวิธีการที่สามารถเพิ่มคุณค่าสารอาหารคือกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดในสิ่งมีชีวิตได้แก่ กระบวนการงอก (germination) และกระบวนการหมัก (fermentation)

กระบวนการงอก เริ่มขึ้นเมื่อเมล็ดมีการดูดน้ำ (imbibition of water) น้ำทำให้เปลือกเมล็ดอ่อนลงและทำให้โพรโทพลาสซึม (protoplasm) ในเซลล์ได้รับน้ำและเข้าสู่การสังเคราะห์เอนไซม์ (enzyme synthesis) โดย hydrolytic enzyme จะย่อยสลายสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตที่สะสมไว้ในเอนโดสเปิร์มเปลี่ยนให้เป็นสารที่มีโครงสร้างเล็กลง เช่น ไขมันและน้ำมันจะถูกย่อยเป็นกรดไขมัน โปรตีนจะถูกย่อยเป็นสารประกอบที่มีไนโตรเจน เช่น เพปไทด์ (peptide) และกรดอะมิโน (amino acid) เคลื่อนย้ายไปยังส่วนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและบางส่วนทำหน้าที่เป็นสารสำคัญเพื่อปกป้องเมล็ดจากปัจจัยภายนอก เช่น แมลงศัตรูพืช หรือสภาวะที่ไม่เหมาะสม กระบวนการงอกจึงเป็นกระบวนการผลิต secondary metabolite ที่สำคัญ (Augustin & Klein, 1989) อย่างไรก็ตามสารสำคัญที่เกิดจากการกระตุ้นของเอนไซม์ในระหว่างกระบวนการงอกนอกจากมีความสำคัญกับพืชแล้ว สารเหล่านี้ยังสำคัญต่อร่างกายมนุษย์เพื่อทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายได้อีกด้วย (Kayahara et al., 2000) มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการงอกข้าวแล้วทำให้สารสำคัญเพิ่มขึ้น เช่น Zhang et al (2013) ได้ทดสอบกระบวนการงอกพบว่ากระบวนการงอกนั้นทำให้สารประกอบ เช่น เฟอรูลิค (ferulic acid) คูมาริค (coumaric acid) ไซริงจิค (syringic acid) และคาเฟอิค (caffeic acid) มีปริมาณเพิ่มขึ้น อีกทั้งสารบางชนิดยังถูกเปลี่ยนโครงสร้างให้อยู่ในรูปแบบที่พร้อมใช้ประโยชน์ จากรายงานของ Moongngarm & Saetung (2010) พบว่ากระบวนการงอกข้าวสามารถทำให้สารฟีนอลิคในรูป bound form เปลี่ยนให้อยู่ในรูป free form ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มี function มากขึ้น

นอกจากกระบวนการงอกสามารถเพิ่มปริมาณสารสำคัญในเมล็ดพืชให้มากขึ้นแล้ว ปัจจุบันยังได้มีการนำจุลินทรีย์มาใช้ในการหมักธัญพืชเพื่อให้ได้คุณค่าทางสารอาหารสูง การหมักเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี เพื่อให้วัตถุดิบเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ทั้งนี้อาจอยู่ในสภาวะที่มีอากาศ มีอากาศเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีอากาศ (Hubert et al., 2008)

การหมักจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องควบคุมชนิดของจุลินทรีย์และมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม โดยปัจจัยในการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ ชนิดของเชื้อ วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักต้องมีสารอาหารที่เหมาะสมต่อเชื้อนั้นๆ และต้องมีการควบคุมสภาวะการหมักที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ ออกซิเจน และความเป็นกรดด่าง การหมักไม่เพียงแต่ช่วยถนอมอาหารได้ การหมักด้วยจุลินทรีย์บางชนิดยังสามารถช่วยเพิ่มปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ได้เช่นกัน (Katina et al., 2007) มีรายงานการวิจัยที่ศึกษาการผลิตโยเกิร์ตด้วย *Bifidobacterium longum* จากถั่วเหลืองเพื่อเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระ สารแกมม่าอะมิโนบิวทาริคแอซิด (gamma amino butaric acid; GABA) สารประกอบฟีนอลิคและกรดอะมิโน ผลการวิจัยพบว่าเชื้อชนิดนี้สามารถเพิ่มปริมาณสารสำคัญได้ เช่นเดียวกับการหมักข้าวด้วย *Aspergillus oryzae* สามารถเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิคสูงกว่าการหมักข้าวด้วยเชื้อชนิดอื่น (Yen et al., 2003) การหมักถั่วเหลืองด้วย *Aspergillus oryzae* ทำให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคสูงขึ้น (Hubert et al., 2008) การหมักข้าวโพดด้วย *Lactobacillus plantarum* สามารถเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิคได้ (Nguyen et al., 2007) การที่จุลินทรีย์มีความสามารถในการเพิ่มสารสำคัญได้ดีทั้งนี้อาจเนื่องจากในระหว่างกระบวนการหมัก จุลินทรีย์บางชนิดปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาเพื่อย่อยองค์ประกอบทางเคมีใน substrate (วัตถุดิบที่ใช้หมัก) เช่น เอนไซม์บางชนิดมีผลทำให้สารประกอบฟีนอลิคที่อยู่ในรูปที่ซับซ้อน ให้เปลี่ยนเป็นรูปที่ใช้งานได้ง่าย เปลี่ยนโปรตีนให้กลายเป็นเพปไทด์สายสั้น อีกทั้ง จุลินทรีย์บางชนิดยังสามารถปลดปล่อยเอนไซม์ที่สามารถทำให้พอลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) เปลี่ยนให้อยู่ในรูปของน้ำตาลเชิงเดี่ยวได้ (Iqbal et al., 2005)

ประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชียนิยมบริโภคธัญพืช เช่น ข้าวและข้าวฟ่าง เป็นอาหารหลัก เนื่องจากเป็นอาหารที่ให้พลังงานและมีสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต กากใยอาหาร วิตามิน แร่ธาตุ และสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งปริมาณของสารเหล่านี้ผันแปรตามสายพันธุ์ สถานที่ปลูก และสภาพแวดล้อมที่ปลูก อย่างไรก็ตามสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญในข้าวและข้าวฟ่างมีปริมาณต่ำเมื่อเทียบกับการบริโภคอาหารในแต่ละวัน (Thai RDI) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเพิ่มขึ้นของสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารฟีนอลิค แกมม่าโอไรซานอล (gamma-oryzanol) และ วิตามินอี (vitamin E) ของข้าวเจ้ากล้องขาวดอกมะลิ 105 และข้าวฟ่างพันธุ์เฮกการี่ด้วยกระบวนการงอกและหมัก รวมถึงการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$ และ ABTS$^{\bullet+}$ ของข้าวกล้องและข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการงอกและหมัก เทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการงอกและหมัก

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการเพิ่มของสารต้านอนุมูลอิสระในข้าวกล้องและข้าวฟ่างเมื่อผ่านกระบวนการงอกและกระบวนการหมักด้วย จุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ *Aspergillus oryzae* และ *Lactobacillus plantarum*

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมธัญพืชผ่านกระบวนการงอก

นำข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวฟ่างพันธุ์เฮกการี่มาล้างให้สะอาด หลังจากนั้นนำไปแช่น้ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อข้าวกล้องและข้าวฟ่างมีรากงอกยาวประมาณ 1-2 มิลลิเมตร (ข้าวกล้องใช้ระยะเวลาในการงอก 48 ชั่วโมง และข้าวฟ่าง 12 ชั่วโมง) (ดัดแปลงจาก Watcharatparpaiboon et al., 2010; Kerdchoechuen et al., 2013) นำข้าวกล้องและข้าวฟ่างงอกที่ได้ไปอบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาในการอบแห้ง 10 ชั่วโมง (ให้เหลือความชื้นไม่เกิน 10 %) ก่อนนำไปบดด้วยเครื่องบดละเอียดแล้วร่อนด้วยตะแกรงที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 เมช (mesh) ก่อนเก็บในโถดูดความชื้น (desiccator) เพื่อนำไปวิเคราะห์สารประกอบฟินอลิคทั้งหมด แกมม่าโอไรซานอล วิตามินอี รวมถึงประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ($DPPH^{\bullet}$) และ 2´-azinobiz (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt ($ABTS^{\bullet+}$) ในข้าวกล้องงอกและข้าวฟ่างงอก

2. การเตรียมธัญพืชผ่านกระบวนการหมัก

ข้าวกล้องและข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการงอก (ที่ผ่านการอบแห้ง) นำมาหมักด้วย รา *Aspergillus oryzae* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ *Lactobacillus plantarum* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยหมักเป็นเวลา 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Laohakunjit, 2012) จากนั้นนำข้าวกล้องและข้าวฟ่างงอกหมักที่ได้ไปอบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาในการอบแห้ง 6 ชั่วโมง (ให้เหลือความชื้นไม่เกิน 10 %) นำไปบดด้วยเครื่องบดละเอียดแล้วร่อนด้วยตะแกรงที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 เมช (mesh) และเก็บในโถดูดความชื้น (desiccator) ก่อนนำไปวิเคราะห์สารประกอบฟินอลิคทั้งหมด แกมม่าโอไรซานอล วิตามินอี รวมถึงประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ($DPPH^{\bullet}$) และ 2´-azinobiz (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) di-ammonium salt ($ABTS^{\bullet+}$) เปรียบเทียบกับข้าวกล้องและข้าวฟ่างที่ไม่ผ่านกระบวนการงอกและกระบวนการหมัก

3. การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในข้าวกล้องและข้าวฟ่างที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการงอกหมักและหมัก

3.1 ปริมาณสารฟินอลิคทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารฟินอลิคทั้งหมด ตามวิธีของ Moongngarm & Saetung (2010) นำตัวอย่าง 1 กรัม สกัดด้วย 80% ethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6440 xg เป็นเวลา 20 นาที และดูดส่วนใสของสารละลายปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 950 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติม 7.5% Na_2CO_3 ปริมาตร

4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตรและคำนวณปริมาณสารฟินอลิคทั้งหมดโดยเทียบกับกราฟของสารมาตรฐานกรดแกลลิค

3.2 ปริมาณแกมม่าโอไรซานอล (gamma-oryzanol) และ วิตามินอี (vitamin E)

วิเคราะห์ปริมาณแกมม่าโอไรซานอลและวิตามินอี (ตามวิธีของ Nguyen et al., 2008) โดยสกัดตัวอย่าง 5 กรัม ด้วยตัวทำละลาย 80% ethanol ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6440 xg เป็นเวลา 10 นาที และกรองด้วยแผ่นไนลอน (nylon filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปวิเคราะห์ปริมาณแกมม่าโอไรซานอลและวิตามินอี ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟฟีสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography; HPLC) (บริษัท Agilent Technologies รุ่น LC 1200 series) ตามสภาวะ (condition) ดังต่อไปนี้ คอลัมน์ที่ใช้ ZURBUAX Eclipse XDB-C18 reverse phase (ความกว้าง 4.6 มิลลิเมตร x ความยาว 150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร) วิเคราะห์ปริมาณแกมม่าโอไรซานอลและวิตามินอี แบบ gradient elution system มี mobile phase 3 ชนิด โดย mobile phase A คือ acetonitrile, mobile phase B คือ methanol และ mobile phase C คือ น้ำ อัตราส่วนของ A:B:C เท่ากับ 60:35:5 เป็นเวลา 5 นาที และเปลี่ยนเป็น isocratic elution system ใช้อัตราส่วนของ A:B เท่ากับ 60:40 เป็นเวลา 5 นาที และเปลี่ยนอัตราส่วนของ A:B เท่ากับ 22:78 ใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตร/นาที นาน 60 นาที โดยฉีดตัวอย่างในปริมาณเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ซึ่งในการวิเคราะห์แกมม่าโอไรซานอล และวิเคราะห์วิตามินอีใช้ UV-visible diode-array ความยาวคลื่น 295 และ 325 นาโนเมตร ตามลำดับ คำนวณปริมาณแกมม่าโอไรซานอลและวิตามินอีเทียบกับสารมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3 ประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

3.3.1 การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH$^{\bullet}$)

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH$^{\bullet}$) scavenging activity assay โดยชั่งสารตัวอย่าง 1 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลาย 80% ethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าแล้วทิ้งไว้ 1 คืน หรือเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองและดูดสารสกัด 500 ไมโครลิตร เติม 0.1 mM DPPH$^{\bullet}$ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (ดัดแปลงตามวิธีของ Iqbal et al., 2005) และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Trolox และคำนวณ % DPPH$^{\bullet}$ scavenging effect จากการดูดกลืนแสงรายงานผลเป็นหน่วย mM Trolox ดังสมการ

$$\text{DPPH}^{\bullet} \text{ scavenging effect (\%)} = \left[\frac{A_{cont} + A_{blank} - A_{test}}{A_{cont}} \right] \times 100$$

เมื่อ A_{cont} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ control (80% ethanol+DPPH$^{\bullet}$)
A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสีตัวอย่าง (สารสกัดตัวอย่างใน 80% ethanol)
A_{test} คือ ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (สารสกัดตัวอย่าง+DPPH$^{\bullet}$)

3.3.2 การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2′-azinobiz (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) di-ammonium salt (ABTS$^{\bullet+}$)

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2′-azinobiz (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS$^{\bullet+}$) scavenging activity assay โดยชั่งสารตัวอย่าง 1 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลาย 80% ethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าแล้วทิ้งไว้ 1 คืน นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองและดูดสารสกัดมา 40 ไมโครลิตร เติม 7.0 mM ของ ABTS$^{\bullet+}$ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที ที่อุณหภูมิห้องตามวิธีของ Yen et al., (2003) และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Trolox และคำนวณ % ABTS$^{\bullet+}$ scavenging effect จากค่าการดูดกลืนแสง ดังสมการ

$$\text{ABTS}^{\bullet+} \text{ scavenging effect (\%)} = \left[\frac{A_{cont} + A_{blank} - A_{test}}{A_{cont}} \right] \times 100$$

เมื่อ Acont คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ control (80% ethanol+ABTS•+)
Ablank คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสีตัวอย่าง (สารสกัดตัวอย่างใน 80% ethanol)
Atest คือ ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (สารสกัดตัวอย่าง+ABTS$^{\bullet+}$)

4. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) จำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรม SAS (1997)

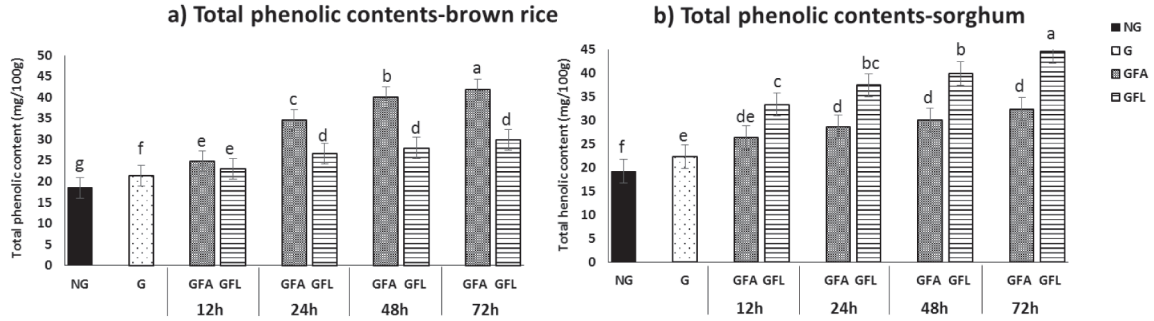
ผลการวิจัย

1. ปริมาณสารฟินอลิคทั้งหมดในข้าวกล้องและข้าวฟ่างเมื่อผ่านกระบวนการงอกและหมัก

จากภาพที่ 1 แสดงปริมาณสารฟินอลิคทั้งหมดของข้าวกล้องและข้าวฟ่าง (non-germinated) ข้าวกล้องเจ้าและข้าวฟ่างงอก (germinated) และข้าวเจ้าและข้าวฟ่างงอกหมักด้วย *A. oryzae* (germinated fermented with *A. oryzae*; GFA) และด้วย *L. plantarum* (germinated fermented with *L. plantarum*; GFP) ผลการศึกษาพบว่าข้าวกล้องงอกมีปริมาณสารประกอบฟินอลิคทั้งหมดเพิ่มขึ้น (21.35 มิลลิกรัม/100 กรัม) เมื่อเทียบกับข้าวกล้องที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (18.45 มิลลิกรัม/100 กรัม) และยังพบว่าข้าวกล้องที่ผ่านกระบวนการงอกแล้วนำไปหมักด้วยเชื้อ 2 ชนิด เมื่อใช้เวลาหมักนานขึ้น จุลินทรีย์สามารถเพิ่มปริมาณสารฟินอลิคทั้งหมดในข้าวกล้องงอกได้เพิ่มขึ้น โดยข้าวที่ผ่านกระบวนการงอกและหมักด้วย *A. oryzae* สามารถเพิ่มปริมาณสารฟินอลิคทั้งหมดได้มากกว่า การหมักด้วย *L. plantarum* ซึ่งข้าวกล้องงอกหมักด้วย *A. oryzae* นาน 72 ชั่วโมง มีปริมาณสารฟินอลิคทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 41.83 มิลลิกรัม/100 กรัม (ภาพที่ 1 a)

สำหรับปริมาณสารฟินอลิคทั้งหมดในข้าวฟ่างงอกและข้าวฟ่างงอกหมักพบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน เมื่อเมล็ดข้าวฟ่างผ่านกระบวนการงอกแล้ว มีปริมาณสารฟินอลิคทั้งหมด เท่ากับ 22.36 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม แต่เมื่อนำข้าวฟ่างงอกไปผ่านกระบวนการหมักด้วย *A. oryzae* และ *L. plantarum* และระยะเวลาในการหมัก 12-72 ชั่วโมง พบว่า ข้าวฟ่างงอกหมักด้วย *L. plantarum* มีปริมาณสารฟินอลิคทั้งหมดสูงกว่าข้าวฟ่างหมักด้วย *A. oryzae* โดยข้าวฟ่างหมักด้วย *L. plantarum* นาน 72 ชั่วโมง มีปริมาณสารฟินอลิคทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 44.60 มิลลิกรัม/100 กรัม (ภาพที่ 1 b)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารฟินอลิคทั้งหมดในข้าวกล้องและข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการงอกและหมักด้วย *A. oryzae* และ *L. plantarum* ระยะเวลาการหมักนาน 12-72 ชั่วโมง เห็นได้ว่า กระบวนการงอกและหมักด้วยจุลินทรีย์ 2 ชนิด ให้ผลที่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ เมล็ดข้าวกล้องและข้าวฟ่างเมื่อผ่านกระบวนการงอกและหมักที่ระยะเวลาหมักนานขึ้น มีปริมาณฟินอลิคทั้งหมดเพิ่มขึ้น แต่ข้าวกล้องงอกหมักด้วย *A. oryzae* มีปริมาณสารฟินอลิคทั้งหมดสูงกว่าหมักด้วย *L. plantarum* แต่ข้าวฟ่างงอกหมักด้วย *L. plantarum* มีปริมาณสารฟินอลิคทั้งหมดสูงกว่าข้าวฟ่างงอกหมักด้วย *A. oryzae* เนื่องจากธัญพืชแต่ละชนิด มีปริมาณน้ำตาลที่เชื้อสามารถนำไปใช้ได้ต่างกัน ดังนั้นผลการทดลองจึงพบว่าข้าวฟ่างและข้าวกล้องที่หมักด้วยเชื้อแต่ละชนิดจึงมีปริมาณฟินอลิคทั้งหมดแตกต่างกัน (Katina et al., 2007)



*NG: non-germinated
*G: germinated
*GFA: germinated fermented with *Aspergillus oryzae*
*GFL: germinated fermented with *Lactobacillus plantarum*
a, b, c,..... Means in the separate samples (brown rice or sorghum) with different letters are significantly different (p≤0.05).

ภาพที่ 1 อิทธิพลของกระบวนการงอกและกระบวนการหมักด้วย *Aspergillus oryzae* และ *Lactobacillus plantarum* ต่อปริมาณสารฟินอลิคทั้งหมด ใน a) ข้าวกล้อง และ b) ข้าวฟ่าง

2. ปริมาณแกมม่าโอไรซานอลในข้าวกล้องและข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการงอกและหมัก

ข้าวกล้องที่ผ่านกระบวนการงอกมีปริมาณแกมม่าโอไรซานอลเพิ่มขึ้น 8.85 มิลลิกรัม/100 กรัม (โดยมีปริมาณเท่ากับ 25.36 มิลลิกรัม/100 กรัม) เมื่อเทียบกับข้าวกล้องที่ไม่ผ่านกระบวนการงอก (16.51 มิลลิกรัม/100 กรัม) และเมื่อนำข้าวกล้องที่งอกแล้วไปผ่านกระบวนการหมักด้วยเชื้อ 2 ชนิดที่ระยะเวลาต่างๆ (12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง) พบว่าปริมาณแกมม่าโอไรซานอลเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้น โดยข้าวกล้องงอกที่หมักด้วย *A. oryzae* มีปริมาณแกมม่าโอไรซานอล 29.04-39.18 มิลลิกรัม/100 กรัม และข้าวกล้องงอกที่หมักด้วย *L. plantarum* มีปริมาณแกมม่าโอไรซานอล 26.24-37.18 มิลลิกรัม/100 กรัม ถึงแม้ว่าข้าวกล้องงอกที่หมักด้วยเชื้อ 2 ชนิดมีปริมาณแกมม่าโอไรซานอลเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกัน แต่ข้าวกล้องงอกที่หมักด้วย *A. oryzae* มีแนวโน้มของปริมาณแกมม่าโอไรซานอลสูงกว่าการหมักด้วย *L. plantarum* เห็นได้ว่ากระบวนการหมักข้าวกล้องงอกโดยใช้เชื้อทั้งสองชนิดส่งผลให้สารแกมม่าโอไรซานอลในเมล็ดเพิ่มสูงสุดเท่ากับ 39.93 mg/100g (หมักด้วย *A. oryzae*) และ 37.18 mg/100g (หมักด้วย *L. plantarum*) เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวกล้องที่ผ่านกระบวนการงอก (25.36 mg/100g) และข้าวกล้อง control (16.51 mg/100g) (ภาพที่ 2 a)

อิทธิพลของกระบวนการงอกและหมักต่อปริมาณแกมม่าโอไรซานอลในข้าวฟ่าง พบว่า ข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการงอกมีปริมาณแกมม่าโอไรซานอลเพิ่มสูงขึ้น โดยมีปริมาณ เท่ากับ 0.92 มิลลิกรัม/100 กรัม เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวฟ่างที่ไม่ผ่านกระบวนการงอก มีปริมาณเท่ากับ 0.56 มิลลิกรัม/100 กรัม เมื่อนำข้าวฟ่างงอกไปหมักด้วย *L. plantarum* เป็นระยะเวลา 12-72 ชั่วโมง พบปริมาณแกมม่าโอไรซานอลเพิ่มสูงขึ้น (1.54-1.87 มิลลิกรัม/100 กรัม) เช่นเดียวกับข้าวฟ่างงอกที่หมักด้วย *A. oryzae* ที่พบปริมาณแกมม่าโอไรซานอลเพิ่มขึ้น (0.99-1.49 มิลลิกรัม/100 กรัม) และเมื่อเปรียบเทียบเชื้อ 2 ชนิดที่ใช้ในการหมักข้าวฟ่างงอกพบว่า *L. plantarum* สามารถเพิ่มปริมาณแกมม่าโอไรซานอลได้สูงกว่า *A. oryzae* อย่างไรก็ตามข้าวฟ่างงอกที่ผ่านกระบวนการหมัก นาน 72 ชั่วโมง มีปริมาณแกมม่าโอไรซานอลสูงสุด และข้าวฟ่างที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการใดๆ มีปริมาณแกมม่าโอไรซานอลต่ำสุด (ภาพที่ 2 b)

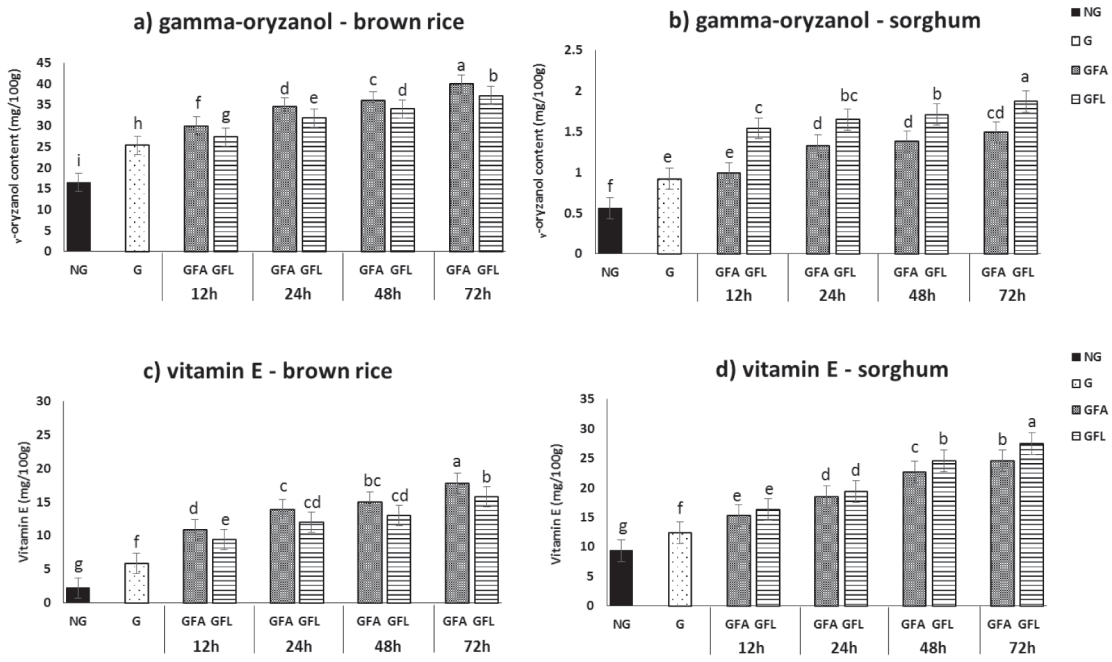
เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแกมม่าโอไรซานอลระหว่างข้าวกล้องและข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการงอกและกระบวนการหมัก พบว่า ข้าวกล้องมีปริมาณแกมม่าโอไรซานอลสูงกว่าข้าวฟ่างมากกว่า 30 เท่า (เมื่อยังไม่ผ่านกระบวนการงอกและกระบวนการหมัก) และเมื่อข้าวกล้องผ่านกระบวนงอกและหมัก แกมม่าโอไรซานอลมีปริมาณเพิ่มขึ้นและสูงกว่าปริมาณแกมม่าโอไรซานอลในข้าวฟ่างผ่านกระบวนการงอกและหมักประมาณ 30 เท่าเช่นเดียวกัน

3. ปริมาณวิตามินอีในข้าวกล้องและข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการงอกและหมัก

ในข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีปริมาณวิตามินอีในเมล็ด เท่ากับ 3.19 มิลลิกรัม/100 กรัม แต่เมื่อนำข้าวกล้องไปงอก พบปริมาณวิตามินอีเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า โดยมีปริมาณ เท่ากับ 5.91 มิลลิกรัม/100 กรัม เมื่อข้าวกล้องงอกถูกนำไปหมักด้วยเชื้อ 2 ชนิด ที่ระยะเวลา 12-72 ชั่วโมง ข้าวกล้องงอกที่ผ่านกระบวนการหมักด้วย *A. oryzae* นาน 72 ชั่วโมง มีปริมาณวิตามินอีสูงสุด เท่ากับ 17.81 มิลลิกรัม/100 กรัม รองลงมาพบว่าข้าวกล้องงอกที่หมักด้วย *L. plantarum* นาน 72 ชั่วโมง มีปริมาณวิตามินอี เท่ากับ 15.81 มิลลิกรัม/100 กรัม (ภาพที่ 2c)

ทำนองเดียวกันปริมาณวิตามินอีในข้าวฟ่างที่นำไปผ่านกระบวนการงอกมีปริมาณสูงกว่าข้าวฟ่างที่ไม่ผ่านกระบวนการงอก (9.37 มิลลิกรัม/100 กรัม) โดยมีปริมาณ เท่ากับ 12.41 มิลลิกรัม/100 กรัม อีกทั้งยังพบว่ากระบวนการหมักสามารถเพิ่มปริมาณวิตามินอีในข้าวฟ่างงอกที่หมักด้วย *A. oryzae และ L. plantarum* นาน 72 ชั่วโมง โดยมีปริมาณวิตามินอีสูงกว่าการหมักที่เวลา 12-48 ชั่วโมง ซึ่งข้าวฟ่างงอกหมักด้วย *L. plantarum* มีปริมาณวิตามินอีสูงกว่าการหมักด้วย *A. oryzae* โดยข้าวฟ่างงอกที่หมักด้วย *L. plantarum* มีปริมาณวิตามินอี อยู่ในช่วง 13.21- 27.46 มิลลิกรัม/100 กรัม ส่วนข้าวฟ่างงอกที่หมักด้วย *A. oryzae* มีปริมาณวิตามินอีอยู่ในช่วง 12.41-24.52 มิลลิกรัม/100 กรัม (ภาพที่ 2 d)

ในการทดลองนี้พบว่าข้าวฟ่าง control มีปริมาณวิตามินอีสูงกว่าข้าวกล้องที่ไม่ผ่านกระบวนการงอกหมัก ประมาณ 2.9 เท่า แต่เมื่อนำมางอกปริมาณวิตามินอีในข้าวฟ่างงอกมีสูงกว่าข้าวกล้องงอก 2.1 เท่า หลังจากนำข้าวฟ่างงอกมาผ่านกระบวนการหมักด้วยเชื้อ 2 ชนิด (*A. oryzae* และ *L. Plantarum*) แล้วมีปริมาณวิตามินอีสูงกว่าข้าวกล้องงอกหมัก 1.3-1.7 เท่า



*NG: non-germinated

*G: germinated

*GFA: germinated fermented with *Aspergillus oryzae*

*GFL: germinated fermented with *Lactobacillus plantarum*

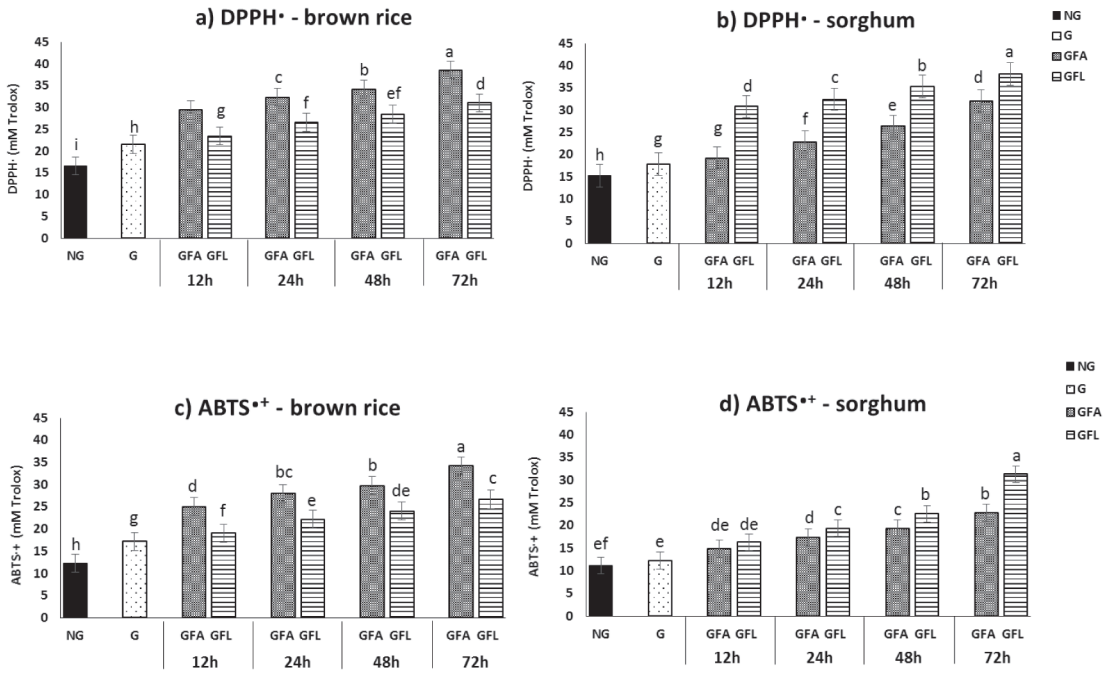
a, b, c,..... Means in the separate samples (brown rice or sorghum) with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

ภาพที่ 2 อิทธิพลของกระบวนการงอกและกระบวนการหมักด้วย *Aspergillus oryzae* และ *Lactobacillus plantarum* ต่อปริมาณสารแกมม่าโอไรซานอล ใน a) ข้าวกล้อง และ b) ข้าวฟ่าง และต่อวิตามินอีใน c) ข้าวกล้อง และ d) ข้าวฟ่าง

4. สมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของข้าวกล้องและข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการงอกและกระบวนการหมัก โดยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ($DPPH^{\bullet}$) และ 2, 2′-azinobiz (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) di-ammonium salt ($ABTS^{\bullet+}$)

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenger) ในข้าวกล้องและข้าวฟ่างผ่านกระบวนการงอกและกระบวนการหมัก โดยวิธี $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$ assay พบว่าข้าวกล้องที่ไม่ผ่านกระบวนการงอกหมักมีฤทธิ์ในการยังยั้งอนุมูลอิสระทั้งวิธี $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$ ต่ำกว่าข้าวกล้องงอก (ภาพที่ 3a และ 3c) เมื่อนำข้าวกล้องงอกไปหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ *A. oryzae* และ *L. plantarum* แปรระยะเวลาหมัก 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าข้าวกล้องงอกหมักด้วย *A. oryzae* และ *L. plantarum* มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี $DPPH^{\bullet}$ สูงกว่าวิธี $ABTS^{\bullet+}$ รวมทั้ง

ข้าวกล้องงอกที่หมักด้วย *A. oryzae* มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH$^{\bullet}$ และวิธี ABTS$^{\bullet+}$ สูงกว่าข้าวกล้องงอกหมักด้วย *L. plantarum* โดยการหมักด้วย *A. oryzae* มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH$^{\bullet}$ และวิธี ABTS$^{\bullet+}$ เท่ากับ 38.03 และ 31.67 mM Trolox ตามลำดับ (ภาพที่ 3 a และ 3 c) สำหรับในข้าวฟ่างพบว่าระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการหมักโดยใช้เวลา 12-48 ชั่วโมง ยกเว้นข้าวฟ่างงอกหมักด้วย *L. plantarum* มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH$^{\bullet}$ และวิธี ABTS$^{\bullet+}$ สูงกว่าข้าวฟ่างงอกหมักด้วย *A. oryzae* โดยข้าวฟ่างงอกหมักด้วย *L. plantarum* นาน 72 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH$^{\bullet}$ และวิธี ABTS$^{\bullet+}$ สูงสุดเท่ากับ 38.09 และ 31.28 mM Trolox ตามลำดับ (ภาพที่ 3 b และ 3 d) ในการทดลองนี้เห็นได้ว่า ข้าวกล้องงอกหมักและข้าวฟ่างงอกหมักมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH$^{\bullet}$ สูงกว่าวิธี ABTS$^{\bullet+}$ เนื่องจากสาร DPPH$^{\bullet}$ สามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมเข้าทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง แต่วิธี ABTS$^{\bullet+}$ สามารถให้และรับอิเล็กตรอนแก่สารตัวอย่าง ซึ่งในตัวอย่างทั้งข้าวและข้าวฟ่างที่มีหมู่ hydroxyl จำนวนมากและสามารถให้อะตอมไฮโดรเจนได้ดีกว่าการให้หรือรับอิเล็กตรอน ดังนั้นประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$ จึงสูงกว่าวิธี ABTS$^{\bullet+}$ (Floegel et al., 2011)



*NG: non-germinated

*G: germinated

*GFA: germinated fermented with *Aspergillus oryzae*

*GFL: germinated fermented with *Lactobacillus plantarum*

a, b, c,.... Means in the separate samples (brown rice or sorghum) with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

ภาพที่ 3 อิทธิพลของกระบวนการงอกและกระบวนการหมักด้วย *Aspergillus oryzae* และ *Lactobacillus plantarum* ต่อสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี $DPPH^{\bullet}$ ใน a) ข้าวกล้อง และ b) ข้าวฟ่าง และ โดยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ ใน c) ข้าวกล้อง และ d) ข้าวฟ่าง

5. ความสัมพันธ์ของปริมาณฟินอลิคทั้งหมด แกมม่าโอไรซานอลและวิตามินอี ต่อการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2′-azinobiz (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Diammonium salt ($ABTS^{\bullet+}$) และ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ($DPPH^{\bullet}$)

ตารางที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณสารประกอบฟินอลิคทั้งหมด แกมมม่าโอไรซานอล และวิตามินอี ต่อประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งพบว่าสารพฤกษเคมีทั้ง 3 ชนิดมีปฏิสัมพันธ์เชิงบวก (positive correlation) กับประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ทั้งโดยวิธี $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งข้าวกล้องมีปริมาณสารแกมม่าโอไรซานอลสูงกว่าข้าวฟ่าง แต่วิตามินอีต่ำกว่าข้าวฟ่าง สำหรับปริมาณสารฟินอลิคทั้งหมดของข้าวกล้องและข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการ

ทางชีวภาพ (กระบวนการงอกและหมัก) มีปริมาณใกล้เคียงกัน ในการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH$^{\bullet}$ ของข้าวกล้องและข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการงอกและหมัก มีค่าสูงกว่าประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS$^{\bullet+}$

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ของปริมาณฟินอลิคทั้งหมด แกมม่าโอไรซานอลและวิตามินอี ต่อการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$ และ DPPH$^{\bullet}$ ในข้าวกล้อง

	DPPH$^{\bullet}$		ABTS$^{\bullet+}$	
ข้าวกล้อง	Linear regression (y=ax+b)	Correlation (R^2)	Linear regression (y=ax+b)	Correlation (R^2)
Total phenolic acid	y=1.495x+8.99	0.958	y=1.494x+13.36	0.960
Gamma-oryzanol	y=1.448x+8.35	0.951	y=1.423x+12.45	0.954
vitamin E	y=1.534x+8.22	0.936	y=1.566x+12.52	0.945
ข้าวฟ่าง				
Total phenolic acid	y=1.092x+6.82	0.813	y=1.611x+9.37	0.895
Gamma-oryzanol	y=1.624x+9.20	0.895	y=1.092x+6.82	0.812
vitamin E	y=1.627x+7.16	0.894	y=1.106x+8.63	0.815

อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการทดลองสามารถวิเคราะห์ได้ว่ากระบวนการงอกส่งผลให้ปริมาณสารสำคัญในข้าวกล้องและข้าวฟ่าง เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟินอลิคทั้งหมด วิตามินอี และแกมม่าโอไรซานอลมีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งสาเหตุของการเพิ่มขึ้นเกิดจากกระบวนการทางชีวเคมีภายในเมล็ดในขณะที่นำเมล็ดมาแช่น้ำ มีไฮโดรไลติค เอนไซม์ (hydrolytic enzymes) หลายชนิดที่ถูกปลดปล่อยออกมาเพื่อย่อยสลายอาหารที่สะสมในเมล็ดจำพวกแป้งให้เป็นกลูโคสสำหรับใช้เป็นพลังงานเพื่อให้เมล็ดเจริญเติบโต รวมถึงการสร้างสารพฤกษเคมีที่สำคัญๆ (โดยเฉพาะสารสารฟินอลิคทั้งหมด) เพื่อใช้ในการป้องกันตัวเอง จากปัจจัยภายนอกที่สามารถทำลายเมล็ด (Moongngarm & Saetung, 2010) ซึ่งสารฟินอลิคทั้งหมดสังเคราะห์ผ่าน Shikimic acid pathway ในการสังเคราะห์ฟินอลิคทั้งหมดในระหว่างการงอกอาศัยปัจจัย เช่น แสง อุณหภูมิ คาร์โบไฮเดรตภายในเมล็ด (Kayahara et al., 2000) ดังนั้นการงอกจึงเป็นปัจจัยที่ทำให้เมล็ดเกิดการสังเคราะห์ฟินอลิคทั้งหมดภายในเมล็ด (Moongngarm & Saetung, 2010)

สำหรับปริมาณวิตามินอีที่พบว่ามีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเมล็ดพืชผ่านกระบวนการงอก เป็นผลมาจากกระบวนการงอกจะกระตุ้นเอนไซม์ในเมล็ดข้าวให้มีการย่อยสลายวิตามินอีที่อยู่ในรูป complex form ให้อยู่ในรูป simple form เช่น **α**- tocopherol ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระส่งผลให้วิตามินอีเพิ่มสูงขึ้น (Lin & Lai, 2011) เช่นเดียวกันกับปริมาณแกมม่าโอไรซานอลที่กระบวนการงอกสามารถทำให้ปริมาณแกมม่าโอไรซานอลเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากไฮโดรไลติค เอนไซม์

(hydrolytic enzymes) ย่อยสลาย ferulate ที่อยู่ในรำ หรือ bran layer ให้กลายเป็นอนุพันธ์ขนาดโมเลกุลเล็กๆ คือ แกมม่าโอไรซานอล กระบวนการงอกจึงมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของสารสำคัญ (Vanessa et al., 2012)

เมื่อนำข้าวกล้องและข้าวฟ่างที่ผ่านกระบวนการงอกไปหมักด้วย 2 ชนิด คือ *L. plantarum* และ *A. oryzae* พบว่าปริมาณสารสำคัญได้แก่ สารฟินอลิคทั้งหมด วิตามินอี และแกมม่าโอไรซานอล มีปริมาณเพิ่มขึ้นมากกว่าที่ผ่านกระบวนการงอกโดย *L. plantarum* สามารถสร้างเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารคะตะไลซ์ (catalyze) ในการสร้างสารประกอบฟินอลิคได้ (Coda et al., 2010) ส่วนการหมักด้วย *A. oryzae* สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส (α-glucosidase) และกลูโคอะไมเลส (gluco-amylase) เพื่อย่อยแป้งเป็นน้ำตาลและสารประกอบชนิดอื่นได้ (Oliveira et al., 2011) ทำให้กระบวนการหมักเป็นวิธีที่สามารถเพิ่มปริมาณสารสำคัญในเมล็ดได้ดี และระยะเวลาในการหมักที่นานขึ้นสามารถเพิ่มปริมาณสารสำคัญได้มากขึ้น โดยในการทดลองครั้งนี้พบว่าข้าวกล้องและข้าวฟ่างที่หมักด้วยเชื้อทั้ง 2 ชนิด ที่ระยะเวลาหมักนาน 72 ชั่วโมงมีปริมาณสารสำคัญสูงที่สุด เนื่องจากจุลินทรีย์มีระยะในการเจริญเติบโต (growth rate) ที่แตกต่างกัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงปริมาณของสารสำคัญมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วอาจเป็นเพราะการหมักข้าวกล้องงอกและข้าวฟ่างงอก ที่ระยะเวลาการหมักนาน 24 ชั่วโมง การเจริญของเชื้ออยู่ในช่วงการเจริญเติบโตแบบ log phase ซึ่งเป็นระยะนี้เซลล์มีการเจริญเติบโตมากที่สุด จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นแบบ exponential (Jozsef & Terry, 1994) เมื่อหมักนานขึ้นสารสำคัญจะเพิ่มขึ้นแต่ไม่รวดเร็วเท่าระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง และพบว่าเมื่อหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมล็ดพืชมีการสร้างสารและสะสมสารสำคัญในปริมาณเพิ่มสูงสุด ซึ่งในการทดลองมีการทดสอบระยะเวลาในการหมักต่อไปจนถึง 5 วัน (120 ชั่วโมง) พบว่าสารสำคัญมีอัตราการสร้างลดลง เนื่องจากกระบวนการย่อยและดูดซึมสารอาหารของจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ออกมาย่อย substrate และดูดซึมเข้าไปในเซลล์ ซึ่งเกิดในช่วงที่หมักเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงแรก และ substrate ที่เหลือมักถูกย่อยให้เป็นโมเลกุลเล็กๆ เช่น แป้งถูกย่อยเป็นน้ำตาลแล้วเข้าสู่วัฏจักร เกิดการสร้างสังเคราะห์สารประกอบอื่นๆ เช่น ฟินอลิคทั้งหมด และสารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่นๆ สำหรับไขมันมักถูกย่อยเป็นกรดไขมันและสารสำคัญอื่นๆได้แก่ วิตามินอีและแกมม่าโอไรซานอล ส่วนโปรตีนมักถูกย่อยเป็นกรดอะมิโนซึ่งมี function เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และหลังจากนั้นจุลินทรีย์จะมีการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์มากขึ้นทำให้สารสำคัญในเมล็ดพืชถูกใช้มากขึ้นจึงเป็นสาเหตุที่เมื่อระยะเวลาการหมักเกิน 72 ชั่วโมงจึงมีปริมาณสารสำคัญลดลง (Jozsef & Terry, 1994)

สรุปผลการวิจัย

กระบวนการงอกและกระบวนการหมักข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวฟ่างพันธุ์เฮกการี่ทำให้เพิ่มปริมาณสารประกอปฟินอลิคทั้งหมด แกมม่าโอไรซานอล วิตามินอี และประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH และ $ABTS^{\cdot+}$ assay อย่างไรก็ตามการหมักข้าวกล้องงอกด้วย *A. oryzae* ส่งผลให้เกิดการสร้างสารประกอบฟินอลิคทั้งหมดทั้งหมด แกมม่าโอไรซานอล วิตามินอี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวกล้องงอกหมักด้วย *L. plantarum* ในทางตรงกันข้ามการหมักข้าวฟ่างงอกด้วย *L. plantarum* ส่งผลให้เกิดการสร้างสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด แกมม่าโอไรซานอล วิตามินอี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มมากกว่าข้าวฟ่างงอกหมักด้วย *A. oryzae* สำหรับระยะเวลาการหมักข้าวกล้องงอกและข้าวฟ่างนานขึ้น พบว่าการหมักนาน 72 ชั่วโมงมีการสร้างสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด แกมม่าโอไรซานอล วิตามินอี และมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สูงกว่าการหมักเวลา 12-48 ชั่วโมง ซึ่งสารพฤกษเคมีทั้ง 3 ชนิด (สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด แกมม่าโอไรซานอล วิตามินอี) มีความสัมพันธ์ต่อประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี $DPPH^{\cdot}$ และ $ABTS^{\cdot+}$ อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ซึ่งกระบวนการงอกร่วมกับกระบวนการหมักสามารถนำมาใช้เพิ่มคุณค่าของสารสำคัญในข้าวกล้องและข้าวฟ่างได้เป็นอย่างดี และสามารถนำข้าวกล้องงอกหมักด้วย *A. oryzae* และข้าวฟ่างหมักงอกด้วย *L. plantarum* ไปใช้ได้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อสุขภาพ (nutraceutical food)

ข้อเสนอแนะ

1. ควรนำข้าวกล้องงอกหมัก หรือข้าวฟ่างงอกหมัก ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อสุขภาพ เพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารแก่ผู้บริโภค และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตผลทางการเกษตรของข้าวและข้าวฟ่าง
2. อาจนำข้าวกล้องงอกหมักด้วย *A. oryzae* เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ไปสกัดสารแกมม่าโอไรซานอล หรือนำข้าวฟ่างหมักงอกด้วย *L. plantarum* เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาสกัดวิตามินอี เพื่อใช้เป็นสารเสริมฤทธิ์ชีวภาพ (synergistic compounds)
3. ควรศึกษา sensory evaluation ของข้าวกล้องงอกหมักและข้าวฟ่างงอกหมักด้วย *A. oryzae* และ *L. plantarum* ก่อนนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารต่อไป

References

Augustin, J. & Klein, B.P. (1989). *Nutrient Composition of Caw, Cooked, Canned and Sprouted Legumes.* In R. H. Metthews (Ed.), Legumes: Chemistry, Technology and Human Nutrition. New York: Marcel Deckker, 187-217.

Coda, R., Rizzello, C.G. & Gobbetti, M. (2010). Use of Sourdough Fermentation and Psedo-Cereals and Leguminous Flours for the Making of a Functional Bread Enriched of Aminobutyric Acid (GABA). *Food Microbiology,* 137, 236-245.

Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S.I. & Chun, O.K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH Assays to Measure Antioxidant Capacity in Popular Antioxidant-Rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis,* 24, 1043-1048.

Gerhardt, A.L. & Gallo, N. B. (1998). Full-fat Rice Bran and Oat Bran Similarly Reduce Hypercholesterolemia in Humans. *Journal Nutrition.* 128 (5), 865-869.

Halliwell, B. (1991). Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry and Role in Hormone Disease. *American Journal of Medicine,* 91, 14-22.

Hubert, J., Berger, M., Nepveu, F., Paul, F. & Dayde, J. (2008). Effects of Fermentation on the Phytochemical Composition and Antioxidant Properties of Soy germ. *Food Chemistry,* 109, 709-721.

Iqbal, S., Bhanger, M.I. & Anwar, F. (2005). Antioxidant Properties and Components of some Commercially Available Varieties of Rice Bran in Pakistan. *Food Chemistry,* 93 (2), 265-272.

Jozsef, B. & Terry, A. R. (1994). A Dynamic Approach to Predicting Bacterial Growth in Food. *International Journal of Food Microbiology,* 23 (4), 277-294.

Katina, K., Liukkonen, K.H., Kaukovirta-Norja, A., Adlercreutz, H., Heinonen, S.M. & Lampi, A.M. (2007). Fermentation-Induced Changes in the Nutritional Value of Native or Germinated Rye. *Journal of Cereal Science,* 46, 348-355.

Kayahara, H., Tsukahara, K. & Tatai, T. (2000). Flavor, Health and Nutritional Quality of Pre-Germinated Brown Rice. *In 10th International Flavor Conference,* Paros, Greece, 546-551.

Kerdchoechuen, O., Laohakunjit, N. & Kokilakanishtha, O. (2013). Effect of pH and Temperature of Seed Soaking Water on Nutrition Quality of Germinated 'Khao Dowk Mali 105' Rice. *SDU Research Journal Sciences and Technology,* 6, 171-186. (in Thai)

Komutiban, O. (2014). Antioxidant Activity of Crude Extracts from the Heartwood of Artocarpus Lakoocha Roxb. SDU Research Journal Sciences and Technology, 7, 33-41. (in Thai)

Kritchevsky, D., & Chen, S.C. (2005). Phytosterols-Health Benefits and Potential Concerns. *Reviews in Nutrition Research,* 25, 413-428.

Laohakunjit, N. (2012). *Process Improvement of Nutraceutical Products from Thai Rice and Cereals for Old Age Citizens.* Research Report and Development for Agricultural Research: Final Report, Agricultural Research Development Agency (Public organization). (in Thai).

Moongngarm, A. & Saetung, N. (2010). *Comparison of Chemical Compositions and Bioactive Compounds of Germinated Rough Rice and Brown Rice*. Food Chemistry, 122, 782-788.

Nguyen, T.T., Guyot, J.P., Icard, V.C. & Rochette, I.G. (2007). Effect of High Pressure Homogenisation on the Capacity of *Lactobacillus plantarum* A6 to Ferment Rice/ soybean Slurries to Prepare High Energy Density Complementary Food. *Food Chemistry,* 102, 1288-1295.

Oliveira, M. S., Feddern, V., Kupski, L., Cipolatti, E.P., Badiale-Furlong, E. & Souza- Soares, L.A. (2011). Changes in Lipid, Fatty Acids and Phospholipids Composition of Whole Rice Bran after Solid-state Fungal Fermentation. *Bioresource Technology,* 102, 8335-8338.

Lin, P.Y., L. & Lai, H.M. (2011). Bioactive Compounds in Rice during Grain Development. *Food Chemistry,* 127, 86-93.

Prior R.L., Cao, G., Martin A., Sofic M. J., Brien O.C., Lischner, N., Ehlenfeldt M., Kalt W., Krewer G, & Mainland C.M. (1998). Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity,and Variety of Vaccinium Species. *Journal Agriculture.* Food Chemistry, 46, 2686-2693.

Vanessa, R.P., Rui, C., Zambiazi, Carla, R.B., Mendonça, Miriam, B.C. & Guillermo, R. (2012). γ-Oryzanol and Tocopherol Contents in Residues of Rice Bran Oil Refining. *Food Chemistry,* 134, 1479-1483.

Watchararparpaiboon, W., Laohakunjit, N. & Kerdchocheun, O. (2010). An Improved Process for High Quality and Nutrition of Brown Rice Production. *Food Science and Technology International,* 16 (147), 147-158.

Yen, G.C., Chang, Y.C. & Su, S.W., (2003). Antioxidant Activity and Active Compounds of Rice Koji-Fermented with *Aspergillus candidus*, *Food Chemistry,* 83, 49-54.

Zhang H., Zhang X. & Hu Y., (2013). Effects of NaCl and Na_2CO_3 Stresses on Growth and Photosynthetic Characteristics of Mulberry Seedlings. *Journal of Nanjing Forestry University* (Natural Science Edition), 37(1), 55-60.

คณะผู้เขียน

นางสาวภัสจนันท์ หิรัญ

นักศึกษาปริญญาเอก สาขาเทคโนโลยีชีวเคมี

คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

e-mail: zezazaz@hotmail.com

รองศาสตราจารย์ ดร. อรพิน เกิดชูชื่น

อาจารย์ประจำคณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

e-mail: orapin.ker@kmutt.ac.th

รองศาสตราจารย์ ดร. ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์

อาจารย์ประจำคณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

e-mail: nutta.lao@kmutt.ac.th