

การพัฒนากระบวนการผลิตรำข้าวหมักบรรจุแคปซูลและการตรวจสอบคุณภาพ



อรจินดา กานุมัต

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2567

การพัฒนากระบวนการผลิตรำข้าวหมักบรรจุแคปซูลและการตรวจสอบคุณภาพ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักบริหารและพัฒนาระบบราชการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2567

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การพัฒนากระบวนการผลิตซ้ำข้ามหมักบรรจุแคปซูลและการตรวจสอบคุณภาพ

อรจินดา กานุ่มัด

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร.จุฑามาศ มณีวงศ์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร อมรเลิศพิศาล)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยยศ สัมฤทธิ์สกุล)

รักษาการแทนรองอธิการบดี

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

| | |
|----------------------|---|
| ชื่อเรื่อง | การพัฒนากระบวนการผลิตรำข้าวหมักบรรจุแคปซูลและการตรวจสอบคุณภาพ |
| ชื่อผู้เขียน | นางสาวอรจินดา กานุมัด |
| ชื่อปริญญา | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน |

บทคัดย่อ

รำข้าวเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการสีข้าวซึ่งอุดมด้วยสารอาหารที่หลากหลาย ทั้งโปรตีน เส้นใยอาหาร ไขมัน และสารพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อร่างกายผู้บริโภค อย่างไรก็ตามรำข้าวมีสารให้โทษหลายชนิดต่อร่างกายหรือที่เรียกว่าสารต้านโภชนาการรวมอยู่ด้วย ดังนั้น จึงมีแนวคิดพัฒนาผลิตภัณฑ์จากรำข้าวให้เป็นอาหารฟังก์ชันด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อเพิ่มมูลค่าให้ผลพลอยได้ชนิดนี้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิตรำข้าวหมักที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสามารถช่วยเพิ่มฤทธิ์ชีวภาพบางประการและกำจัดสารต้านโภชนาการได้ เพื่อคัดเลือกเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการขยายขนาดการผลิตและการขึ้นรูปงรำข้าวหมัก และเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบเชิงโภชนาการและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพบางประการของรำข้าวหมัก จากงานวิจัยพบว่าจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการหมักรำข้าวเพื่อเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ฤทธิ์กำจัดอนุมูล ABTS⁺) และกำจัดกรดไฟติก คือ เชื้อรา *Rhizopus microsporus* โดยรำข้าวหมักจากเชื้อราดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 87.32 ± 2.18 และสามารถปลดปล่อยฟอสเฟตอิสระ 1.69 ± 0.18 มิลลิกรัมต่อกรัมรำข้าว นอกจากนี้ ยังพบว่าเชื้อ *R. microsporus* ยังสามารถผลิตเอนไซม์ เช่น เซลลูเลส ไสลาเนส เอสเทอเรส โปรติเอส และไฟเตสได้ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีประโยชน์ในการย่อยโครงสร้างเส้นใยของรำข้าวให้เป็นน้ำตาลที่มีขนาดเล็กและละลายน้ำ ต่อมาทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักรำข้าว โดยใช้แผนการทดลอง Box-Behnken design ศึกษาปัจจัยการหมักทั้งสิ้น 3 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณความชื้น (ร้อยละ 50-100 โดยน้ำหนักแห้ง) อุณหภูมิ (25-45 องศาเซลเซียส) และ ปริมาณหัวเชื้อ (10^4 - 10^6 สปอร์/กรัม) พารามิเตอร์ที่ใช้วัดคุณภาพรำข้าวหมัก ได้แก่ ฤทธิ์กำจัดอนุมูล ABTS⁺ และปริมาณฟอสเฟตอิสระในรำข้าวหมัก พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักรำข้าว คือ ความชื้นร้อยละ 33.6 โดยน้ำหนักแห้ง อุณหภูมิ 35.9 องศาเซลเซียส และปริมาณหัวเชื้อ 10^6 สปอร์/กรัมรำข้าว โดยสามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปลดปล่อยฟอสเฟตโดยทฤษฎีเท่ากับร้อยละ 64.94 และ 6.63 มิลลิกรัมต่อกรัมรำข้าว ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในการหมักเพื่อยืนยันผลพบว่ารำข้าวหมักมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปลดปล่อยฟอสเฟตเท่ากับร้อยละ

ละ 61.59 ± 8.24 และ 7.32 ± 0.08 มิลลิกรัมต่อกรัมรำข้าว ตามลำดับ ซึ่งคลาดเคลื่อนจากค่าทฤษฎี ร้อยละ 0.69 และ 3.36 ตามลำดับ รำข้าวหมักที่ผลิตภายใต้สภาวะที่เหมาะสมได้ถูกนำมาศึกษา อุณหภูมิการทำแห้งที่เหมาะสมด้วยเครื่องอบแห้งแบบลมร้อนตั้งแต่ 60-100 องศาเซลเซียส โดย พารามิเตอร์ที่ใช้บ่งบอกคุณภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟอสเฟตอิสระ ปริมาณน้ำตาล รีดิวซ์และปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในรำข้าวหมัก ผลการศึกษาพบว่าการทำแห้งที่ 70 องศา เซลเซียส เป็นระดับที่เหมาะสมที่สุด โดยผลิตภัณฑ์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงร้อยละ 75.25 ในขณะที่ สูญเสียน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีนที่ละลายได้ดีที่สุดเพียงร้อยละ 10.45 และ 1.3 ตามลำดับ ($p < 0.05$) ทำการศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในรำข้าวหมักด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) พบสารประกอบฟีนอลิก 4 ชนิด *p*-coumatic acid, transferulic acid, sinapic acid และ caffeic acid เพิ่มขึ้นภายหลังการหมัก และจากการวิเคราะห์คุณภาพของ ผลิตภัณฑ์รำข้าวหมักทำการวิเคราะห์ฤทธิ์กำจัดอนุมูล ABTS⁺ ปริมาณฟอสเฟตอิสระ ปริมาณโปรตีน ที่ละลายได้ จากผลการเก็บรักษาตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์ และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส (สภาพแห้ง) พบว่าจากการเก็บรักษาในช่วง 4 สัปดาห์แรกมีแนวโน้มยังคง คุณค่าของอาหารไว้ได้ดีในระดับหนึ่ง แต่หลังจากจากเก็บรักษาในช่วงสัปดาห์ที่ 5 เริ่มลดลงตามระยะ จากเก็บรักษาจากผลการทดลองที่กล่าวทั้งหมดนี้พบว่างานวิจัยนี้มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาต่อใน กลุ่มอาหารเพื่อสุขภาพได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติทางโภชนาการและสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย และยังเป็นทางเลือกที่ดีในการสร้างอาหารที่มีคุณภาพและเพื่อสุขภาพดีให้กับผู้บริโภคได้ โดยสามารถ นำไปพัฒนาในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม รวมถึงสามารถพัฒนาต่อในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ได้อีกด้วย

คำสำคัญ : รำข้าวหมัก, ไรโซปัส ไมโครสปอรัส, อาหารฟังก์ชัน, สารต้านอนุมูลอิสระ, สารพฤกษเคมี, สารต้านโภชนะ

| | |
|---------------------------------------|---|
| Title | PROCESS DEVELOPMENT OF FERMENTED RICE BRAN IN CAPSULE AND QUALITY TEST |
| Author | Miss Onjinda Kanumad |
| Degree | Master of Science in Biotechnology |
| Advisory Committee Chairperson | Assistant Professor Dr. Pairote Wongputtisin |

ABSTRACT

Rice bran is a by-product obtained after milling. It contains protein, fiber, fat, and phytochemicals, which exhibit the bioactivities to consumer's health. However, rice bran also contains many anti-nutritional factors, the negative effect agent to health. Therefore, the product development from rice bran as the functional food to enhance the value of this by product was proposed. This research aimed to select a promising microorganism for the fermented rice bran production with high biological activity and antinutritional factors removal. It was found that the *Rhizopus microsporus* fungus was selected as a promising strain with contribution of the highest antioxidant (ABTS^{•+} scavenger) and phytic acid removal activity. The antioxidant activity and free phosphate liberation in fermented rice bran were at 87.32%±2.18, and 1.69±0.18 mg/g of rice bran, respectively. Furthermore, it was found that *R. microsporus* could produce several enzymes such as cellulase, xylanase, esterase, protease, and phytase. These enzymes were responsible in breaking down the fibrous structure of rice bran into the smaller molecules and higher water solubility. Subsequently, the optimal conditions for fermented rice bran production were investigated using, the Box-Behnken experimental design. Three factors, including moisture content (50-100% dry basis), temperature (25-45 °C) and inoculum size (10^4 - 10^6 spore/g), and the quantitative parameter, including ABTS^{•+} scavenging activity and available phosphate of fermented rice bran, were studied. The results showed that the optimum conditions in the rice bran fermentation process were 33.6 %dry basis of moisture content, at 35.9 °C and 6 log cfu/gbran of inoculum. The obtained theoretical responses were 64.94% and 6.63 mg/g bran for

antioxidant activity and available phosphate content, respectively. However, the obtained responses after verification step of antioxidant activity and free phosphate content were $61.59 \pm 8.24\%$ and 7.32 ± 0.08 , respectively, which were inaccurate approximately 0.69 and 3.36% comparing to the theoretical responses. Finally, the optimal drying temperature of fermented rice bran was studied in the hot air oven between 60-100 °C and the response parameters were ABTS^{•+} scavenging activity and the content of soluble phosphate, reducing sugar and protein. It was found that 70 °C was the optimum drying temperature. The dried product possessed the highest antioxidant activity of 75.25%, while the decrease of soluble reducing sugar and protein were only 10.45 and 1.3%, respectively ($p < 0.05$). In the study of phenolic compounds of the fermented rice bran by HPLC apparatus, the results showed that *p*-coumaric acid, transferulic acid, sinapic acid and caffeic acid contents were increased after the fungal fermentation. The dry product was stored under 4, 30 and 45 °C for 8 weeks. It was investigated that some nutritional values (ABTS^{•+} scavenging activity, soluble protein and available phosphate) were not significantly changed during the first 4 weeks storage. However, these parameters continuously declined after 5 weeks. From all the mentioned experimental results, it was found that, the research indicates that this particular study has promising potential for future development in the health food sector. Its nutritional properties and beneficial nutrients make it an attractive option for creating high-quality, healthy food products. Additionally, it could be further explored in the food and beverage industry, as well as in cosmetics.

Keywords : rice bran, rhizopus microsporus, functional food, antioxidant, phytochemicals, antinutritional factors

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาและความช่วยเหลือจากคณาจารย์ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่คอยให้คำปรึกษา อบรมสั่งสอน คอยแนะนำ เอาใจใส่ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาในการเรียนและการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องของข้าพเจ้าให้ดียิ่งขึ้น และให้ความรู้แก่ข้าพเจ้าจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. จุฑามาศ มณีวงศ์ และ ผศ.ดร. ดวงพร อมรเลิศพิศาล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมในวิทยานิพนธ์ที่ให้คำปรึกษา คอยสอนและแนะนำเทคนิคต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. กฤษณา อุ่んばん ประธานสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รวมถึงให้คำปรึกษาในการแก้ไขข้อบกพร่องเล่มวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์และขอขอบคุณแหล่งทุนอุดหนุนการวิจัยและนวัตกรรมจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ปี 2563 และบริษัท สมา เฮลท์ดีแคร์ จำกัด และขอขอบคุณการสนับสนุนของสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ในการให้ยืมใช้เครื่องมือและสถานที่ ในการทำวิจัยครั้งนี้

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่คอยให้กำลังใจ สนับสนุนและห่วงใย ข้าพเจ้าจนการเรียนและการทำวิจัยประสบความสำเร็จ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ศึกษาศาสตร์และผู้มีส่วนร่วมทุกท่านที่ข้าพเจ้าเคารพรัก รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ ที่ช่วยให้คำแนะนำที่ดีมาโดยตลอดและขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ความสะดวกแก่ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาที่ปฏิบัติงาน

ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในพระคุณอย่างสูง หวังว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะมีประโยชน์แก่ผู้ที่มาศึกษา จึงขอมอบส่วนดีทั้งหมดนี้ให้แก่เหล่าคณาจารย์ บิดา มารดา และผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน จนทำให้ผลงานวิจัยเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่มาศึกษาและยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่เข้ามาศึกษา เพื่อพัฒนา งานวิจัยต่อไป ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

อรจินดา กานุมัด

สารบัญ

| | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ค |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | จ |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ช |
| สารบัญ..... | ซ |
| สารบัญตาราง..... | ฅ |
| สารบัญรูปภาพ..... | ฉ |
| บทที่ 1 | 1 |
| บทนำ..... | 1 |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหา..... | 1 |
| วัตถุประสงค์..... | 2 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 2 |
| บทที่ 2 | 3 |
| ทฤษฎีและการตรวจสอบเอกสาร..... | 3 |
| 1. องค์ประกอบของข้าว..... | 3 |
| 2. รำข้าว (rice bran)..... | 4 |
| 3. ประโยชน์ของรำข้าว..... | 7 |
| 4. ไฟเตท (Phytate) และแหล่งที่พบไฟเตท..... | 8 |
| 5. ไฟเตทกับภาวะโภชนาการ..... | 9 |
| 6. การกำจัดไฟเตท..... | 10 |
| 7. สารอนุมูลอิสระ (free radical)..... | 12 |
| 8. สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)..... | 13 |

| | |
|--|----|
| 9. กลไกปฏิกิริยาออกซิเดชัน | 15 |
| 10. ความสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ | 15 |
| 11. สารต้านอนุมูลอิสระจากรั้วพืช | 15 |
| 12. กลูโคซามีน..... | 17 |
| 13. หลักการกระบวนการหมัก..... | 18 |
| 14. ความเป็นมาของเทคโนโลยีอาหารหมัก..... | 20 |
| 15. ประโยชน์ของอาหารหมัก | 21 |
| 16. การแบ่งประเภทของอาหารหมัก..... | 21 |
| 17. การหมักบนอาหารแข็ง (solid state fermentation)..... | 24 |
| 18. ข้อดีของการหมักในอาหารแข็ง | 24 |
| 19. ข้อเสียของการหมักในอาหารแข็ง..... | 25 |
| 20. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก..... | 25 |
| 21. จุลินทรีย์ที่สำคัญในการหมัก | 26 |
| งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 31 |
| อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง | 34 |
| อุปกรณ์และสารเคมี | 34 |
| วิธีการทดลอง..... | 38 |
| 1. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการหมักรำข้าว..... | 38 |
| 2. การหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักรำข้าว..... | 39 |
| 3. การทดสอบเบื้องต้นในการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์..... | 41 |
| 4. การศึกษาความเป็นไปได้ในการขยายขนาดการหมัก..... | 41 |
| 5. การทดสอบคุณภาพของรำข้าวหมัก..... | 41 |
| 6. วิเคราะห์..... | 42 |
| 6.1 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด..... | 42 |

| | |
|--|----|
| 7. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ..... | 47 |
| บทที่ 4 | 48 |
| ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล | 48 |
| 1. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการหมักรำข้าว | 48 |
| 2. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักรำข้าว | 53 |
| 3. ผลของระยะเวลาการหมักที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา <i>R. microsporus</i> BG5 | 58 |
| 3.1 ผลการศึกษาปริมาณกลูโคซามีนจากเซลล์ของเชื้อรา..... | 58 |
| 3.2 ผลของระยะเวลาการหมักที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส | 59 |
| 3.3 ผลของระยะเวลาการหมักที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส | 60 |
| 3.4 ผลของระยะเวลาการหมักที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส..... | 61 |
| 3.5 ผลของระยะเวลาการหมักที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส | 62 |
| 3.6 ผลของระยะเวลาการหมักที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอร์เลส | 64 |
| 3.7 ผลการศึกษาปริมาณกรดไฟติกของรำข้าวหมักด้วยเชื้อรา <i>R. microsporus</i> BG5..... | 65 |
| 4. ผลการศึกษาความเป็นไปได้ในการขยายขนาดการหมัก..... | 68 |
| 5. ผลของอุณหภูมิต่อการทำแห้ง | 72 |
| 6. ผลการเปรียบเทียบการทำแห้งผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่องมือทำแห้งชนิดต่างๆ | 76 |
| 7. การทดสอบคุณภาพของรำข้าวหมัก | 80 |
| 7.1 การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของรำข้าว..... | 80 |
| 7.2 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) | 81 |
| 7.3 ผลศึกษาการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ในผลิตภัณฑ์รำข้าวหมัก | 82 |
| 7.4 การทดสอบคุณภาพระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิต่างๆ | 84 |
| บทที่ 5 | 89 |
| สรุปผลการวิจัย | 89 |

ข้อเสนอแนะ..... 90

ภาคผนวก..... 91

บรรณานุกรม..... 104

ประวัติผู้วิจัย..... 112



สารบัญตาราง

| | หน้า |
|---|------|
| ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของรำข้าว | 5 |
| ตารางที่ 2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรำข้าว | 6 |
| ตารางที่ 3 ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระ | 14 |
| ตารางที่ 4 สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธัญพืช | 16 |
| ตารางที่ 5 ปริมาณของแกมมาออริซานอลและโทโคฟีรอลที่พบส่วนต่าง ๆ ของข้าว | 17 |
| ตารางที่ 6 ชนิดของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก | 23 |
| ตารางที่ 7 ยีสต์และแบคทีเรียแลคติกในอาหารหมัก | 23 |
| ตารางที่ 8 ค่าพารามิเตอร์ของการศึกษาแต่ละระดับปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย | 40 |
| ตารางที่ 9 แผนการทดลอง Box-Behnken design สำหรับ 3 ปัจจัย | 40 |
| ตารางที่ 10 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน สำหรับแบบจำลองการถดถอย | 56 |
| ตารางที่ 11 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ประมาณการโดยแบบจำลองการถดถอย | 56 |
| ตารางที่ 12 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน สำหรับแบบจำลองการถดถอย | 57 |
| ตารางที่ 13 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ประมาณการโดยแบบจำลองการถดถอย | 57 |
| ตารางที่ 14 แผนภูมิแสดงปริมาณฟอสเฟตของรำข้าวหมัก | 57 |
| ตารางที่ 15 ปริมาณไฟเตสจากการหมักซีสเตรทต่างๆ ด้วยเชื้อรา กลุ่ม Rhizopus spp. | 63 |
| ตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์ความชื้นในผงรำข้าวหมักที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยอุปกรณ์ต่างๆ | 77 |
| ตารางที่ 17 รายงานผลการทดสอบรำข้าวหมัก | 80 |
| ตารางที่ 18 รายงานผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก | 82 |
| ตารางที่ 19 ผลการจำแนกยีสต์ รา และแบคทีเรียโดยวิธีทางโมเลกุล | 101 |

สารบัญรูปภาพ

| | หน้า |
|--|------|
| ภาพที่ 1 แสดงส่วนประกอบของข้าว..... | 3 |
| ภาพที่ 2 สูตรโครงสร้างไฟเตท (Phytate)..... | 9 |
| ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างของกรดไฟติกในการจับโมเลกุลประเภทต่างๆ..... | 10 |
| ภาพที่ 4 ภาพแสดงโครงสร้างไคติน..... | 18 |
| ภาพที่ 5 ภาพแสดงโครงสร้างไคโตซาน..... | 18 |
| ภาพที่ 6 ปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการหมัก..... | 26 |
| ภาพที่ 7 การผลิตเอนไซม์ระดับห้องปฏิบัติการด้วยเชื้อราในสภาวะการเลี้ยงแบบอาหารแข็ง..... | 29 |
| ภาพที่ 8 การผลิตเอนไซม์ระดับอุตสาหกรรมด้วยเชื้อราในสภาวะการเลี้ยงแบบอาหารแข็ง..... | 29 |
| ภาพที่ 9 แผนภูมิแสดงความสามารถในการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS scavenging activity ของรำข้าวหมักด้วยจุลินทรีย์ต่าง ๆ..... | 49 |
| ภาพที่ 10 แผนภูมิแสดงปริมาณฟอสเฟตอิสระของรำข้าวหมักด้วยจุลินทรีย์ต่าง ๆ..... | 50 |
| ภาพที่ 11 แผนภูมิแสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของรำข้าวหมักด้วยจุลินทรีย์ต่าง ๆ..... | 50 |
| ภาพที่ 12 แผนภูมิแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของรำข้าวหมักด้วยจุลินทรีย์ต่าง ๆ..... | 51 |
| ภาพที่ 13 แผนภูมิแสดงปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ของรำข้าวหมักด้วยจุลินทรีย์ต่าง ๆ..... | 51 |
| ภาพที่ 14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและรูปลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา <i>Rhizopus microsporus</i> BG5 (A: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ, B: sporangium)..... | 52 |
| ภาพที่ 15 กราฟสามมิติพื้นที่ผิวตอบสนองต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ..... | 55 |
| ภาพที่ 16 กราฟสามมิติพื้นที่ผิวตอบสนองต่อปริมาณฟอสเฟตอิสระ..... | 55 |
| ภาพที่ 17 แผนภูมิแสดงปริมาณกลูโคซามีนจากเซลล์ของเชื้อรา <i>R. microsporus</i> BG5..... | 59 |
| ภาพที่ 18 แผนภูมิแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการหมักรำข้าวด้วยเชื้อรา <i>R. microsporus</i> BG5..... | 60 |

| | |
|--|----|
| ภาพที่ 19 แผนภูมิแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ได้จากการหมักรำข้าวด้วยเชื้อรา <i>R. microsporus</i> BG5 | 61 |
| ภาพที่ 20 แผนภูมิแสดงกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการหมักรำข้าวด้วยเชื้อรา <i>R. microsporus</i> BG5 | 62 |
| ภาพที่ 21 แผนภูมิแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสที่ได้จากการหมักรำข้าวด้วยเชื้อรา <i>R. microsporus</i> BG5 | 64 |
| ภาพที่ 22 แผนภูมิแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอเรสที่ได้จากการหมักรำข้าว ด้วยเชื้อรา <i>R. microsporus</i> BG5 | 65 |
| ภาพที่ 23 แสดงปริมาณกรดไฟติกของรำข้าวหมักด้วยเชื้อรา <i>R. microsporus</i> BG5..... | 66 |
| ภาพที่ 24 การเจริญของเส้นใยเชื้อราระหว่างการหมักของรำข้าวสลายในการหมักด้วยเชื้อ <i>R. microsporus</i> BG5 ในสภาวะการหมักความชื้นร้อยละ 33.6 อุณหภูมิ 35.9 องศาเซลเซียส และ ปริมาณหัวเชื้อ 6 log สปอร์ต่อกรัมรำข้าว | 67 |
| ภาพที่ 25 ภาชนะที่ใช้ในการหมักรำข้าว และบริเวณห้องที่ใช้ในการหมักรำข้าว | 69 |
| ภาพที่ 26 ลักษณะของรำข้าวหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>R. microsporus</i> BG5 ด้วยการหมักใน ขนาดต่างๆ | 69 |
| ภาพที่ 27 แผนภูมิแสดงความสามารถในการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS scavenging ของรำข้าวหมัก..... | 70 |
| ภาพที่ 28 แผนภูมิแสดงปริมาณฟอสเฟตของรำข้าวหมัก | 70 |
| ภาพที่ 29 แผนภูมิแสดงผลการทดสอบอื่น ๆ ของรำข้าวหมัก | 71 |
| ภาพที่ 30 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในค่า scavenging activity ด้วยวิธี ABTS scavenging ในตัวอย่างรำข้าวหมักที่ ทำแห้งที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน..... | 73 |
| ภาพที่ 31 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตอิสระ (available phosphate) ในตัวอย่างรำข้าวหมักที่ ทำแห้งที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน..... | 73 |
| ภาพที่ 32 ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ละลายได้ (total soluble sugar) ในตัวอย่างรำ ข้าวหมักที่ทำแห้งที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน | 74 |
| ภาพที่ 33 ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ละลายได้ (reducing sugar) ในตัวอย่างรำข้าวหมัก ที่ทำแห้งที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน | 74 |

| | |
|---|----|
| ภาพที่ 34 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (soluble protein) ในตัวอย่างรำข้าวหมักที่ทำ แห่งที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน | 75 |
| ภาพที่ 35 แสดงลักษณะของผงรำข้าวหมักที่ผ่านการอบทำแห้งที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ | 75 |
| ภาพที่ 36 แผนภูมิแสดงผลการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระของรำข้าว หมัก | 78 |
| ภาพที่ 37 แผนภูมิแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตของรำข้าวหมัก | 78 |
| ภาพที่ 38 แผนภูมิแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ละลายได้ของรำข้าวหมัก..... | 79 |
| ภาพที่ 39 แผนภูมิแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ละลายได้ของรำข้าวหมัก..... | 79 |
| ภาพที่ 40 แผนภูมิแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของรำข้าวหมัก | 79 |
| ภาพที่ 41 ภาพแสดงกระจายตัวของขนาดโมเลกุลโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE..... | 83 |
| ภาพที่ 42 แผนภูมิแสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของรำข้าวหมักจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ ต่างๆ | 85 |
| ภาพที่ 43 แผนภูมิแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของรำข้าวหมักจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ ต่างๆ | 86 |
| ภาพที่ 44 แผนภูมิแสดงปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ของรำข้าวหมักจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่ อุณหภูมิต่างๆ | 86 |
| ภาพที่ 45 แผนภูมิแสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของรำข้าวหมักจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่ อุณหภูมิต่างๆ | 87 |
| ภาพที่ 46 แผนภูมิแสดงความสามารถในการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระของรำข้าวหมักจากการเก็บ รักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิต่างๆ | 87 |
| ภาพที่ 47 แผนภูมิแสดงปริมาณฟอสเฟตอิสระของรำข้าวหมักจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ ต่างๆ | 88 |
| ภาพที่ 48 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส โดยวิธี Phenol-sulfuric Method ความเข้มข้น 0 – 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร | 95 |
| ภาพที่ 49 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส โดยวิธี DNS Method ความเข้มข้น 0 – 2500 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร | 95 |

| | |
|--|-----|
| ภาพที่ 50 กราฟมาตรฐาน L-ascorbic acid ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 2 มิลลิโมลาร์..... | 96 |
| ภาพที่ 51 กราฟมาตรฐาน α -tocopherol ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 2 มิลลิโมลาร์ | 96 |
| ภาพที่ 52 กราฟมาตรฐาน β -hydroxy carboxylic acid ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 2 มิลลิโมลาร์ | 97 |
| ภาพที่ 53 กราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin ความเข้มข้น 0 – 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร | 97 |
| ภาพที่ 54 กราฟมาตรฐาน Potassium dihydrogen phosphate ความเข้มข้น 0 – 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร | 98 |
| ภาพที่ 55 ภาพ run gel ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ผ่านการทำ PCR แล้ว..... | 101 |



บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันโรค NCDs หรือ non-communicable diseases เป็นกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรังเป็นปัญหาสุขภาพที่รุนแรงและมีผลกระทบในระยะยาวต่อสังคมและเศรษฐกิจ ซึ่งมีการศึกษาว่ามีผู้เสียชีวิตจากโรค NCD มากถึงร้อยละ 63 ของการเสียชีวิตทั่วโลก และในประเทศไทยมีการเสียชีวิตจากโรค NCD มากถึงร้อยละ 73 ของการเสียชีวิตทั้งหมด การเสียชีวิตที่สูงในกลุ่มนี้เป็นสัญญาณเตือนว่าการดูแลสุขภาพต้องเป็นส่วนสำคัญของการมีชีวิตที่ดี โดยเฉพาะในกลุ่มวัยทำงานเป็นกลุ่มเสี่ยงสำคัญที่มีโอกาสเสียชีวิตหรือเป็นโรค NCD ได้ เนื่องจากพฤติกรรมและสภาพแวดล้อมที่เป็นผลตรงทางหรือทางอ้อมที่มีผลต่อสุขภาพ ทำให้คนกลุ่มนี้เริ่มหาอาหารเสริมที่จำเป็นให้กับร่างกาย อาทิ เช่น อาหารเสริม น้ำมันรำข้าว วิตามินซี และอื่นๆ อีกมากมาย โดยที่ผ่านมามูลค่าทางการตลาดของอาหารเสริมมีอัตราเติบโตเฉลี่ยสะสมต่อปีอยู่ที่ร้อยละ 5.7 โดยมีการคาดการณ์จากวารสาร Nutrition Business Journal ระบุว่าจะมีอัตราการเติบโตเฉลี่ยสะสมเพิ่มขึ้นต่อปีสูงถึงร้อยละ 9

ประเทศไทยเป็นแหล่งเกษตรกรรมสำคัญของโลก และข้าวถือเป็นสินค้าทางการเกษตรที่ถูกส่งออกมากเป็นอันดับต้นๆ ของไทย แต่ก่อนที่จะได้มาซึ่งเมล็ดข้าวเพื่อการบริโภค ต้องมีการขัดและสีเพื่อเอาเยื่อหุ้มเมล็ดออกเสียก่อน ทำให้ได้รำข้าว (rice bran) ซึ่งถือเป็นผลพลอยได้ (by-product) ที่ได้จากกระบวนการดังกล่าว รำข้าวเป็นผลพลอยได้จากการสีข้าว ได้มาจากชั้นนอกของเมล็ดข้าวสีน้ำตาล (แกลบ) ในระหว่างการสี ในส่วนของรำข้าวนั้นอาจจะเป็นผลพลอยได้ที่สำคัญจากการสีข้าวมีลักษณะเป็นสีน้ำตาล โดยทั่วไปแล้วรำข้าวมากกว่าร้อยละ 60 เมตริกตัน/ปี จะถูกกละเลยไม่มีการใช้ประโยชน์ทางด้านอาหารอย่างจริงจังส่วนใหญ่แล้วประมาณร้อยละ 90 ของรำข้าวที่ผลิตได้มักจะถูกใช้เป็นอาหารสัตว์สำหรับโคและสัตว์ปีกในราคาถูกและส่วนที่เหลือจึงถูกนำมาสกัดน้ำมันรำข้าว จากข้อมูลในปี 2023-2024 ราคารำข้าวโดยเฉลี่ยราคาของรำข้าวมักอยู่ในช่วงราว 10-20 บาทต่อกิโลกรัม โดยรำข้าวยังคงประกอบไปด้วยสารอาหารที่ดีต่อสุขภาพ เช่น โปรตีน ร้อยละ 11-13 เส้นใยร้อยละ 11.5 ไขมันร้อยละ 20 และสารที่มีคุณค่าต่างๆ เช่น วิตามิน E (α , β , γ tocopherols) สาร tocotrienols α , β , γ และ δ) และ gamma-oryzanol ซึ่งสารเหล่านี้มีประโยชน์คือ ช่วยต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และลดคอเลสเตอรอล ในร่างกายทำให้ช่วยลดการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ

เช่น โรคกระเพาะ โรคหลอดเลือดหัวใจ เป็นต้น นอกจากนี้รำข้าวยังพบธาตุแมกนีเซียม เหล็ก และ ฟอสฟอรัสในปริมาณสูงด้วย (Gul et al., 2015) รำข้าวจึงเป็นของเหลือทิ้งที่ยังคงคุณค่า อย่างไรก็ตามเราสามารถเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับรำข้าวได้โดยใช้เทคโนโลยีการหมัก (fermentation technology) โดยมีรายงานจากงานวิจัยพบว่ากระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์นี้มีกลไกที่หลากหลายเพื่อช่วยเพิ่มโภชนาการและปริมาณสารออกฤทธิ์ชีวภาพในรำข้าวให้สูงขึ้น อีกทั้งช่วยกำจัดสารก่อโทษบางชนิดในรำข้าวที่เรียกโดยรวมว่า สารต้านโภชนา (antinutritional factors) ให้หมดไป จึงส่งผลให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้มากขึ้น

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาพัฒนากระบวนการผลิตรำข้าวหมักด้วยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้และศึกษาคุณสมบัติบางประการของผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการประยุกต์ใช้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพ จึงเกิดเป็นแผนงานวิจัยนี้ขึ้นที่ประกอบไปด้วยขั้นตอนการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการหมักรำข้าว ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย ยีสต์ และรา จากนั้นผลิตผลิตภัณฑ์ที่ได้จะดูนำมาวิเคราะห์คุณภาพในเชิงโภชนาการ และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพบางประการโดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต่อมาจะได้ทดสอบขยายขนาดการผลิต ทดสอบการทำแห้งและตรวจสอบคุณสมบัติของผงรำข้าวหมักที่ได้เพื่อใช้เป็นข้อมูลและสร้างความมั่นใจให้กับผู้บริโภคและเพื่อต่อยอดนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหาร

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับผลิตรำข้าวหมักที่มีฤทธิ์ชีวภาพสูง
2. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการขยายขนาดการผลิตและการขึ้นรูปผงรำข้าวหมัก
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติเชิงเคมี และชีวภาพของผลิตภัณฑ์รำข้าวหมัก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

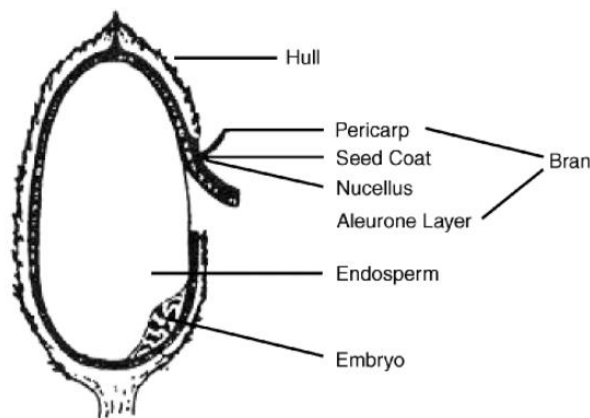
สิ่งที่คาดว่าจะได้จากงานวิจัยนี้ คือ ต้นแบบผลิตภัณฑ์ผงรำข้าวหมักที่อุดมด้วยสารออกฤทธิ์ชีวภาพชนิดบรรจุแคปซูลเหมาะสำหรับผู้บริโภคที่ใส่ใจสุขภาพในปัจจุบัน

บทที่ 2

ทฤษฎีและการตรวจสอบเอกสาร

1. องค์ประกอบของข้าว

ข้าว เป็นคำที่ใช้เรียกเมล็ดข้าว (Rice Grain) ที่ถูกจัดอยู่ในสกุล *Oryza* วงศ์ Gramineae ประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญ คือ ส่วนที่ห่อหุ้มเมล็ด ข้าวที่เรียกว่าแกลบ (Hull หรือ Husk) และส่วนเนื้อผล หรือข้าวกล้อง (Brown Rice) ซึ่งห่อหุ้มด้วยรำข้าว (Rice Bran) (ฉลุย, 2555) ดังภาพที่ 1 ซึ่งข้าวนั้นถือได้ว่าเป็นอาหารหลักที่สำคัญของมนุษย์และเป็นหนึ่งในธัญพืชที่สำคัญที่สุดโดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับชาวเอเชีย ข้าวเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญที่มีคุณสมบัติใช้งานได้หลากหลาย เมล็ดข้าวจำเป็นต้องผ่านกระบวนการหลายขั้นตอนก่อนที่จะนำมาบริโภคเป็นอาหาร การแปรรูปข้าวประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ เช่น การทำความสะอาด การกะเทาะเปลือก และหลังการกะเทาะเปลือก (การฟอกขาว การขัดสี และการคัดเกรด) การแปรรูปข้าวทำให้ได้วัตถุดิบหลายอย่าง เช่น แกลบ ข้าวสี และรำ การสีข้าวเปลือกได้ผลผลิตร้อยละ 70 ของข้าว (เอนโดสเปิร์ม) เป็นผลิตภัณฑ์หลักและผลพลอยได้ประกอบด้วยแกลบร้อยละ 20 รำร้อยละ 8 และงมูกข้าวร้อยละ 2 (Van Hoed et al., 2006)



ภาพที่ 1 แสดงส่วนประกอบของข้าว

ที่มา: (Orthoefier and Eastman, 2005)

องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของเมล็ดทางเคมีคือ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และน้ำหรือความชื้น ซึ่งมีผลต่อคุณภาพของข้าวทั้งในลักษณะข้าวเปลือก ข้าวสาร และข้าวกล้อง โดยมีคาร์โบไฮเดรต ซึ่งมีสตาร์ชเป็นหลักในสัดส่วนต่างๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของข้าวทำให้ข้าวมีลักษณะในการหุงต้ม และคุณภาพในการกินต่างกันไป ตลอดจนมีผลต่อคุณค่าทางอาหาร เนื่องจากเป็นแหล่งสะสมพลังงาน สำหรับโปรตีนในข้าวยังนับว่าเป็นแหล่งอาหารโปรตีนหลัก ซึ่งจะช่วยในการเจริญเติบโตสำหรับผู้บริโภคในประเทศที่บริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก ส่วนไขมันในข้าวจะอยู่ในกลุ่มไขมันที่มีรูปร่างหยดกลม โดยอยู่ร่วมกับเม็ดสตาร์ช และโปรตีนในชั้นแอลิวโรนและคัพพะ จะมีผลเสียในขณะเก็บรักษาเมล็ด รวมทั้งเมล็ดที่แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ และน้ำหรือความชื้นมีผลต่อคุณภาพข้าวในการเก็บรักษา เป็นต้น

2. รำข้าว (rice bran)

รำข้าว (rice bran) คือส่วนของผิวหรือเยื่อหุ้มเนื้อเมล็ดข้าว เป็นส่วนที่ถูกขัดสีออกจากเมล็ดข้าว ซึ่งประกอบด้วย เยื่อหุ้มผล (pericarp) ประกอบด้วย เยื่อหุ้มเมล็ด (tegmen) เยื่อหุ้มอัลลูโรน (aleurone layer) และคัพพะ (embryo) (Sohail et al., 2017) รำข้าวเป็นผลพลอยได้จากการสีข้าวมีลักษณะเป็นสีน้ำตาล รำข้าวนั้นมีราคาถูกและบางครั้งหลังจากสกัดน้ำมันรำข้าวแล้วก็อาจจะถูกทิ้งเป็นของเหลือทิ้ง (Wiboonsirikul et al., 2007) อย่างไรก็ตามส่วนประกอบหรือสารชีวภาพที่สำคัญในรำข้าวนั้นมีมาก เช่น มีส่วนประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระเป็นจำนวนทั้งปริมาณและชนิดที่มาก (Rao et al., 2010) มีส่วนประกอบที่สำคัญ อาทิเช่น โปรตีน วิตามิน เกลือแร่ คาร์โบไฮเดรต พอสโพลิปิด และกรดไขมันที่จำเป็น เป็นต้น (Bandyopadhyay et al., 2008; Saunders, 1990) รำข้าวมีส่วนประกอบของโปรตีนประมาณร้อยละ 10 - 15 ซึ่งโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพดีและมีความสำคัญต่อร่างกาย ดังนั้นรำข้าวจึงเป็นของเหลือทิ้งที่ยังคงมีคุณค่าทางโภชนาการ และเหมาะสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ (Fabian et al., 2010) ดังนั้นรำข้าวสามารถนำไปสู่การพัฒนาอาหารที่มีมูลค่าเพิ่มหรืออาหารที่มีประโยชน์ซึ่งปัจจุบันมีความต้องการสูง รำข้าวจึงถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของอาหารแปรรูป รำข้าวมีเส้นใยอาหารสูงและมีศักยภาพในการรักษาโรค จึงถูกนำไปเสริมปรุงแต่งการเติมในอาหารต่างๆ เช่น ขนมปัง เค้ก บะหมี่ พาสต้า และไอศกรีม โดยทั่วไปแล้วประมาณร้อยละ 90 ของรำข้าวที่ผลิตได้ทั่วโลกมักถูกขายในราคาถูกเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ และส่วนที่เหลือจึงถูกนำมาสกัดเป็นน้ำมันรำข้าว (Gul et al., 2015) รำข้าวมีคุณค่าทางโภชนาการสูงโดยมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบถึงร้อยละ 12-15 และโปรตีนรำข้าวนี้พบว่ามีคุณค่าสูงโดยมีค่า protein efficiency ratio values อยู่ในช่วง 2.0-2.5 ซึ่งใกล้เคียงกับโปรตีนเคซีนที่มีค่าเท่ากับ 2.5 มีค่าการย่อยได้ (digestibility) สูงถึงร้อยละ 90 อีกทั้งถูกจัดว่าเป็น

โปรตีนที่ก่ออาการแพ้ต่ำ (hypoallergenic protein) (Chinma et al., 2014; Zhang et al., 2012) องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติด้านอื่นๆ ของรำข้าว แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของรำข้าว

| องค์ประกอบทางเคมี (ร้อยละ) | Value | คุณสมบัติเชิงหน้าที่ | Value |
|-------------------------------|-----------|------------------------------|-----------|
| โปรตีน | 2.53 | Water binding capacity (WBC) | 8.00 ml/g |
| เถ้า | 19.17 | Oil binding capacity (OBC) | 3.50 ml/g |
| ความชื้น | 1.27 | | |
| ไขมัน | 12 - 18.5 | | |
| เส้นใย | 11.5 | | |

ที่มา: (Gul et al., 2015)

นอกจากองค์ประกอบหลักเหล่านี้แล้ว ยังพบว่ารำข้าวมีสารพฤกษเคมี (phytochemicals) หลายชนิดเป็นองค์ประกอบไม่ว่าจะเป็นวิตามิน E (α , β , γ tocopherols) สาร tocotrienols (α , β , γ และ δ) และ gamma-oryzanol เป็นต้น (Arab et al., 2011) ทำให้รำข้าวมีสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมากมาย โดยสารพฤกษเคมีแต่ละชนิดยังมีประโยชน์ที่เฉพาะเจาะจงยกตัวอย่าง เช่น สาร oryzanol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ยับยั้งการเจริญของเนื้องอก ส่งเสริมสมดุลของระบบประสาท และช่วยบรรเทาอาการวัยทอง เป็นต้น δ -tocotrienol ช่วยควบคุม การใช้น้ำตาลในร่างกาย และระดับอินซูลินในร่างกาย เป็นต้น รายชื่อสารออกฤทธิ์ชีวภาพ ที่พบได้ในรำข้าวแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรำข้าว

| Anthocyanins and flavonoids | Polymeric carbohydrates | Phenolic and cinnamic acids | Steroidal compounds |
|---|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| Anthocyanin monomer, dimmers and polymers | Arabinoxylans | Caffeic acid | Acetylated stearyl glucosides |
| Apigenin | Glucans | Coumaric acid | Cycloartenol ferulate |
| Cyaniding glucoside | Hemicellulose | Catechins | Campesterol ferulat |
| Cyanidin rutinoside | | Ferulic acid | 24-methylenecycloartenol ferulate |
| Epicatechins | | Gallic acid | γ -oryzanol |
| Eriodtyol | | Hydroxybenzoic acid | β -sitosterol ferulate |
| Hermnetins | | Methoxycinnamic acid | Tocopherols |
| isohamnetins | | Sinapic acid | tocotrienol |
| Luteolin | | Syringic acid | |
| Peonidin glucoside | | Vanillic acid | |
| Tricin | | | |

ที่มา: (Gul et al., 2015)

อย่างไรก็ตามรำข้าวมีสารต้านโภชนะเป็นองค์ประกอบด้วย ซึ่งส่งผลเสียต่อร่างกาย เช่น กรดไฟติกโดยกรดไฟติกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติที่พบในธัญพืช ผัก ถั่ว และรำข้าว ซึ่งกรดไฟติกสามารถจับโมเลกุลของแบง์โปรตีนและแร่ธาตุหลายชนิด เช่น แคลเซียมและธาตุเหล็ก ดังนั้นจะทำให้ระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ไม่สามารถดูดซับและใช้สารอาหารเหล่านี้ได้ (Arab et al., 2011)

3. ประโยชน์ของรำข้าว

รำข้าวมีใยอาหารสูงและมีปริมาณไขมันอิ่มตัวต่ำ จึงมีผู้นำไปใช้ในอาหารเพื่อสุขภาพเหมาะสำหรับผู้ที่แพ้แลคโตสหรือพืชชนิดอื่น และมีงานวิจัยที่พบว่าผู้ที่บริโภครำข้าวเป็นประจำ ลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจและมะเร็งลำไส้ใหญ่ (อรอนงค์, 2547) และยังมีสารป้องกันการเกิดออกซิเดชันหลายชนิด ได้แก่ วิตามิน E (tocotrienols และ tocopherols) และ oryzanol ซึ่งสารประกอบทั้งสามชนิดนี้จะลดการเกิด Oxidized LDL ลดการเกิดการแข็งตัวของหลอดเลือด และลดการเกิดคอเลสเตอรอล

tocotrienols และ oryzanol ในรำข้าวมีผลในการลดระดับคอเรสเตอรอล โดยตรง เนื่องจาก tocotrienols เป็นสารที่ขัดขวางการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในร่างกาย ส่วน oryzanol เป็นสารที่ลดการดูดซึมของคอเรสเตอรอลจากอาหาร ซึ่งมีการตรวจอูจาาระของกลุ่มคนที่ได้รับ oryzanol พบว่ามี คอเรสเตอรอลปะปนอยู่มากกว่ากลุ่มคนที่ไม่ได้รับ oryzanol นอกจากนี้ในรำข้าวมีสารประกอบกลุ่ม ไฟโตสเตียรอล ที่สามารถลดการดูดซึมของคอเลสเตอรอลได้ (นัยนา, 2558)

การนำรำข้าวมาใช้เป็นแหล่งใยอาหาร โดยใยอาหารสามารถแบ่งตามการละลายน้ำได้ 2 ประเภทคือ ใยอาหารที่ละลายน้ำ และใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ ใยอาหารที่ละลายน้ำไม่ได้ (insoluble dietary fiber) ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และแวกซ์ อาหารที่มีใยอาหารจำพวกนี้ ได้แก่ รำข้าว ผลิตภัณฑ์จากเมล็ดข้าวทั้งหมด ผัก และใยอาหารประเภทนี้ทำให้การขับถ่ายดีขึ้น ช่วยเพิ่มปริมาณอูจาาระ และเพิ่มครั้งในการอูจาาระ ลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นการเคลื่อนไหวของลำไส้ ทำให้ลำไส้ทำงานได้ดีขึ้น ส่งเสริมการย่อยและการดูดซึมของอาหารที่จำเป็นต่อร่างกาย ลดอาการท้องผูก ช่วยลดการระคายเคืองของผนังลำไส้ที่เป็นสาเหตุของการเกิดอาการท้องร่วง

ใยอาหารที่ละลายน้ำได้ (Soluble dietary fiber) เช่น เพกติน และเฮมิเซลลูโลสบางตัว ด้วยคุณสมบัติที่สามารถรวมตัวกับน้ำได้ในปริมาณมาก ทำให้เกิดการกระจายตัวของโครงสร้างที่อัดแน่น และสามารถแลกเปลี่ยนประจุ โดยจับกับไอออนของโลหะบางตัวหรือโมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้าได้ นอกจากนี้ ใยอาหารประเภทนี้มีผลให้อาหารผ่านกระบวนกรย่อยช้าลง ซึ่งเชื่อกันว่าผลดังกล่าวช่วยลดคอเลสเตอรอลในเลือด ลดน้ำตาลในเลือด และกำจัดโลหะบางชนิดได้ (นัยนา, 2558)

4. ไฟเตท (Phytate) และแหล่งที่พบไฟเตท

ไฟเตทคือเกลือของกรดไฟติก (phytic acid) หรือกรดเฮกซาอินซาทอลฟอสฟอริ (Hexainositol phosphoric acid) มีชื่อทางเคมีว่า inositol-1, 2, 3, 4, 5, 6-hexadihydrogen-phosphate หรือ myo-inositol hexadihydrogen phosphate ซึ่งมีสูตรทางเคมีคือ $C_6H_{24}O_{27}P_6$ (Soman et al., 2020) และมีสูตรโครงสร้างดังภาพ 2 โดยกรดไฟติกสามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ที่มีความสามารถสูงในการจับกับสังกะสีและธาตุเหล็ก กรดไฟติกจึงถือได้ว่าเป็นตัวขัดขวางภาวะทางโภชนาการ โดยทำให้การดูดซึมและการใช้ประโยชน์จากธาตุอาหารของร่างกายลดลง เนื่องจากกรดไฟติกเป็นสารประกอบฟอสฟอรัสที่พบมากในเมล็ดพืชที่เจริญเต็มที่แล้ว โดยโครงสร้างของกรดไฟติก (ดังภาพที่ 3) นั้นจะประกอบไปด้วย inositol ที่มีหมู่ฟอสเฟตเกาะอยู่ 6 หมู่ โมเลกุลจึงสามารถจับกับธาตุที่มีประจุบวกและโปรตีนได้ และอยู่ในรูปของเกลือเรียกว่าไฟเตทหรือไฟติน (phytin) ซึ่งจะอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนโมเลกุลใหญ่ จึงเป็น chelator ที่แรงมาก ยิ่งหากมีการจับกับธาตุโลหะหนักที่มีวาเลนซ์ 2 หรือ 3 จะได้เกลือของไฟเตทที่ไม่ละลายน้ำ และถ้าหากรับประทานเข้าไปร่างกายจะไม่สามารถย่อยไฟเตทได้และทำให้ไม่สามารถดูดซึมไปใช้ได้ ดังนั้นธาตุโลหะที่อยู่ในรูปของเกลือไฟเตทจึงนำมาใช้ไม่ได้ เช่น Zinc-phytate, Zinc-calcium phytate, Iron-phytate เป็นต้น จึงมีผลกระทบต่อ การดูดซึมและการนำไปใช้ของสารเหล่านี้ได้ (พนารัตน์, 2542)

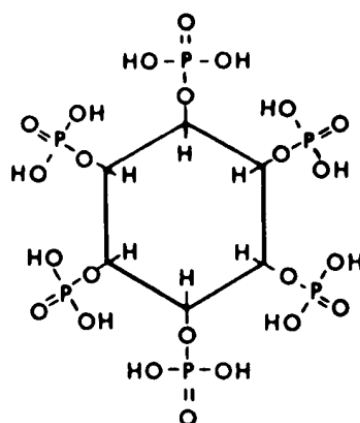
แหล่งของอาหารที่สามารถพบไฟเตทได้มากคือ ในพืชผักซึ่งสามารถแบ่งของแหล่งที่จะพบได้เป็น 3 ระดับ คือ (นัยนา, 2533)

- พืชที่มีไฟเตทสูง ได้แก่ พืชที่ให้น้ำมัน เช่น งา ข้าว พืชตระกูลถั่วต่างๆ กลุ่มพืชที่กินใบอ่อน เช่น ยอดผักตบชวา ยอดผักหวาน ยอดใบแค เป็นต้น
- พืชที่มีไฟเตทปานกลาง ได้แก่ ธัญพืช พืชที่กินดอกหรือผล เช่น มันฝรั่ง มะระ มะละกอดิบ บร็อกโคลี เป็นต้น
- พืชที่ไฟเตทต่ำ ได้แก่ แครอท หัวผักกาด หัวหอม เห็ด ผักขม ผักบุ้งแดง ตำลึง ผักกาดหอม ใบตั้งโอ้ หน่อไม้ฝรั่ง เป็นต้น

ปริมาณของไฟเตทนั้นจะขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆอีกด้วย เช่น สภาพของดิน ว่ามีการใส่ปุ๋ยฟอสเฟตลงไปมากน้อยเพียงใด ซึ่งปุ๋ยฟอสเฟตที่เกษตรกรใส่ในนั้นมีจุดประสงค์เพื่อต้องการเพิ่มผลผลิตของพืช หากแต่กลับส่งผลทำให้มีปริมาณไฟเตทสะสมในพืชสูง

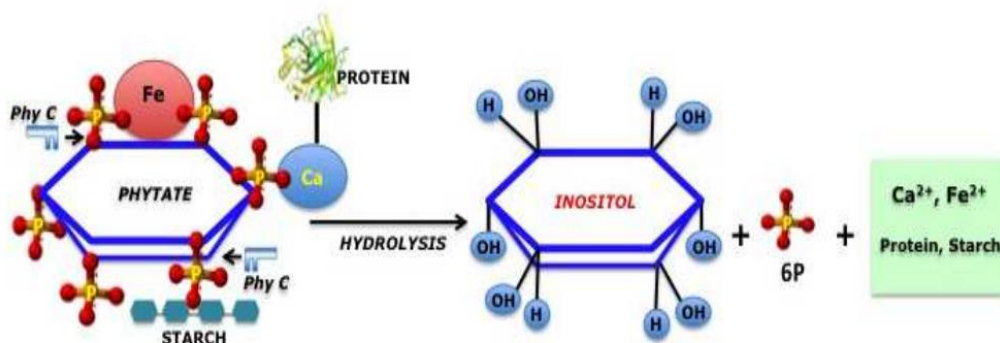
5. ไฟเตทกับภาวะโภชนาการ

เนื่องจากไฟเตท มีคุณสมบัติในการจับกับสารประจุบวกเช่น เหล็ก แคลเซียมสังกะสี ได้ดี ดังนั้น การได้รับไฟเตทในปริมาณมากจะส่งผลกระทบต่อ การดูดซึมและการนำไปใช้ของสารอาหาร จำพวกแร่ธาตุในร่างกายของคน (Siah et al., 2014) อย่างไรก็ตามในการทำลายไฟเตทนั้นค่อนข้าง เป็นไปได้ยาก แม้แต่ความร้อนที่ใช้ในการหุงต้มในครัวเรือน ทำให้ไฟเตทสูญเสียไปเพียงเล็กน้อย โดย ไฟเตทส่งผลกระทบต่อ การดูดซึมของแร่ธาตุต่างๆ ดังนี้ (นัยนา, 2533) แร่ธาตุเหล็ก โดยไฟเตทมีผล ต่อการลดการดูดซึมของแร่ธาตุเหล็กให้ลดลงถึง 10 เท่า ทำให้ร่างกายเกิดภาวะพร่องเหล็กซึ่งจะทำให้ ร่างกายปรากฏอาการซีด การเรียนรู้ช้ากว่าปกติ อ่อนเพลียง่าย เฉื่อยชา ความทนทานต่อการทำงาน น้อยลง แร่ธาตุแคลเซียม ในปัจจุบันพบว่า การขาดแคลเซียมนั้นเป็นปัญหาหนึ่งของคนไทย เนื่องจากการบริโภคแคลเซียมของคน ไทยมีค่าเฉลี่ยเพียง 456 มิลลิกรัมต่อวัน กล่าวได้ว่าได้รับเพียงครึ่งหนึ่ง ของความต้องการของร่างกาย โดยเมื่อปริมาณที่ได้รับต่ำอยู่แล้วและยังได้รับสารที่สามารถลดการดูด ซึมแคลเซียม จึงส่งผลให้เกิดภาวะขาดแคลเซียมได้มากขึ้น นอกจากไฟเตทจะลดการดูดซึมแคลเซียม ได้แล้ว ถ้าได้รับไฟเตทมากๆ อาจทำให้แคลเซียมละลายออกมาจากกระดูกได้ โดยการประมาณพบว่า ไฟเตท 80 มิลลิกรัม สามารถจับกับแคลเซียมได้มากหากมีแคลเซียมน้อยกว่า 229 มิลลิกรัม และทำ ให้แคลเซียมละลายออกจากกระดูก จนเกิดโรคกระดูกพรุนได้ในที่สุด นอกจากตัวอย่างของแร่ธาตุที่ ยกมากล่าวนี้แล้ว ไฟเตทยังมีผลต่อแร่ธาตุตัวอื่นด้วย เช่น แมกนีเซียมทองแดง และสังกะสี เป็นต้น นอกจากนี้ไฟเตทยังมีผลต่อคุณภาพของโปรตีนในอาหารอีกด้วย โดยจะไปรวมตัวเป็นเกลือเชิงซ้อน ของกรดไฟติกและโปรตีน (protein phytate complex) ซึ่งพบในอาหารประเภทถั่วและเกลือ เชิงซ้อนนี้มีโปรตีนอยู่ร้อยละ 18.6 ของน้ำหนัก ซึ่งร่างกายไม่สามารถนำโปรตีนในส่วนนี้ไปใช้ ประโยชน์ได้ (นัยนา และคณะ, 2533)



ภาพที่ 2 สูตรโครงสร้างไฟเตท (Phytate)

ที่มา: (Orthoefer and Eastman, 2005)



ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างของกรดไฟติกในการจับโมเลกุลประเภทต่างๆ
ที่มา: (Orthofer and Eastman, 2005)

6. การกำจัดไฟเตท

ไฟเตทมีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ พบในพืช จุลินทรีย์ และสัตว์ และพบครั้งแรกในรำข้าวในปี 1907 โดย Suzuki และคณะ (Mullaney et al., 2007) โดยโมเลกุลของกรดไฟติกมีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อนๆ จึงจับตัวกับโพแทสเซียม ไอออน แมกนีเซียมไอออน แคลเซียมไอออน แมงกานีสไอออน สังกะสีไอออน และเหล็กไอออนได้ดี ส่งผลให้กรดชนิดนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการดูดซึมของแร่ธาตุเหล่านี้ ในร่างกายของคนเราและสัตว์ที่มีกระเพาะเดียว ไม่สามารถย่อยสลายกรดไฟติกได้ เพราะไม่มีเอนไซม์ที่ไฟเตทในทางเดินอาหาร ขณะที่เกลือไฟเตทในลำไส้ คนก็ย่อยสลายกรดไฟติกไม่ได้เช่นกัน ดังนั้น ร่างกายจึงไม่สามารถดูดซึมกรดไฟติก และแร่ธาตุที่ถูกกรดไฟติกจับไว้ได้ ดังนั้นในรายงานวิธีของ Kumar et al. (2021) พบว่าสามารถลดกรดไฟติกในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหาร โดยผ่านการใช้ความร้อน การแช่น้ำ การเพาะงอก และการหมัก

1. การแช่

การแช่เมล็ดธัญพืชและถั่วสามารถลดกรดไฟติกและสารต้านสารอาหารอื่นๆ กระบวนการแช่ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในกระบวนการงอกและการหมักของธัญพืช ธัญพืชและเมล็ดพืชจะต้องแช่อย่างน้อย 15–20 นาที หรือข้ามคืน ขึ้นอยู่กับขั้นตอนในการวิเคราะห์ โดยการแช่น้ำช่วยเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุและการย่อยสลายกรดไฟติกได้สองทาง ประการแรก เนื่องจากไฟเตทสามารถละลายน้ำได้ ดังนั้นไฟเตทจำนวนมากจึงสามารถชะออกได้โดยการแช่ ประการที่สองสภาวะที่เหมาะสมของน้ำที่ใช้แช่เพิ่มการทำงานของไฟเตท โดยอุณหภูมิอยู่ในช่วง 45–65 องศาเซลเซียส และ pH 5.0–6.0 จากรายงาน Lestienne et al. (2005) พบว่าลูกเต๋อที่ผ่านการแช่สามารถเพิ่มการดูดซึม Fe และ Zn ซึ่งเป็นผลมาจากกิจกรรมไฟเตสที่เพิ่มขึ้น

2. การงอกและการหมัก

การงอกและการหมักเป็นกระบวนการที่สำคัญในการลดฟอสฟอรัสอิสระของไฟเตทผ่านการใช้ไฟเตท ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ให้สารอินทรีย์ฟอสเฟตในระหว่างการงอกและการเจริญเติบโตของพืชต่างๆ โดยพบว่าในระหว่างการงอกของธัญพืชและพืชตระกูลถั่ว พบว่ากิจกรรมการย่อยสลายไฟเตทเพิ่มขึ้นพร้อมกับการลดลงของปริมาณไฟติก (Greiner et al., 2001) นักวิจัยหลายคนได้รายงานว่าการงอกและการหมักไฟเตทที่แท้จริงในพืชตระกูลถั่วที่ไม่งอกและเมล็ดธัญพืช ยกเว้นข้าวไรย์ ข้าวสาลี ข้าวทริทิเกล และข้าวบาร์เลย์ นอกจากนี้ เมื่อนำมอลต์ธัญพืชแช่และบดภายใต้สภาวะที่เหมาะสม กรดไฟเตทจะถูกลดลงอย่างสมบูรณ์ ยกเว้นในข้าวโอ๊ตซึ่งพบว่าการหมักเอนไซม์ไฟเตสต่ำ

3. การแปรรูปอาหาร

ไฟเตทสามารถทนความร้อนต่อการย่อยสลายจากการปรุงอาหารได้ในระดับหนึ่ง แต่ในทางกลับกัน ไฟเตสจากพืชนั้นทนความร้อนได้ แต่หากสัมผัสกับอุณหภูมิสูงเป็นเวลานานอาจนำไปสู่การเสียดสีและหยุดการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้น เพื่อลดกิจกรรมของไฟเตสดีฟอสฟอไรเซชัน (phytate dephosphorylation) ในระหว่างการปรุงอาหาร จากงานวิจัย Urbano et al. (2000) พบว่าการใช้กระบวนการแช่และปรุงอาหารร่วมกันมีประสิทธิภาพมากกว่าในการลดกรดไฟติก เมื่อเทียบกับการแช่เพียงอย่างเดียว

4. การสีและการแปรรูป

การสีเมล็ดพืชและการนำเอารำออกจะลดช่วยปริมาณไฟติก กระบวนการสีจะช่วยขจัดกรดไฟติกออกจากชั้นนอกของธัญพืช แต่การสียังกำจัดส่วนสำคัญของสารอาหารรองที่จำเป็น เช่น Fe และ Zn และเส้นใยอาหาร ดังนั้น การกำจัดชั้นรำออกจะช่วยส่งเสริมการเสริมการดูดซึมแร่ธาตุและอาจช่วยเพิ่มการดูดซึมสารอาหารในร่างกาย

5. การหมัก

การหมักโดยจุลินทรีย์บางกลุ่มสามารถช่วยลดกรดไฟติกโดยเอนไซม์ไฟเตสที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นทำให้ช่วยย่อยกรดไฟติกได้หมู่ฟอสเฟตอิสระนอกจากนี้กรดบางชนิดที่ผลิตขึ้นระหว่างกระบวนการหมักอาจเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุบางชนิด โดยการหมักด้วยแลคติกแบคทีเรียเป็นวิธีที่นิยมสำหรับการหมักพืชตระกูลถั่ว ธัญพืช ถั่วเหลือง ข้าวโพด และข้าวฟ่าง การหมักแลคติกทำให้แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกและกรดอะซิติก ซึ่งจะทำให้ค่า pH ลดลง ค่า pH ที่เป็นกรดนี้กระตุ้นการทำงานของไฟเตทส่งผลให้ปริมาณไฟเตทลดลง จากงานวิจัยของ Bartnik and Florysiak (1988) พบว่าความเป็นกรดของแป้งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไฟเตทระหว่างการหมักแป้งเปรี้ยว และปริมาณไฟเตทในขนมปังข้าวไรย์และรำข้าวโอ๊ตลดลงร้อยละ 96–97 ซึ่งทำด้วยแป้งข้าวโดว์ร้อยละ 10 (pH 4.6) แสดงให้เห็นว่าการหมักสามารถย่อยสลายไฟเตทได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น

ของสัณฐานวิทยา เทมเป้ มิโซะ และโคจิ ผลิตภัณฑ์ที่มาจากหมักข้าวเหลืองกับเชื้อรา *Aspergillus oryzae* และ *Rhizopus oligosporus* ราทั้งสองแสดงกิจกรรมการย่อยสลายไฟเตตทั้งภายในเซลล์และนอกเซลล์

7. สารอนุมูลอิสระ (free radical)

อนุมูลอิสระคือโมเลกุลหรืออะตอมที่ไม่เสถียรเนื่องจากขาดอิเล็กตรอน ซึ่งโดยปกติในร่างกายของเรามีโมเลกุลหรืออะตอมที่มีอิเล็กตรอนอยู่เป็นจำนวนมาก ในกรณีที่ร่างกายมีการสูญเสียอิเล็กตรอนจากการถูกอนุมูลอิสระแย่งจับ จะทำให้โมเลกุลของเซลล์ในร่างกายไม่เสถียร ขาดความสมดุล ซึ่งส่งผลทำให้เซลล์ร่างกายเสียหายได้ อนุมูลอิสระมาจากแหล่งภายนอก ได้แก่ มลพิษในอากาศ โอโซน ไนโตรออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ ฝุ่น ควันบุหรี่ อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว แสงแดด ความร้อน รังสีแกมมา และแหล่งภายใน ได้แก่อนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้น ตัวอย่างของ อนุมูลอิสระ (รัชนี, 2558) ได้แก่ O_2^- - Superoxide anion, OH^\cdot - Hydroxyl radicle, ROO^\cdot Peroxy radicle, H_2O_2 Hydrogen Peroxide และ Lipid Peroxyl, LO_2

โดยอนุมูลอิสระเข้าไปทำลายเซลล์ เมื่อร่างกายไม่สามารถผลิตหรือได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเพียงพอที่จะไปยับยั้งหรือไปจับอนุมูลอิสระได้ภายในเซลล์ของร่างกาย ผลคือทำให้เซลล์เกิดความเสียหายและนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง หัวใจ และหลอดเลือด แก่ก่อนวัย ต้อกระจก และโรคอื่นๆ เช่น อนุมูลอิสระไปทำลายผนังหลอดเลือดแดง และเมื่อมีไขมันไปสะสมอยู่ในบริเวณหลอดเลือดแดงที่ถูกทำลาย จะทำให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดในที่สุด แต่ถ้าเราได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเพียงพอ สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้าไปป้องกันหรือแย่งจับอนุมูลอิสระ และนำอนุมูลอิสระเหล่านั้นไปทิ้งนอกเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่ถูกทำลาย ร่างกายจึงมีกลไกที่จะกำจัดสารอนุมูลอิสระได้ 2 วิธีคือ

1. การใช้เอนไซม์ที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อจับกับอนุมูลอิสระ เช่นเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) เอนไซม์ catalase glutathione peroxidase แต่ร่างกายมักสร้างไม่เพียงพอ เซลล์จึงเกิดการบาดเจ็บขึ้น และเมื่อคนเรามีอายุมากขึ้น การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระจะลดลง ในขณะที่อัตราการเกิดอนุมูลอิสระยังเท่าเดิม ผลที่ตามมาคือ ทำให้เกิดโรคต่างๆมากมาย

2. การได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากอาหาร เช่นวิตามิน E เบต้าแคโรทีน แอนโทไซยานิน (anthocyanidin) สารประกอบโพลีฟีนอลต่างๆ เช่น แทนนิน แคทชินิน เป็นต้น นอกจากนี้ยังรวมถึง โคเอนไซม์คิวเท็น (Coenzyme Q10) หรือโคคิวเท็น (Co Q10) หรือเป็นที่รู้จักกันในชื่ออื่นๆ เช่น ยูบิควิโนน (Ubiquinone) โดยจัดเป็นสารจำพวกวิตามิน หรือคล้ายวิตามิน และมีอยู่ในทุกเซลล์ของร่างกาย ร่างกายจึงทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ที่จำเป็นตัวหนึ่งในการเริ่มปฏิกิริยาเคมีเพื่อสร้างพลังงาน

ในร่างกาย จึงมีความสำคัญต่อกล้ามเนื้อส่วนต่างๆ โดยเฉพาะกล้ามเนื้อหัวใจ เนื่องจากหัวใจต้องทำงานตลอดเวลา

8. สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) หมายถึง โมเลกุลของสารที่สามารถป้องกันหรือชะลอกระบวนการเกิดออกซิเดชัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนจากสารหนึ่งไปยังสารออกซิไดส์ ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้จะเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ทำให้เกิดกลืนรสผิดปกติในอาหาร เกิดสารที่เป็นอันตรายต่อร่างกายและยังสามารถทำลายคุณค่าทางโภชนาการด้วย นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังสามารถทำลายเซลล์ของร่างกาย สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้าไปยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่เหล่านี้ด้วยการเข้าจับกับอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (ศิริธร, 2557) กลไกของสารต้านอนุมูลอิสระในการยับยั้งอนุมูลอิสระ มีอีกหลายกลไก ได้แก่

- Radical scavenger
- Hydrogen donor
- Electron donor
- Peroxide decomposer
- Singlet oxygen quencher
- Enzyme inhibitor
- Synergist
- Metal-chelating agents

ตารางที่ 3 ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระ

| Endogenous factors | Endogenous enzymes | Nutritional factors in foods | Synthetic antioxidants |
|-----------------------------|----------------------|--|------------------------------------|
| Glutathione and other thiol | GSH reductase | Ascorbic acid (vit.C) | Butylated hydroxyl anisole (BHA) |
| Haem proteins | GSH transferases | Tocopherols (vit. E) | Butylated hydroxyl toluene (BHT) |
| Coenzyme Q | GSH peroxidase | β -carotene and retinoids | Propyl gallate (PG) |
| Bilirubin | Superoxide dismutase | Selenium-essential dietary component of peroxidase | Tertiary butyl hydroquinone (TBHQ) |
| Urates | Catalase | Methionine lipotropes choline biosynthesis | |

รำข้าวเป็นแหล่งที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามิน E, tocopherols, แคลโรทีนอยด์ และ gamma-oryzanol คุณสมบัติที่โดดเด่นของรำข้าว คือมีส่วนประกอบเป็นสารสำคัญ คือ gamma-oryzanol และ tocotrienols ซึ่งพบว่าสามารถช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด และลดอัตราการเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจได้ บทบาทของสาร gamma-oryzanol ในรำข้าว คือลดคอเลสเตอรอลชนิดเลว (LDL) และลดระดับไตรกลีเซอไรด์ โดย gamma-oryzanol จะไปจับกับคอเลสเตอรอลในน้ำดี แล้วเพิ่มการขับน้ำดีเข้าไปในลำไส้จากนั้นก็ป้องกันไม่ให้เกิดการดูดซึมกลับเข้ามาใหม่ มีรายงานว่า gamma-oryzanol ช่วยเพิ่มระดับการสร้างฮอร์โมน เทสโตสเตอโรน (testosterone) ในผู้ชาย และช่วยกระตุ้นสมองให้หลั่งเอนโดฟิน (endorphine) ซึ่งเป็นสารแห่งความสุขเพิ่มขึ้นด้วย มีหลายการศึกษาวิจัยพบว่า gamma-oryzanol ช่วยเพิ่มระดับคอเลสเตอรอลชนิดดี (HDL) และช่วยลดอัตราเสี่ยงของโรคที่เกิดจากหลอดเลือดแข็งตัว (ทิพย์ธิดา, 2556)

9. กลไกปฏิกิริยาออกซิเดชัน

ออกซิเดชันเป็นปฏิกิริยาทางเคมี ของออกซิเจนกับกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวในโมเลกุลของไขมัน ทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพ โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเป็นไปอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่และอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และมีกลไกการเกิดเป็น 3 ขั้นตอนได้แก่ initiation หมายถึงขั้นตอนเริ่มต้นของปฏิกิริยา propagation หมายถึงอนุมูลอิสระจะถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลตัวอื่นโดยปฏิกิริยา free-radical chain reaction และ termination หมายถึงขั้นตอนสุดท้ายในการรวมตัวกันของ 2 อนุมูลอิสระ จนเกิดเป็นสารประกอบชนิดใหม่ที่มีความเสถียรและไม่เป็นอนุมูลอิสระ (non-radical production) (นิธิยา, 2541)

10. ความสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันทั้งในระบบของอาหาร (Food system) และร่างกายมนุษย์ (human body) ในระบบของอาหารนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจะช่วยชะลอการเกิดออกซิเดชันของไขมันในอาหารและลดหรือกำจัดอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในชั้นหุติยภูมิ ซึ่งจะช่วยรักษาคุณภาพของอาหารด้านต่างๆ เช่น กลิ่นรส เนื้อสัมผัส คุณค่าทางโภชนาการ และสีของอาหารในระหว่างการแปรรูปและการเก็บรักษา นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระยังช่วยลดการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนและอันตรกิริยา (interaction) คาร์บอนิลของอนุพันธ์ลิพิดกับโปรตีน สำหรับในร่างกายมนุษย์นั้นสารต้านอนุมูลอิสระจะทำหน้าที่ป้องกันความเสียหายของเซลล์ต่างๆ จากการเกิดออกซิเดชันโดยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคต่างๆ และความแก่ชรา (ศิริธร, 2557)

11. สารต้านอนุมูลอิสระจากธัญพืช

ธัญพืช หมายถึง พืชตระกูลหญ้าที่เราใช้เมล็ดเป็นอาหาร ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวซึ่งเป็นพืชวงศ์หญ้า (Family Gramineae) ประเภทใบเลี้ยงเดี่ยวที่ปลูกได้ทั่วไปในพื้นที่ทั่วโลกมีหลายชนิด ธัญพืชชนิดที่สำคัญ ได้แก่ ข้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวโอ๊ต ข้าวไรย์ และข้าวบาร์เลย์ ถึงแม้ว่าธัญพืชไม่จัดว่าเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญมากนักเมื่อเทียบกับผักและผลไม้ แต่เนื่องจากธัญพืชเป็นอาหารหลักของประชากรโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ข้าว (rice) ข้าวบาร์เลย์ (barley) ข้าวสาลี (wheat) ข้าวโพด (corn) ข้าวโอ๊ต (oat) และมิลเล็ท (millet) นอกจากนี้ธัญพืชเหล่านี้ยังจัดเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญที่สุดของอาหารที่คนบริโภคในแต่ละวันจึงทำให้นักวิจัยและนักโภชนาการให้ความสนใจในการศึกษาชนิดและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในธัญพืชเพื่อประโยชน์ในเชิงสุขภาพมากขึ้น เช่น มีการใช้บีตา-กลูแคน (β -glucan) จากข้าวบาร์เลย์ และข้าวโอ๊ต เพื่อประโยชน์ในการป้องกันโรคหัวใจ เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธัญพืชทั่วไปแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธัญพืช

| ชนิดของธัญพืช | วิตามินอี ^a | ซีลีเนียม ^b | พอลิฟีนอล ^c | กรดเฟอรูลิก ^d | แคโรทีนอยด์ ^e |
|---------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| ข้าวสาลี | 1.4 | 0.5-74.6 | 70-1459 | 10- 198 | 20- 265 |
| ข้าวโพด | 6.6 | 12.0 | 39-711 | 177 | 969-1300 |
| ข้าว | 1.9 | 10.0 | 54-313 | 30 | 14-77 |
| ข้าวโอ๊ต | 1.8 | 7.1 | 9-34 | 7-30 | 31 |
| ข้าวบาร์เลย์ | 2.2 | 7.0 | 50-196 | 36-62 | 15-105 |
| ข้าวไรย์ | 4.1 | 1.4 | 125-255 | 79-102 | - |
| ข้าวฟ่าง | 1.1 | 13.0 | 100-2300 | 9 | 20-22 |
| มิลเลต | 4.1 | 2.0 | 29-47 | 29 | 74-80 |

ที่มา: (ศิริธร, 2557)

หมายเหตุ : ^{a,e} แสดงในหน่วย มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

^{b,d} แสดงในหน่วย ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม

^c แสดงในหน่วย มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม

ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะข้าวซึ่งเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและมีการนำมาใช้เป็นแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระ โดยข้าวถือเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของโลก โดยเฉพาะในเอเชีย ซึ่งเป็นอีกแหล่งที่สำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด โดยสารต้านอนุมูลอิสระสำคัญที่พบในข้าวทั่วไป เช่น วิตามินและออริซานอล (oryzanol) รำข้าวเป็นส่วนที่พบสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยน้ำมันที่สกัดได้จากรำข้าวพบออริซานอลในปริมาณสูงถึง 2,847 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และวิตามินอี 608 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งประกอบด้วยโทโคฟีรอล 343 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และโทโคไตรอีนอล 265 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยจากงานวิจัย ของ Butsat et al. (2010) พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดในข้าว ซึ่งปริมาณในส่วนต่าง ๆ ของข้าว เช่นเปลือก รำและส่วนของข้าวขาว จะมีปริมาณแตกต่างกันโดยกรดฟีนอลิกพบมากในแกลบ ส่วนแกมมา-ออริซานอลและโทโคฟีรอล พบมากในส่วน ของรำ แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ปริมาณของแกมมาออริซานอลและโทโคฟีรอลที่พบส่วนต่าง ๆ ของข้าว

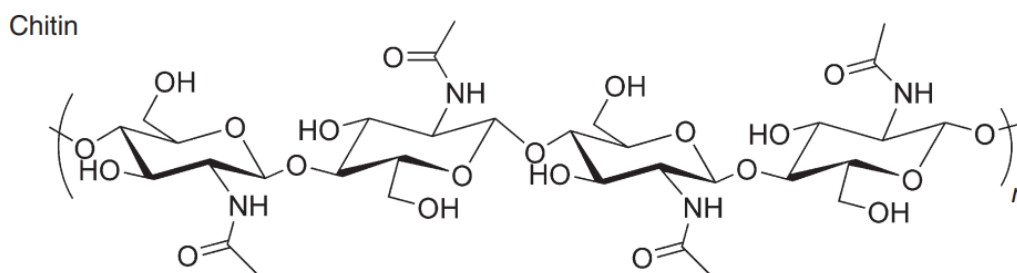
| สารต้านอนุมูลอิสระ (มิลลิกรัมต่อกรัม) | ส่วนต่างๆ ของข้าว | | |
|--|-------------------|------|---------|
| | เปลือก | รำ | ข้าวขาว |
| แกมมา-ออริซานอล | 0.1 | 3.4 | 0.2 |
| แอลฟา-โทโคฟีรอล | nd | 69.2 | 5.4 |
| แกมมา-โทโคฟีรอล | nd | 1.5 | nd |
| เดลตา-โทโคฟีรอล | nd | nd | nd |

หมายเหตุ : nd หมายถึง ไม่พบ

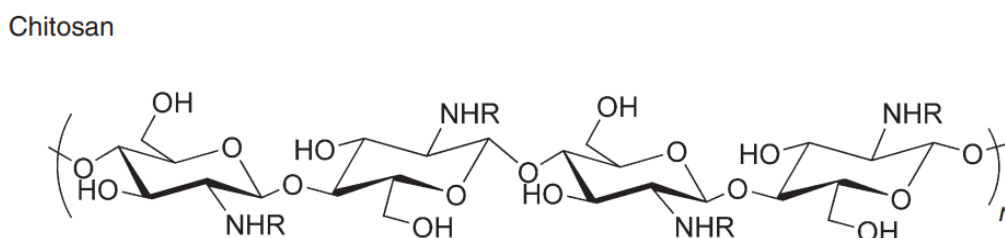
ที่มา: (ศิริธร, 2557)

12. กลูโคซามีน

กลูโคซามีนเป็นสารที่มีอยู่ในผนังเซลล์ซึ่งแสดงถึงการเจริญเติบโตของเชื้อรา เนื่องจากผนังเซลล์ของราประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์หลายชนิด เช่น เซลลูโลส ไคติน กลูแคน ไกลโคโปรตีน และโพลียูไรนด์ เชื้อราทั้งหมดมีไคตินเฉพาะในผนังเซลล์ ยกเว้น *Ocmycetes* ซึ่งมีไคตินจับกับกลูแคนในเมมไดไฮโดพลาสซึม ไคตินเป็นสารโพลิเมอร์ชีวภาพ (Biopolymer) (ดังภาพที่ 16) ซึ่งไคตินเป็นสารคาร์โบไฮเดรตเช่นเดียวกับแป้งและเซลลูโลส โครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเล็ก ๆ ที่เรียกว่า N-Acetylglucosamine ต่อกันเป็นสายยาว เกิดเป็นโครงสร้างที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ในกรดอินทรีย์ เช่น กรดเกลือ กรดกำมะถัน กรดฟอสฟอริก และกรดฟอร์มิกที่ปราศจากน้ำ โดยในผนังเซลล์ของ ร่ายีสต์ และจุลินทรีย์ ไคตินจะอยู่ร่วมกับสารอินทรีย์อื่น ๆ ไคโตซานนี้เป็นอนุพันธ์ของไคติน ที่ได้จากการดึงเอาหมู่อะซิทธิล (Acetyl Group) ของไคตินออกไปโดยปฏิกิริยาที่เรียกว่า Deacetylation ทำให้โครงสร้างของไคตินที่เป็น N-Acetyl Glucosamine กลายเป็น Glucosamine ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ Active พร้อมจะทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วและมีสมบัติละลายได้ในกรดอ่อน ดังภาพประกอบ 17 (Song et al., 2012)



ภาพที่ 4 ภาพแสดงโครงสร้างไคติน



ภาพที่ 5 ภาพแสดงโครงสร้างไคโตซาน

13. หลักการกระบวนการหมัก

ความหมายของการหมัก

การหมัก (fermentation) มาจากภาษาละตินว่า "fervere" หมายถึง การเดือด ที่เกิดจากมีฟองก๊าซผุดขึ้นมาหน้าอาหารในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์ทำให้มองดูเหมือนการเดือด บทนิยามของคำว่าหมักนี้ยังรวมไปถึงปฏิกิริยาออกซิเดชัน - รีดักชัน (oxidation reduction) ที่เกิดขึ้นในระหว่างการใช้สารประกอบอินทรีย์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักขึ้นและสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (medium) ผลิตภัณฑ์ที่ได้หลายชนิดมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ของน้ำตาลบางชนิดสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคทั้งคนและสัตว์ ได้แก่ บางชนิดสามารถสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ในการสร้างสารต่างๆให้ได้ปริมาณมากนั้น สารใช้เป็นสารตั้งต้น (precursor) ในการผลิตผลิตภัณฑ์อื่นๆ ใช้เป็นตัวทำละลาย (solvent) หรือใช้ประโยชน์เพื่อเป็นวัตถุดิบและ การเปลี่ยนวัตถุดิบไปเป็นผลิตภัณฑ์ตัวใหม่โดยจุลินทรีย์สามารถเขียนเป็นปฏิกิริยาทั่วไปได้ (จารุวรรณ, 2551) ดังนี้

| | | | |
|--------------------------|---|------------------|---------------|
| วัตถุดิบ/สับสเตรท | + | จุลินทรีย์ | ผลิตภัณฑ์ใหม่ |
| (raw material/substrate) | | (microorganisms) | new products) |

การที่จุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนวัตถุดิบที่มีราคาถูกไปเป็นสารใหม่ที่มีประโยชน์และมีราคาแพง ปฏิบัติการเช่นนี้สามารถนำมาขยายขนาดในทางอุตสาหกรรมได้ ซึ่งกระบวนการหมักทางอุตสาหกรรม เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจจะต้องขึ้นอยู่กับปัจจัยต่อไปนี้

1. จุลินทรีย์ ที่ใช้ในกระบวนการหมักทางอุตสาหกรรมจะต้องมีคุณสมบัติที่คงที่ไม่เปลี่ยนแปลง สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว ไม่เป็นเชื้อโรคและสามารถให้ผลผลิตที่มากพอในปัจจุบัน ได้มีการนำเอาเทคโนโลยีทางด้านพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) มาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

2. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ ๆ จะต้องมียาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตที่ได้ และ จะต้องมียูในปริมาณมาก หาได้ง่าย เช่น วัสดุเหลือทิ้งหรือของเสียที่มีคุณค่าทางอาหาร ตัวอย่างเช่น หางนม (whey) จากโรงงานอุตสาหกรรมนม น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตกระดาษหรือของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอื่น ๆ

3. ผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักทางอุตสาหกรรม จะต้องอาศัยถังหมักที่มีขนาดใหญ่ความจุมาก เช่น 50,000 แกลลอน เพื่อบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อและจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบออลซีมของจุลินทรีย์ต้องนำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าราคาแพงต่อไป

เทคโนโลยีการหมักจึงเป็นกระบวนการหมักที่เกี่ยวข้องกับการใช้เซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น เซลล์จุลินทรีย์ เซลล์พืช และเซลล์สัตว์ หรือการใช้ส่วนประกอบที่มาจากเซลล์ ได้แก่ เอนไซม์ในการเปลี่ยนแปลงสารประกอบอินทรีย์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสารประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตเหล่านี้จะแตกต่างจากการเปลี่ยนแปลงด้วยกรรมวิธีทางเคมี ดังนี้

ข้อดีของกระบวนการหมักเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการทางเคมี คือ

1. สามารถสังเคราะห์อินทรีย์สารที่มีโมเลกุลซับซ้อน เช่น โปรตีน และยาปฏิชีวนะ ซึ่งไม่สามารถสังเคราะห์โดยวิธีทางเคมีได้
2. การเปลี่ยนสารประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตจะให้ผลผลิตที่สูง
3. กระบวนการหมักเกิดขึ้นที่อุณหภูมิต่ำ และ pH เป็นกลาง
4. ตัวเร่งปฏิกิริยามีความจำเพาะเจาะจงกว่ากระบวนการทางเคมี
5. สามารถผลิตสารประกอบที่เหมือนกันได้ดี

ข้อเสียของกระบวนการหมักเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการทางเคมี คือ

1. กระบวนการผลิต โดยใช้สิ่งมีชีวิตอาจมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ไม่ต้องการ
2. ผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้จะปนมากับผลิตภัณฑ์อื่นๆซึ่งต้องนำมาแยกออก
3. จะต้องจัดหาบริเวณรองรับน้ำทิ้งปริมาณมากที่ออกมาจากกระบวนการหมัก
4. กระบวนการหมักจะเป็นไปก่อนข้างช้าเมื่อเทียบกับกระบวนการทางเคมี

14. ความเป็นมาของเทคโนโลยีอาหารหมัก

เทคโนโลยีอาหารหมัก (fermented food technology) เป็นการพัฒนาทางอาหารเพื่อสนองต่อการบริโภคและเก็บรักษาประวัติการพัฒนาเทคโนโลยีการหมักของแต่ละประเทศแตกต่างกัน ทำให้เห็นว่าในแถบเอเชียมีการพัฒนาการหมักจากความรู้พื้นฐานภูมิปัญญาคนท้องถิ่นคิดกันประดิษฐ์สิ่งของเครื่องใช้หรืออาหารบริโภคต่างๆ จากธรรมชาติในถิ่นที่อยู่ของตนให้เกิดประโยชน์คุ้มค่าที่สุด เช่น การผลิตอาหารด้วยกรรมวิธีเฉพาะเพื่อให้ได้รสชาติและกลิ่นรสตามต้องการซึ่งการมีพฤติกรรมการบริโภคที่แตกต่างกัน เป็นสาเหตุหนึ่งทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารหมักแต่ละประเทศแตกต่างกัน ได้แก่ ประเทศแถบตะวันตกมีพฤติกรรมการบริโภคเนื้อสัตว์ โดยใช้วัตถุดิบเสียเพื่อยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาในอาหารจำพวกไส้กรอก ชีส รวมทั้งนมหมัก ในขณะที่ประเทศแถบตะวันออกส่วนใหญ่บริโภคธัญพืช และมีความต้องการรสชาติของเนื้อสัตว์รวมอยู่ด้วยรวมทั้งเพื่อเพิ่มความน่ารับประทาน ทำให้คนแถบเอเชียได้คิดพัฒนาซอสถั่วเหลือง และน้ำปลาเป็นเครื่องปรุงรสอาหารสนองรสชาติของผู้บริโภคให้ดียิ่งขึ้น จุลินทรีย์เป็นปัจจัยสำคัญในกระบวนการผลิตอาหารหมัก (fermented foods) และมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ได้แก่ อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะมีกิจกรรมร่วมอยู่ในกระบวนการหมักและย่อยสลายโพลีแซคคาไรด์ โปรตีน และไขมัน ก่อให้เกิดกลิ่นรสและลักษณะเนื้อสัมผัสตรงตามความต้องการของผู้บริโภค อีกทั้งอาหารที่ได้จากการหมักจะต้องไม่มีพิษและการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรค โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักสามารถจำแนกได้เป็น 5 ประเภท (จารุวรรณ, 2551) คือ

1. ผลิตภัณฑ์ทางเคมี ได้แก่ เอทานอล อะซิโตน บิวทานอล กรดอินทรีย์ (กรดซิตริก และกรดอะซิติก) เอนไซม์ และพอลิเมอร์ เป็นต้น
2. ผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรม ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ เอนไซม์ มอนอโคลนัล แอนติบอดี สารยับยั้งเอนไซม์ สเตอรอยด์ และวัคซีน เป็นต้น
3. ผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับพลังงาน ได้แก่ เอทานอล (ก๊าซโซฮอล) มีเทน (ก๊าซชีวภาพ)

4. ผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นม (เนยแข็งและโยเกิร์ต) ยีสต์ขนมปัง เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ (เบียร์ และไวน์) สารเติมแต่งในอาหาร กรดอะมิโน และโปรตีนเซลล์เดียว เป็นต้น
5. ผลิตภัณฑ์ทางเกษตรกรรม ได้แก่ การกำจัดของเสียและของเหลือทิ้ง จุลินทรีย์ ฆ่าแมลง และ จุลินทรีย์ปรับปรุงดิน เป็นต้น

15. ประโยชน์ของอาหารหมัก

การหมักอาหารจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของอาหารในด้านต่างๆ ได้แก่ ระยะเวลาการที่รักษาความปลอดภัย คุณค่าทางโภชนาการ รวมทั้งระดับการยอมรับของผู้บริโภคที่แตกต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่นำมาใช้หมักอาหาร นอกจากนี้อุตสาหกรรมอาหารมีการนำความรู้ทางการหมักมาใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหาร ดังนี้

1. พัฒนาและเพิ่มกลิ่นรสและเนื้อสัมผัสของอาหาร
2. ช่วยรักษาอาหารด้วยสารต่าง ๆ เช่น กรดแลกติก สารประเภทแอลกอฮอล์ กรดอะซิติก สารที่ทำให้เกิดสภาพเป็นด่าง และการใช้สารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นสูง
3. เพิ่มสารอาหารให้แก่อาหารที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบ เช่น วิตามิน โปรตีน กรดอะมิโนที่จำเป็น และกรดไขมันที่จำเป็น
4. ในระหว่างการหมักช่วยลดสารพิษ และช่วยลดเวลาในการปรุงอาหาร รวมทั้งเชื้อเพลิง

16. การแบ่งประเภทของอาหารหมัก

อาหารหมัก สามารถแบ่งประเภทได้ โดยจำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้หมักอาหารนั้น ได้แก่ แบคทีเรียแลคติก เชื้อรา และยีสต์ (ตารางที่ 6) โดยกระบวนการหมักจะเกิดจุลินทรีย์ชนิดเดียวหรือหลายชนิดร่วมกัน เช่น เครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์การหมักด้วยยีสต์ น้ำส้มสายชูหมักด้วยแบคทีเรีย Acetobacter การหมักกนม เนื้อสัตว์และผักด้วยแบคทีเรียแลคติก นอกจากนี้ในอาหารบางชนิดจะมีการหมักด้วยจุลินทรีย์ร่วมกันหลายชนิดดังตารางที่ 7 โดยสามารถแบ่งประเภทของอาหารหมักได้ดังนี้

1. การหมักอาหารจำพวกโปรตีนจากผักและเนื้อ เช่น เทมเป้ (tempeh) และออมจอม (ontjom) เป็นต้น
2. การหมักด้วยเกลือที่มีความเข้มข้นสูง เช่น ซีอิ้ว (soy sauce) กิมจิ (kim-chi) ของเกาหลี เป็นต้น

3. การหมักที่มีการผลิตกรดแลคติกเกิดขึ้น ได้แก่ การหมักผักจำพวกกะหล่ำปลีและแตงกวา การหมักนม เช่น โยเกิร์ต (yogurts) คีเฟอร์ (kefir) นมถั่วเหลืองชีส (cheeses) และการหมักธัญพืช และพืชหัว เช่น ขนมปังเปรี้ยว (sour dough bread) และไอดริ (idli) เป็นต้น
4. การหมักที่มีการผลิตกรดอะซิติกหรือน้ำส้มสายชู เช่น ไชเดอร์ (cider) ไวน์ (wine) และ วุ้นมะพร้าว (nata de coco) เป็นต้น
5. การหมักที่มีการผลิตสารที่สภาพเป็นต่าง เช่น ดาวาดาวา (dawadawa) ในประเทศไนจีเรีย โอจิริ (ogiri) ในแอฟริกา และนัตโต (natto) ในญี่ปุ่น เป็นต้น
6. การหมักให้ขนมปังขึ้นฟู เช่น การใช้ยีสต์เพื่อให้สร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และทำให้ขนมปังขึ้นฟูในประเทศทางทวีปยุโรปและอเมริกา และขนมปังเปรี้ยวในประเทศทางตะวันออกกลาง ปัจจุบันอาหารหมักได้มีการพัฒนาไปสู่ระดับอุตสาหกรรมในประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น สหรัฐอเมริกา ยุโรปและญี่ปุ่น เป็นต้น ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการพัฒนาและยอมรับในประเทศญี่ปุ่น ได้แก่ โชยุ มิโซ และสาเก (sake) ในประเทศ แอฟริกาใต้ ได้แก่ เบียร์ (beer) มาฮีวู (mahewu) และในประเทศไนจีเรีย ได้แก่ โอกิ (ogi) และการี (gari) เป็นต้น โดยผลิตภัณฑ์อาหารหมักทั่วโลกจะต้องได้รับการพัฒนาในด้านต่าง ๆ ให้สอดคล้องตามยุคสมัยและเทคโนโลยีก้าวทันตลาดการแข่งขัน เช่น การรวบรวมเชื้อที่ใช้ในอาหารหมักแบบพื้นบ้าน การพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ รวมทั้งการพัฒนากระบวนการหมัก เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ดีมีคุณภาพตรงตามความต้องการของลูกค้ามากที่สุด

ตารางที่ 6 ชนิดของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก

| แบคทีเรีย | | เชื้อรา | |
|------------------|-----------------|---------------|--------------------------------|
| Gram negative | Gram positive | Filamentous | Yest and non-Filamentous fungi |
| Acetobacter | Arthobacter | Aspergillus | Bretthanomyces |
| Acinetobacter | Bacillus | Aureobasidium | Candida |
| Alcaligines | Bifidobacterium | Fusarium | Cryptococcus |
| Escherichia | Cellulomonas | Mucor | Debaryomyces |
| Flavobacterium | Corynebacter | Neurospora | Endomycopsis |
| | Lactobacillus | Penicillium | Geotrichum |
| Gluconobacter | Lactococcus | Rhizomucor | Hanseniaspora (Kloeckera) |
| Klebsiella | Leuconostoc | | Hansenula |
| Propionibacter | Staphylococcus | | Pichia |
| Pseudomonas | Streptococcus | | Rhodotorula |
| Thermoanaerobium | Streptomyces | | Saccharomyces |
| Zymomonas | | | Schizosaccharomyces |
| | | | Torulopsis |
| | | | Trichosporon |
| | | | Yarrowia |
| | | | Zygosacchharomyces |

ตารางที่ 7 ยีสต์และแบคทีเรียแลคติกในอาหารหมัก

| ยีสต์ | แบคทีเรียแลคติก | ยีสต์และแบคทีเรียแลคติก |
|----------------------|-----------------|-------------------------|
| Moden European beers | Yoghurt | Sourdough bread |
| Bread | Sauerkraut | Kefir |
| Wine | Salami | Soy sauce |
| Cider | Cheese | African beers |
| | | Lambic beer |

17. การหมักบนอาหารแข็ง (solid state fermentation)

การหมักแบบอาหารแข็ง ซึ่งไม่มีน้ำอิสระเพื่อการเจริญของจุลินทรีย์ ลักษณะของน้ำที่อยู่ในระบบการหมักแบบนี้จะมีสภาพความชื้นที่ถูกดูดซับอยู่กับอาหารแข็ง และการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะหยุดชะงักลงถ้าปริมาณความชื้นของอาหารมีประมาณร้อยละ 12 วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการหมักแบบนี้ได้แก่ เมล็ดธัญพืช (เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด ข้าวฟ่างและถั่วเหลือง) รำข้าวสาลี วัตถุประสงค์พวกกลีโคเซลูโลส (เช่น ไม้ ฟางข้าว) รวมทั้งของเสียจากกระบวนการผลิตอาหาร วัตถุประสงค์เหล่านี้มีโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำได้น้อย มีปริมาณจำนวนมาก สามารถหาได้ง่าย ราคาถูก และสารอาหารมีปริมาณมากการใช้กระบวนการหมักแบบอาหารแข็งด้วยจุลินทรีย์เป็นวิธีที่เก่าแก่ที่สุด ได้แก่ การผลิตเทมเป้ ซีอิ๊ว เนยแข็ง การเพาะเห็ด การผลิตเอนไซม์ กรดอินทรีย์ การทำปุ๋ยหมัก และการกำจัดน้ำเสีย เป็นต้น โดยอาหารแข็งส่วนใหญ่จะใช้กับเชื้อราที่สร้างเส้นใย ยีสต์บางชนิด เช่น *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis* และ *Candida* หรือแบคทีเรีย เช่น *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* และ *Bacillus* ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะมีบทบาทสำคัญในการหมักอาหารต่างๆ

การหมักในอาหารแข็งสามารถแบ่งตามลักษณะได้ 2 ประเภท

1. อาหารแข็งที่มีความชื้นต่ำจะนำมาใช้ในการหมักแบบไม่มีการกระเพื่อมอากาศ เช่น เทมเป้ และถั่วเน่า (natto) หรือมีการกวนเป็นครั้งคราว เช่น มิโซ (miso) และซีอิ๊ว
2. ของแข็งที่เป็นสารแขวนลอยจะนำมาใช้ในการหมักโดยบรรจุในคอลัมน์ที่มีของเหลวไหลผ่าน เช่น การทำไวน์จากข้าว และการทำเบียร์จาก kaffir

18. ข้อดีของการหมักในอาหารแข็ง

1. อาหารแข็งส่วนใหญ่จะต้องเคี้ยวเพียงน้ำลงไปเท่านั้น หรืออาจมีการเติมสารอาหารอื่น ๆ ลงไปด้วยก็ได้
2. ปริมาตรของถังหมักที่ใช้มีขนาดเล็ก เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตผลที่ได้จากกระบวนการ เนื่องจากใช้น้ำในปริมาณน้อย และมีสารอาหารอยู่ในปริมาณเข้มข้นไม่มีความจำเป็นเพิ่มปริมาณหัวเชื้อในถังหมัก และสามารถใช้อัตราของเชื้อเริ่มต้นในรูปของสปอร์ได้
3. ไม่มีความจำเป็นเพิ่มปริมาณหัวเชื้อในถังหมัก และสามารถใช้อัตราของเชื้อเริ่มต้นในรูปของสปอร์ได้
4. อาหารแข็งมีเปอร์เซ็นต์ความชื้นต่ำ ช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์
5. สภาพแวดล้อมการเจริญของเชื้อราในอาหารแข็งค่อนข้างคล้ายคลึงกับสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ

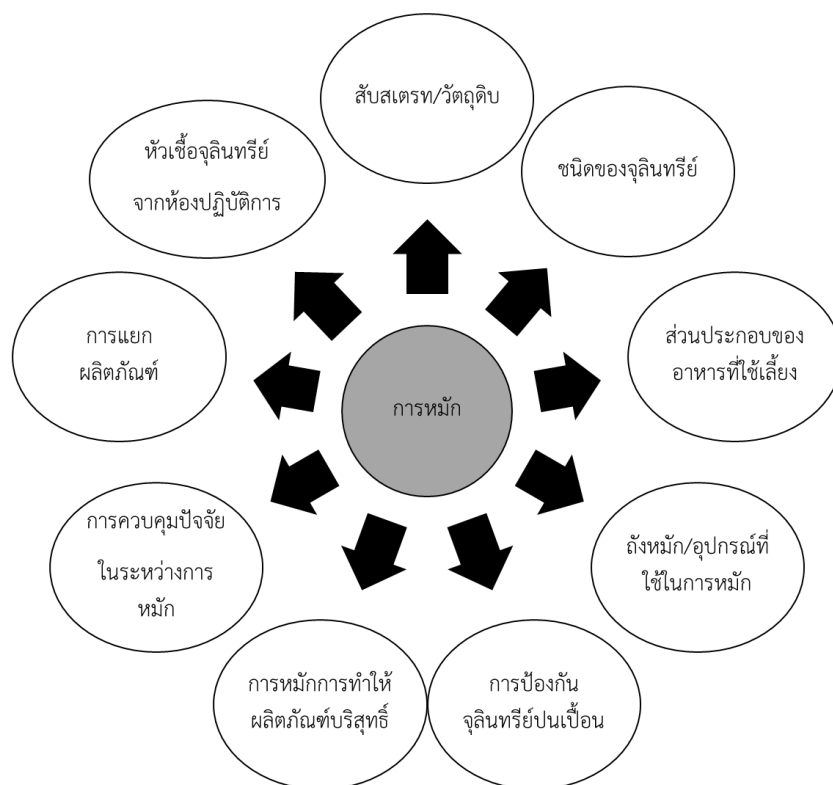
6. การเขย่าอาหารแข็งจะช่วยยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา เชื้อราจะเจริญในรูปของเส้นใยซึ่งเป็นการลดการเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อราในห้องปฏิบัติการ
7. อากาศสามารถแพร่ไประหว่างช่องว่างของอนุภาคอาหาร และอนุภาคจุลินทรีย์ได้อย่างสะดวก
8. ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักในอาหารแข็ง อาจมากกว่าผลผลิตที่ได้จากการหมักในอาหารเหลว และผลผลิตที่ได้ค่อนข้างคงที่
9. ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักในอาหารแข็ง สามารถนำมาสกัดออกได้ทันที
10. ผลผลิตที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์โดยไม่จำเป็นต้องแยกออกจากอาหารแข็งก่อน

19. ข้อเสียของการหมักในอาหารแข็ง

1. การเขย่าหรือการกวนอาหารแข็งตลอดเวลาหมักต้องอาศัยพลังงานสูง
2. การเติมน้ำลงไปในการหมักในช่วงแรกของการหมัก และอาจมีผลทำให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้
3. ปริมาณเริ่มต้นของสปอร์ที่ใช้อาจต้องมีปริมาณมาก ดังนั้นต้องมีกรรมวิธีการผลิตเพื่อเพิ่มปริมาณสปอร์ และการเก็บเกี่ยวสปอร์ต้องใช้เทคนิคที่ปราศจากเชื้อ
4. วัตถุประสงค์ทางการเกษตรที่นำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจต้องนำมาผ่านกรรมวิธีอื่น ๆ ก่อนการนำมาใช้ เช่น ทำให้แตกหรืออบ
5. ต้องพัฒนากระบวนการหมักเพื่อให้แน่ใจว่า ความต้องการผลิตผลปริมาณมากมีความเป็นไปได้สูง

20. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก

การเข้าใจกระบวนการหมักเป็นสิ่งที่มีความสำคัญยิ่ง โดยเฉพาะในกระบวนการหมักที่มีขนาดใหญ่ระดับโรงงานอุตสาหกรรม ในขณะที่การหมักระดับเล็ก เช่น ระดับห้องปฏิบัติการ จะไม่ยุ่งยากซับซ้อนมากนัก แต่การพัฒนาและการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในระดับห้องปฏิบัติการจะเป็นความรู้เพื่อนำไปสู่การขยายการหมักระดับที่ใหญ่ (pilot scale) ขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการหมักและควรคำนึงถึง ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 6 ปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการหมัก

21. จุลินทรีย์ที่สำคัญในการหมัก

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมักมี 3 ชนิดที่สำคัญ คือ แบคทีเรียแลคติก ยีสต์ และเชื้อรา โดยอาจเติมในรูปของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียว (single culture) เชื้อผสม (mixed culture) หรือบางครั้งไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ถ้าหากมีปริมาณจุลินทรีย์อยู่ในวัตถุดิบในปริมาณพอเพียงแล้ว แต่ในปัจจุบันพบว่า การหมักส่วนใหญ่จะใช้เชื้อจุลินทรีย์ในรูปหัวเชื้อหรือกล้าเชื้อเริ่มต้น เพื่อช่วยให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้คงที่ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักจะต้องมีลักษณะดังนี้

1. จะต้องมีความเฉพาะจุลินทรีย์ที่ต้องการเท่านั้น
2. มีจำนวนจุลินทรีย์ที่คงที่ หรือเป็นสัดส่วน (ในกรณีที่ใช้เชื้อผสม) และมีประสิทธิภาพดีในแต่ละวันที่ใช้
3. มีประสิทธิภาพในการให้ผลผลิตที่ต้องการ
4. ทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม

ในการหมักอาหารหลาย ๆ ชนิด พบว่า แบคทีเรียแลคติกจะมีบทบาทสำคัญในการเก็บรักษาอาหาร การหมักกรดแลคติกเป็นกระบวนการที่เสียค่าใช้จ่ายน้อย อาศัยความร้อนในกระบวนการเล็กน้อยหรือไม่ต้องใช้ความร้อน อาหารที่หมักด้วยกรดแลคติกมีบทบาทสำคัญทั่วโลก ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียพวกแลคติก ได้แก่ ผักดองจำพวกกิมจิ (kimchi) หรือแตงกวาดอง โยเกิร์ตที่ได้จากธัญพืช ผลิตภัณฑ์จากนมปิ้งและผลิตภัณฑ์ที่คล้ายนมปิ้งที่ไม่ได้ทำจากแป้งข้าวสาลีหรือข้าวไรน์ ในประเทศฟิลิปปินส์ ผลิตภัณฑ์นมหมัก (โยเกิร์ตและเนยแข็ง) ผลิตภัณฑ์นมหมักผสมข้าวสาลี การผลิตเบียร์ในประเทศอินโดนีเซียที่มีคุณค่าทางโปรตีนสูงใช้แทนเนื้อสัตว์ การผลิตมิโซและชีอิ้ว และการผลิตเนื้อหมัก เช่น ซาลามิ (Salami) เป็นต้น

1.1 แบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria)

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่มีการสร้างสปอร์ ส่วนใหญ่เจริญในสภาวะไม่มีอากาศและสามารถทนต่อสภาวะมีอากาศได้ (aerotolerant anaerobes) ไม่มี cytochromes และ porphyrins จึงทำให้ไม่มีเอนไซม์ catalase และ oxidase นอกจากนี้แบคทีเรียพวกนี้สามารถใช้ออกซิเจนผ่านทาง flavoprotein oxidases และผลิต hydrogen peroxide หรือ re-oxidize NADH ขึ้นในระหว่างการใช้กลูโคสของแบคทีเรียแลคติกโดยแบคทีเรียแลคติกมีลักษณะการหมักที่แตกต่างกัน นอกจากนี้มีกลไกการหมักแบบ homofermentation หรือการหมักแบบ heterofermentation อย่างใดอย่างหนึ่ง แบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญในที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) แต่บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูง 45 ° องศาเซลเซียส ส่วน pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.0-4.5 แต่ก็มีบางสายพันธุ์ที่สามารถทน pH ต่ำสุด 3.2 และสูงสุด 9.0 ได้ ในระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติกมีความต้องการ พิวรีน ไพริมิดีน กรดอะมิโน และวิตามินบีส่วนการสร้างพลังงานของแบคทีเรียแลคติกจะได้รับการหมักคาร์โบไฮเดรตและผลิตภัณฑ์แลคติก ซึ่งการหมักเป็นแบบ homofermentation ที่มีเป็นการผลิตกรดแลคติกหรือแลคเตทเพียงอย่างเดียวผ่านกลไกของ Emden-Meyerhof-Parnas glycolytic pathway ส่วนการหมักแบบ heterofermentation มีการผลิตกรดแลคติก ร่วมกับผลิตภัณฑ์อื่น ได้แก่ เอทานอล/อะซิเตท และคาร์บอนไดออกไซด์ การหมักทั้งสองแบบนี้แบคทีเรียแลคติกจะมีการใช้กลูโคสเป็นสารเริ่มต้นเหมือนกัน

1.2 ยีสต์ (yeast)

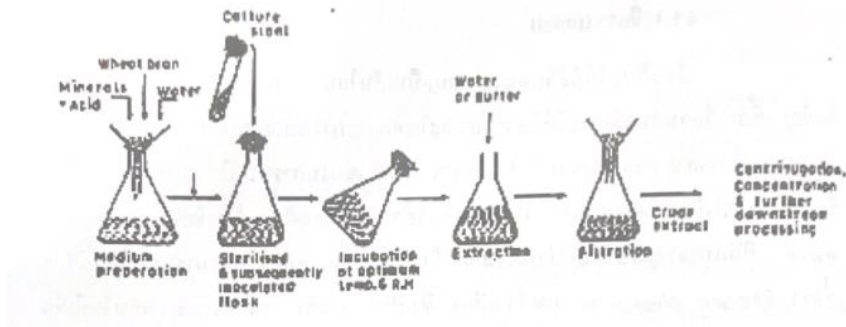
ยีสต์เป็นจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในเทคโนโลยีการหมัก เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้แก่ อาหารหมัก เครื่องดื่ม สารเคมี ตลอดจนเอนไซม์ที่ใช้ในโรงงาน ในอดีตพบว่าหมักในกระบวนการผลิตเครื่องดื่ม เช่น เบียร์ ไวน์ เหล้ากลั่น และสาเกเท่านั้น แต่ปัจจุบันยีสต์ถือว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการพัฒนาอาหารพื้นบ้านรวมทั้งผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ ทำให้มีการศึกษาค้นคว้า

เพิ่มมากขึ้นจนส่งผลให้วงการอาหารหมักมีการก้าวหน้ามีความรู้ทางเทคโนโลยีใหม่ ๆ เกิดขึ้นโดยกลไกการหมักของยีสต์โดยทั่วไปจะใช้สารอินทรีย์เป็นสับสเตรทหรือแหล่งคาร์บอนและมีการเจริญเติบโตโดยไม่ใช้อากาศ เช่น การหมักน้ำตาลกลูโคส ซึ่งจะเกิดการย่อยสลายผ่านวิถีคะตาบอลิซึม (catabolism pathways) ภายในเซลล์ยีสต์ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์มากมายต่อไปในทางตรงกันข้ามหากมีการเจริญเติบโตโดยใช้อากาศจะเป็นการสร้างเซลล์ของยีสต์เท่านั้น

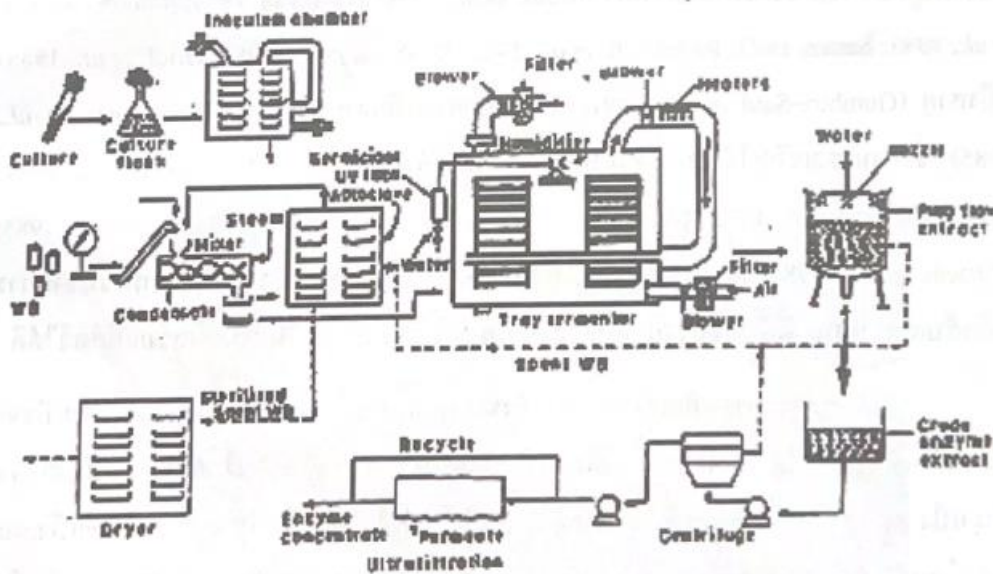
1.3 เชื้อรา (fungi)

เป็นจุลินทรีย์ที่มีลักษณะปรากฏเป็นเส้นใยบางๆ พูกระจายอยู่บนผิวหน้าวัตถุที่เจริญ เชื้อราถือว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง เนื่องจากเส้นใยของเชื้อราสามารถเจริญซ่อนในสับสเตรทได้ดี เช่นในการหมักโคจิ (koji) และเทมเป้ซึ่งการผลิตโคจิเป็นขั้นตอนแรกของโรงงานผลิตซีอิ๊ว และกรดซิตริกด้วยเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ที่มีการเจริญเติบโตบนส่วนผสมของข้าวสาลีและถั่วเหลือง และการหมักเทมเป้ด้วย *Rhizopus oligosporus* บนถั่วเหลือง ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองของประเทศอินโดนีเซีย ดังนั้น เชื้อราจึงมีส่วนในการหมักอาหารของประเทศแถบเอเชียเป็นอย่างมาก เนื่องจากเชื้อราจะมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีในสับสเตรทที่มีขนาดใหญ่ โดยเฉพาะคาร์โบไฮเดรต รวมทั้งเชื้อราสามารถช่วยเพิ่มโปรตีนให้แก่สับสเตรทที่เป็นแป้งได้ดี เช่น แป้งมันสำปะหลัง แป้งสาคุ และวัสดุเศษเหลือจากกล้วย ซึ่งสามารถเจริญได้ดีพอๆกันกับการเลี้ยงโดยใช้ฟางข้าวสาลี และเปลือกหัวบีท (Bajon et al., 1985) ซึ่งโปรตีนที่เพิ่มขึ้นจากการหมักสับสเตรทเหล่านี้ด้วยเชื้อรามีจุดประสงค์ในการใช้เพื่อนำมาเป็นอาหารเสริมแก่สัตว์ได้ดี

ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรามีปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่างๆ ได้แก่ ปริมาณน้ำและมี pH ที่เป็นกรด ขนาดของโมเลกุลของสับสเตรท เช่น แป้ง เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เพคติน ลิกนิน โปรตีน และไขมัน ซึ่งส่วนใหญ่แป้งและเซลลูโลสจัดว่ามีความสำคัญเนื่องจากเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เซลลูโลส โดยเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ *Mucor*, *Rhizopus* และ *Aspergillus* เป็นต้น ดังนั้น การหมักด้วยเชื้อราจึงมีการศึกษากระบวนการและผลิตเอนไซม์ในห้องปฏิบัติการ ดังรูปที่ 5 จนกระทั่งพัฒนาไปสู่การผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม ดังรูปที่ 6



ภาพที่ 7 การผลิตเอนไซม์ระดับห้องปฏิบัติการด้วยเชื้อราในสภาวะการเลี้ยงแบบอาหารแข็ง
ที่มา : Lonsane และ Ghildyal (1992)



ภาพที่ 8 การผลิตเอนไซม์ระดับอุตสาหกรรมด้วยเชื้อราในสภาวะการเลี้ยงแบบอาหารแข็ง
ที่มา : Lonsane และ Ghildyal (1992)

บทบาทของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก

บทบาทของจุลินทรีย์ต่ออาหารหมักจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการหมัก เช่น การหมักดองผักและผลไม้ การผลิตเนยแข็ง การหมักไส้กรอก เพื่อเก็บรักษาอาหารให้สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน และทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดี นอกจากนี้ในอาหารหมักบางชนิดมีส่วนช่วยในการลดสารพิษ รวมทั้งเพิ่มปริมาณสารอาหารของอาหารในระหว่างการหมักอันเนื่องมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ เพื่อย่อยสารอาหารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ให้เล็กลง เช่น โยเกิร์ตซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการย่อยโปรตีนในนมให้มีขนาดโมเลกุลเล็กก่อนการบริโภค สามารถใช้ในเชิงอาหารเพื่อสุขภาพได้

หรือการย่อยคาร์โบไฮเดรตเพื่อใช้กับผู้บริโภคนั้นที่ไม่สามารถตีมันม เนื่องจากขาดเอนไซม์แลกเตสเพื่อย่อยแลคโตสในนม ฉะนั้น การย่อยนมด้วยกิจกรรมเอนไซม์แลกเตสจากแบคทีเรียแลคติก เช่น *Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* จะมีผลให้ไนโยเจอร์ตมีปริมาณของแลคโตสน้อยลง ทำให้ผู้บริโภคนั้นสามารถรับประทานโยเกิร์ตได้ดีกว่านม ส่วนในอาหารที่มีไขมันมักมีการใช้ยีสต์ หรือแบคทีเรียบางชนิด และเชื้อราที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการหมัก (จารุวรรณมณีศรี, 2551) นอกจากนี้การหมักพืช หรือที่มีโครงสร้างของ cellulose, hemicellulose, polygalacturonic และ glucuronic acid มีผลให้ช่วยลดสารที่ย่อยยากให้มีปริมาณลดลง รวมทั้งในระหว่างการหมักอาจมีการสังเคราะห์สารอาหารที่จำเป็น ได้แก่ วิตามิน กรดอะมิโน และโปรตีน เป็นต้น ทำให้อาหารหมักจากพืชหรือสัตว์จึงเป็นที่ยอมรับในหลาย ๆ ประเทศ หรือที่เห็นได้ชัด เช่น ประเทศญี่ปุ่น มีการผลิตแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* หรือ *Bifidobacteria*) ให้อยู่ในรูป freeze-dry เพื่อใช้บริโภคและมีจำหน่ายแพร่หลายทั่วไป (Kalantozoulos, 1997) นอกจากนี้การหมักสามารถทำให้อาหารที่มีส่วนประกอบเป็นพืช มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นได้ (Hur et al., 2014) อันเนื่องมาจากกลไกดังต่อไปนี้

- ปลดปล่อยสาร flavonoids ออกมาจากพืช
- เกิดการทำลายโครงสร้างของเซลล์พืช ซึ่งจะช่วยให้สารอาหาร ตลอดจนสารออกฤทธิ์ชีวภาพต่างๆ ถูกปลดปล่อยออกมาโดยเอนไซม์ที่ช่วยในการทำลายโครงสร้างเซลล์ได้แก่ glucosidase, amylase, cellulase, chitinase, inulinase, phytase, xylanase, tannase, esterase, invertase และ lipase
- กระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ชีวภาพชนิดต่างๆ
- การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพฤษเคมีบางชนิด ให้อยู่ในรูป (form) ที่ต้านอนุมูลอิสระได้มากขึ้น เช่น ในถั่วเหลืองหมัก ที่พบว่าเอนไซม์ beta-glucosidase มีการตัดพันธะของ glycosylated isoflavones (glycosides) ในถั่วเหลืองทำให้ได้ isoflavone ในรูปแบบ aglycone อิสระเพิ่มขึ้นในระหว่างการหมัก ซึ่งมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า glycosylated isoflavones

แต่ในทางตรงกันข้าม ในกระบวนการหมักบางชนิด กลับพบว่า flavonol glycosides ซึ่งเป็น phenolic compound ในชาเขียว ที่มีปริมาณคิดเป็นร้อยละ 18 ของ phenolic compound ทั้งหมด มีปริมาณลดลงภายหลังการหมัก ทั้งนี้ อาจจะเนื่องมาจากถูกทำลายด้วยกระบวนการออกซิเดชัน สาร catechins ในชาก็ลดลงภายหลังการหมักเช่นกัน โดยถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างให้

กลายเป็นสาร theaflavins และ thearubigins ดังนั้นความสามารถต้านอนุมูลอิสระของชาจึงลดลง อย่างไรก็ตามความสามารถโดยรวมในการต้านอนุมูลอิสระของอาหารที่มีพืชเป็นส่วนประกอบนั้น (ธัญพืช ผัก ผลไม้) ไม่สามารถคาดคะเนได้จากปริมาณของสาร phenolic compounds เพียงอย่างเดียวเท่านั้น แต่ต้องคำนึงถึงผลจากปัจจัยและสารอื่นๆ ที่อยู่ในอาหารด้วยที่อาจให้ผลส่งเสริมให้เกิดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นได้ ได้แก่ สายพันธุ์ จุลินทรีย์ โปรตีนและเพปไทด์ ค่า pH และ อุณหภูมิการหมัก

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เนื่องจากข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความต้องการมากในตลาด จึงมีรำข้าวที่เป็นเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปมากมายจากการผลิต ดังนั้นการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับรำข้าวได้โดยใช้เทคโนโลยีการหมักจากกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มคุณค่าให้กับรำข้าว โดยมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เทคโนโลยีการหมักจากกระบวนการหมัก ยกตัวอย่างเช่น

Shin et al. (2019) ซึ่งในงานวิจัยนี้ทำการหมักแบบ Solid state fermentation หรือการหมักแบบอาหารแข็ง และใช้รำข้าวเก่าเป็นวัตถุดิบ ใช้ *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae* เป็นเชื้อราในการหมักเพื่อเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากผลการทดลอง พบว่า Total phenolic เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 4 และลดลงในวันที่ 5 เนื่องจากเมื่อเพิ่มเวลาการหมักที่นานขึ้นอาจเกิดการสลายหรือทำพันธะ กับ polyseclide ทำให้ Total phenolic ลดลง แต่ในขณะที่ Anthocyanin เมื่อผ่านขั้นตอนในการ pretreatment มีค่าคงที่ตลอดในระยะเวลาหมัก เมื่อเวลาการหมักผ่านไป ผู้วิจัยทำการวิเคราะห์สาร Phenolic acid composition พบสาร 6 ชนิด Protocatechuic acid, OH-Benzoic acid, Vanillic acid, Caffeic acid, *p*-Coumaric acid, Ferulic acid ในระหว่างการหมักมีการวัดปริมาณสารต่างๆ เหล่านี้ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปสารแต่ละชนิดเพิ่มขึ้นและลดลง เช่น Protocatechuic acid Vanillic acid Ferulic acid มีปริมาณเพิ่มขึ้นแต่ในขณะที่สารอื่นมีปริมาณลดลง ซึ่งโดยรวมแล้วส่งผลให้ปริมาณ TPC ลดลง โดยจากการทดลอง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่าหลังจากที่หมักมีการเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย

Schmidt et al. (2014) ก็เป็นอีกทีมวิจัยที่ทำการหมักรำข้าวด้วย *Rhizopus ligosporus* และใช้การหมักแบบอาหารแข็ง จากนั้นวิเคราะห์สารประกอบโพลีฟีนอลิกในรำข้าวหมัก วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลชนิด DPPH และทดสอบความสามารถของรำข้าวหมักในการยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ peroxidase และ polyphenol oxidase ผลการทดลองพบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เพิ่มขึ้นมากกว่าร้อยละ 100 หลังการหมัก โดย gallic acid และ ferulic acid เป็นสารที่มีปริมาณ เพิ่มขึ้นสูงที่สุดเป็น 170 และ 765 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ สารสกัดจากรำข้าวหมักนี้สามารถ จำกัลดอนุมูล DPPH ได้ โดยทำให้ DPPH ลดลงร้อยละ 50 ต้องใช้สารสกัด 250 มิลลิกรัมต่อกรัม อีกทั้งสารสกัดนี้ยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ peroxidase ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ polyphenol oxidase ทีมวิจัยยังรายงานว่สารประกอบฟีนอลิกในรำข้าวที่มีบทบาทสูงในการเป็น สารต้านอนุมูลอิสระคือ ferulic acid และ *p-coumaric acid* ซึ่งรูปแบบโมเลกุลมีทั้งรูปแบบโมเลกุล อิสระและที่เชื่อมต่อกับโมเลกุลอื่น และพบได้ทั้งในแวคิวโอล (vacuole) ของเซลล์พืชและที่เชื่อมต่อกับด้วยพันธะเอสเทอร์อยู่บนเส้นใยผนังเซลล์พืช เช่น เซลลูโลส (celluloses) เฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses) เพคติน (pectins) และลิกนิน (lignin) ในระหว่างกระบวนการหมักรำข้าว จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิดเพื่อย่อยโครงสร้างผนังเซลล์ทำให้สารประกอบฟีนอลิกถูกขับ ออกมาจากเซลล์มากขึ้นและยังสลายพันธะเพื่อปลดปล่อย ferulic acid ออกมาจากโครงสร้างเส้นใย ที่ผนังเซลล์ด้วย

Razak et al. (2017) มีรายงานว่าการหมักรำข้าวด้วย *Lactobacillus casei* และ *Lactobacillus plantarum* สามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารฟีนอลิก โดยมีผลการทดลอง พบว่าสารสกัดจากรำข้าวที่หมักด้วย *L. plantarum* ที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 และเวลา 48 ชั่วโมงมี ปริมาณสารฟีนอลิกสูงที่สุด และการหมักด้วย *L. casei* ที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 เวลา 48 ชั่วโมง ให้ กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระสูงสุด นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ HPLC พบว่าข้าวหอมมะลิที่หมักด้วย *L. casei* ที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 เวลา 48 ชั่วโมง พบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุด

B Le et al. (2021) มีรายงานว่าเมื่อเปรียบเทียบกับรำข้าวที่ไม่ผ่านการหมักและรำข้าวที่ ผ่านการหมักด้วย *Lactococcus lactis subsp. lactis* MJM60392 แสดงให้เห็นปริมาณสาร ฟีนอลิกสูงที่สุด นอกจากนี้ยังพบปริมาณกรดเพรุติก, กรดคูมาริก, และแกมมา-ออริซานอลในรำข้าว

เพิ่มขึ้นหลังจากหมัก และยังพบผลการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์และกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของรำข้าวได้อย่างมีนัยสำคัญ

Christ-Ribeiro et al. (2021) จากรายงานการวิจัยพบว่า การหมักรำข้าวด้วย *Saccharomyces cerevisiae* สามารถเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระได้ โดยรำข้าวมีสารอาหารอย่าง โปรตีน ไขมัน และสารอาหารอื่น ๆ อย่างมาก โดยพบว่ากระบวนการหมักสามารถสร้างสารสำคัญที่มีความสำคัญทางชีวภาพ เช่น โพลีแซคคาไรด์ สารฟีนอล และสารอื่น ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสารที่ช่วยในการปกป้องร่างกายจากอันตรายของอนุมูลอิสระและการเสื่อมสภาพของเซลล์ในร่างกาย การเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระในข้าวหมักยังเสริมสร้างคุณค่าทางโภชนาการของข้าวและผลิตภัณฑ์ที่ทำมา เช่น คุกกี้ ขนม หรืออาหารอื่น ๆ ที่ใช้ข้าวหมักเป็นส่วนผสม

Razak et al. (2017) รายงานการเพิ่มขึ้นของสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรำข้าวหมักเช่นกันโดยยังคงหมักด้วยเชื้อ *R. oligosporus* ในรูปแบบอาหารแข็งแต่สิ่งที่แตกต่างกันคือ ทีมวิจัยหมักร่วมด้วยเชื้อรา *Monascus purpureus* ผลการวิจัยพบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมของรำข้าวหมักเพิ่มขึ้นจาก 1.66 มิลลิกรัมต่อกรัม เป็น 7.22, 1.73 และ 8.38 มิลลิกรัมต่อกรัม เมื่อหมักด้วยเชื้อเดี่ยว *R. oligosporus*, *M. purpureus* และเชื้อผสมของราทั้งสองสายพันธุ์ ตามลำดับแสดงให้เห็นผลแบบทวีคูณเมื่อเพาะเลี้ยงแบบเชื้อผสม เช่นเดียวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปของค่า ferric reducing ability of plasma (FRAP) ที่เพิ่มจาก 30.22 ไมโครกรัมต่อกรัม เป็น 116.33 61.21 และ 144.03 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดด้วยเครื่อง HPLC พบว่าสารออกฤทธิ์ที่เพิ่มปริมาณขึ้นจากการหมักครั้งนี้ ได้แก่ ferulic acid, syringic acid, vanillic acid, syringic acid และ 4-hydroxybenzoic acid ทีมวิจัยยังกล่าวว่ารำข้าวหมักนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอางได้

Moon and Chang (2021) พบว่าการหมักรำข้าวด้วย *Lactiplantibacillus plantarum* EM หรือ *Lactobacillus plantarum* พบว่ามีศักยภาพลดคอเลสเตอรอลได้ถึงร้อยละ 45 ถึงร้อยละ 68 นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถลดระดับไฟเตตในรำข้าวหมักอย่างมีนัยสำคัญถึงร้อยละ 53 ในระหว่างการหมัก และยังสามารถเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระรวมถึงเพิ่มการดูดซึมของแร่ธาตุเข้าสู่ร่างกาย

บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เชื้อจุลินทรีย์

| | |
|--|--|
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> TISTR 1338 (LA) | สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> TISTR 451 (LB) | สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> TISTR 541 (LP) | สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย |
| <i>Lactobacillus lactis</i> TISTR 1464 (LL) | สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย |
| <i>Lactobacillus johnsonii</i> CK3 (CK3) | ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีจุลินทรีย์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ |
| <i>Lactobacillus johnsonii</i> VCF29 (VCF29) | ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีจุลินทรีย์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ |
| <i>Bacillus</i> (TK8) | ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีจุลินทรีย์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ |
| <i>Bacillus</i> (MR-10) | ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีจุลินทรีย์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (IR5) | ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ |
| <i>Rhizopus microsporus</i> (BG5) | ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ |

2. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

| | |
|----------------------------|----------------|
| 2.1. peptone dextrose agar | Himedia, India |
| 2.2. potato dextrose agar | Himedia, India |
| 2.3. nutrient Broth | Himedia, India |

3. อุปกรณ์

| | |
|--|--------------------------------|
| 3.1 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (analytical balance) | Mettler-Toledo, Switzerland |
| 3.2 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (analytical balance) | OHAUS, USA |
| 3.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันไอน้ำ (autoclave) | Sturdy, Thailand |
| 3.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) | Hettich, Thailand |
| 3.5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) | Memmert, Germany |
| 3.6 แก๊สหุงต้ม (cooking Gas) | PTT, Thailand |
| 3.7 โถดูดความชื้น (desiccator) | - |
| 3.8 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry) | - |
| 3.9 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) | Binder, USA |
| 3.10 เครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) | Agilent Techonlogies, USA |
| 3.11 ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์ (incubator) | Gallenkamp |
| 3.12 ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air flow) | Microtech, Thailand |
| 3.13 เครื่องกวนสารละลาย (magnetic Stirrer) | IKA, Germany |
| 3.14 เครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader) | BMG LABTECH, Germany |
| 3.15 ไมโครเวฟ (microwave) | Sharp, Japan |
| 3.16 เครื่องอบแห้งคลื่นไมโครเวฟ (microwave drier) | - |
| 3.17 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) | Drawell |
| 3.18 เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) | BUCHI, Thailand |
| 3.19 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) | Genesys 20 |
| 3.20 ตู้อบชนิดสูญญากาศ (vacuum drying) | - |
| 3.21 เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) | Vortex-Genie-2, USA |
| 3.22 คอลัมน์ชนิด pinnacle C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm) | GL Sciences, Tokyo, Japan |

| | | |
|------|---|-------------------|
| 3.23 | ฟรอยด์อลูมิเนียม (aluminium foil) | Diamond, Thailand |
| 3.24 | บีกเกอร์ (beaker) | KIMAX, USA |
| 3.25 | หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube) | Superclear, USA |
| 3.26 | คิวเวท พลาสติก (cuvette plastic) | VER, England |
| 3.27 | กระบอกตวง (cylinder) | - |
| 3.28 | ปิเปตต์แก้ว (glass pipettes) | - |
| 3.29 | ไมโครปิเปตต์ (micropipettes) | Gilson, France |
| 3.30 | ไมโครปิเปตต์ทิว (micropipette tip) | Hycon |
| 3.31 | พาราฟิล์ม (parafilm) | BEMIS, USA |
| 3.32 | จานเพาะเชื้อ (petri dish) | Hycon |
| 3.33 | ลูกยางดูดปิเปตต์ 3 ทาง (pipette filler ball) | Boeco, Germany |
| 3.34 | ช้อนตักสาร (spatula) | - |
| 3.35 | เข็มฉีดยาพลาสติก (syringe) | NIPRO, Thailand |
| 3.36 | ฟิลเตอร์กรองสาร (syringe filter) | Labfil, China |
| 3.37 | ถาดหลุมไมโครเพลท (96-Well Plates) | - |
| 3.38 | ขวดแก้วใส่ตัวอย่าง (vial) | - |
| 3.39 | หลอดทดลอง (test tubes) | PYREX |
| 3.40 | ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (test tube rack stainless) | - |
| 3.41 | ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) | JSGW |
| 3.42 | กระดาษกรองเบอร์ 1 | Whatman, Thailand |

4. สารเคมี

4.1 สารประกอบฟีนอลิกมาตรฐานจำนวน 6 ชนิด

| | | |
|-------|------------------------------------|-------------------------|
| 4.1.1 | vanillic acid | Sigma-Aldrich, Thailand |
| 4.1.2 | syringic acid | Sigma-Aldrich, Thailand |
| 4.1.3 | <i>p</i> -Coumaric acid | Sigma-Aldrich, Thailand |
| 4.1.4 | caffeic acid | Sigma-Aldrich, Thailand |
| 4.1.5 | trans-ferulic acid | Sigma-Aldrich, Thailand |
| 4.1.6 | sinapic acid | Sigma-Aldrich, Thailand |
| 4.2 | acetic acid (CH ₃ COOH) | RCI labscan, Thailand |

| | |
|--|--------------------------------|
| 4.3 acrylamide (C ₃ H ₅ NO) | Bio-rad, USA |
| 4.4 absolute alcohol 99.8% (C ₂ H ₅ OH) | องค์การสุรา, ประเทศไทย |
| 4.5 acetonitrile (CH ₃ CN) | Fisher Chemical |
| 4.6 ammonium dihydrogen orthophosphate (NH ₄ H ₂ PO ₄) | Fisher scientific, Thailand |
| 4.7 ammonium persulfate ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈) | RCI labscan, Thailand |
| 4.8 ammonium sulfate ((NH ₄) ₂ SO ₄) | Univer, Australia |
| 4.9 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid, ABTS | Sigma-Aldrich, Thailand |
| 4.10 L-ascorbic acid, Vitamin C (C ₆ H ₈ O ₆) | Fisher Chemical, Thailand |
| 4.11 bovine serum albumin, BSA | Sigma-Aldrich, Thailand |
| 4.12 butylated hydroxyl anisole, BHA (C ₁₅ H ₂₄ O) | Sigma-Aldrich, Thailand |
| 4.13 coomassie brilliant blue G250 (C ₄₇ H ₄₈ N ₃ NaO ₇ S ₂) | Univer, Australia |
| 4.14 citric acid monohydrate (C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O) | RCI labscan, Thailand |
| 4.15 dimethyl sulfoxide (C ₂ H ₆ OS) | DMSO RCI labscan, Thailand |
| 4.16 3,5 dinitrosalicylic acid (C ₇ H ₄ N ₂ O ₇) | Sigma-Aldrich, Thailand |
| 4.17 ferric chloride (FeCl ₃) | Sigma-Aldrich, Thailand |
| 4.18 ferrous sulfate (FeSO ₄ .7H ₂ O) | Fisher Chemical, Thailand |
| 4.19 ferrozine (C ₂₀ H ₁₂ N ₄ Na ₂ O ₆ S ₂) | - |
| 4.20 D-glucose anhydrous (C ₆ H ₁₂ O ₆) | QReC |
| 4.21 hydrochloric acid 37% (HCl) | RCI labscan, Thailand |
| 4.22 β-mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS) | - |
| 4.23 methanol (CH ₃ OH) | RCI labscan, Thailand |
| 4.24 phenol (C ₆ H ₆ O) | Fused Crystal, USP |
| 4.25 phosphoric acid (H ₃ PO ₄) | QReC |
| 4.26 Di-potassium hydrogen orthophosphate (K ₂ HPO ₄) | Univer, Australia |
| 4.27 potassium dihydrogen orthophosphate (KH ₂ PO ₄) | Ajax Finechem |

| | | |
|------|---|---------------------------------|
| 4.28 | potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) | - |
| 4.29 | protein ladder | Bio-helix, Taiwan |
| 4.30 | sodium acetate anhydrous (CH_3COONa) | QReC |
| 4.31 | sodium chloride (NaCl) | RCI labscan, Thailand |
| 4.32 | sodium citrate ($Na_3H_5O_7 \cdot 2H_2O$) | Univer, Australia |
| 4.33 | sodium dodecyl sulphate (SDS) | - |
| 4.34 | sodium hydroxide (NaOH) | RCI labscan, Thailand |
| 4.35 | TEMED ($C_6H_{16}N_2$) | Himedia, India |
| 4.36 | tris-base ($C_4H_{11}NO_3$) | - |
| 4.37 | trifluoroacetic acid ($C_2HF_3O_2$) | Thermo Fisher Scientific USA |
| 4.38 | tris HCl ($C_4H_{11}NO_3$) | ChemCruz™, Netherland |
| 4.39 | DL- α -tocopherol, Vitamin E ($C_{31}H_{52}O_3$) | - |
| 4.40 | yeast extract | RCI labscan, Thailand |

5. วัตถุดิบ

รำข้าวที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้จากรำข้าวสายพันธุ์หอมมะลิ 105 โดยบริษัท สมา เอลท์ดีแคร์ จำกัด จังหวัดอุบลราชธานี

วิธีการทดลอง

1. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการหมักรำข้าว

จากการรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์จากคลังเชื้อ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยเป็นแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์คือ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 (LA), *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 451 (LB), *Lactobacillus plantarum* TISTR 541 (LP), *Lactobacillus lactis* TISTR 1464 (LL), *Lactobacillus johnsonii* CK3 (CK3), *Lactobacillus johnsonii* VCF29 (VCF29), *Bacillus* (TK8) และ *Bacillus* (MR-10), ยีสต์ 1 สายพันธุ์ คือ *Saccharomyces cerevisiae* (IR5) และเชื้อรา 1 สายพันธุ์ คือ *Rhizopus microsporus* (BG5) โดยจุลินทรีย์ที่นำมาคัดเลือกในการหมักถูกรับรองความปลอดภัยเพื่อใช้เป็นอาหาร (generally recognized as safe, GRAS) จากนั้นเตรียมหัวเชื้อแต่ละสายพันธุ์ด้วยสูตรอาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของแต่ละสายพันธุ์ โดยแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา

เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร nutrient broth, yeast extract, peptone dextrose และ potato dextrose broth ตามลำดับ จากนั้นเก็บเซลล์หรือสปอร์ด้วยการปั่นเหวี่ยงและล้างให้สะอาดด้วยน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (w/v) อาหารแข็งที่ใช้ในการหมักเตรียมโดยผสมรำข้าวและน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นทำการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ถ่ายหัวเชื้อ (10^6 เซลล์ หรือ 10^6 สปอร์) ลงไป ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิดเป็นเวลา 3 วัน แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตอิสระ (available phosphate) ด้วย Fiske and Subbarow method (Kim et al., 1998) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS scavenging activity โดยดัดแปลงจากวิธีของ (Re et al., 1999) คัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมที่สามารถเพิ่มปริมาณฟอสเฟตอิสระและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดย dinitrosalicylic acid (DNS) method (Miller et al., 1959) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ด้วย Phenol-sulfuric acid method (BeMiller et al., 2010) และวิเคราะห์โปรตีนที่ละลายน้ำได้ด้วย Bradford assay method (Hammond et al., 1988).

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักรำข้าว

เมื่อได้จุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการหมักรำข้าวแล้วจะทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมัก โดยศึกษาปัจจัยการหมักทั้งสิ้น 3 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณความชื้นแบบ dry basis (ร้อยละ 50-100) อุณหภูมิ (25-45 องศาเซลเซียส) ปริมาณหัวเชื้อ (4-6 log cfu ต่อกรัม หรือ สปอร์ต่อกรัม) ทำการศึกษา 3 ปัจจัยโดยใช้แผนการทดลอง Box-Behnken design ชนิด 3 ปัจจัย ทำให้มีชุดทดลอง (treatment) ทั้งหมด 17 ชุดทดลอง ช่วงและระดับของตัวแปรที่กำหนดในแผนการทดลอง แสดงดังตารางที่ 8 และทำการทดลองตามตารางที่ 9 หมักเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำตัวอย่างรำข้าวหมักทุกชุดทดลองมาทำแห้ง และวัดปริมาณฟอสเฟตอิสระ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแต่ละวิธีข้อมูลที่ได้นำไปประมวลผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistical[©] หรืออื่นๆ เพื่อหาระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยในการเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและลดปริมาณกรดไฟติก จากนั้นทำการทดสอบหมักจริงภายใต้สภาวะทั้งหมดที่ศึกษาได้นี้เพื่อเปรียบเทียบความแม่นยำของการทดลอง นอกจากนี้ตัวอย่างรำข้าวหมักที่ถูกเก็บขึ้นมาในแต่ละวัน ก็จะถูกนำมาวิเคราะห์ประเด็นอื่นๆ เพิ่มเติม ได้แก่

- การเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้หมักด้วย โดยหากใช้แบคทีเรียและยีสต์จะทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตแต่หากใช้เชื้อราในการหมัก จะวัดการเจริญด้วยการวิเคราะห์ปริมาณ glucosamine
- กิจกรรมเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ ของ cellulase, xylanase, esterase, protease และ phytase (Wongputtisin et al., 2012)
- ปริมาณกรดไฟติก โดยใช้ชุด kit (Megazyme)

ตารางที่ 8 ค่าพารามิเตอร์ของการศึกษาแต่ละระดับปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย

| Variables | Parameter | Range and levels | | |
|-----------|--|------------------|-------|-------|
| | | -1 | 0 | 1 |
| A | ความชื้น (dry basis (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)) | 50 | 75 | 100 |
| B | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 25 | 35 | 45 |
| C | ปริมาณหัวเชื้อ (cfu ต่อกรัม หรือ สปอร์ต่อกรัม) | 4 log | 5 log | 6 log |

ตารางที่ 9 แผนการทดลอง Box-Behnken design สำหรับ 3 ปัจจัย

| ชุดทดลอง (treatment) | ระดับที่ศึกษาแต่ละปัจจัย | | |
|-------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|
| | ความชื้น (X_1) | อุณหภูมิ (X_2) | ปริมาณหัวเชื้อ (X_3) |
| 1 | -1 | -1 | 0 |
| 2 | -1 | 1 | 0 |
| 3 | 1 | -1 | 0 |
| 4 | 1 | 1 | 0 |
| 5 | -1 | 0 | -1 |
| 6 | -1 | 0 | 1 |
| 7 | 1 | 0 | -1 |
| 8 | 1 | 0 | 1 |
| 9 | 0 | -1 | -1 |
| 10 | 0 | -1 | 1 |
| 11 | 0 | 1 | -1 |
| 12 | 0 | 1 | 1 |
| 13 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 0 | 0 | 0 |

3. การทดสอบเบื้องต้นในการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์

รำข้าวหมักที่หมักภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษานี้ได้ถูกนำมาทดสอบทำแห้งด้วยตู้อบลมร้อนโดยทำการทดลองเทียบอุณหภูมิทำแห้ง ที่ 60 70 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวิเคราะห์คุณภาพด้านต่างๆ จากนั้นศึกษาเปรียบเทียบการทำแห้งผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่องมือทำแห้งชนิดต่างๆ ได้แก่ ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) เครื่องต้นแบบจากคณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ตู้อบชนิดสูญญากาศ (Vacuum drying) เครื่องอบแห้งโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ (Microwave drier) และเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Dry) จากนั้นบดลดขนาดให้เป็นผงรำข้าวหมักและนำไปวิเคราะห์คุณภาพด้านต่างๆ เปรียบเทียบกัน ได้แก่ ปริมาณฟอสเฟตอิสระ (available phosphate) ด้วย Fiske and Subbarow method (Kim et al., 1998) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS scavenging activity โดยดัดแปลงจากวิธีของ (Re et al., 1999) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดย dinitrosalicylic acid (DNS) method (Miller et al., 1959) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ด้วย Phenol-sulfuric acid method (BeMiller et al., 2010) และ วิเคราะห์โปรตีนที่ละลายน้ำได้ด้วย Bradford assay method (Hammond et al., 1988).

4. การศึกษาความเป็นไปได้ในการขยายขนาดการผลิต

ทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการขยายขนาดการผลิต การศึกษาในขั้นตอนนี้จึงทำการทดลองขยายการผลิตที่ปริมาณรำข้าว 1 กิโลกรัมต่อ 1 ถาด โดยใช้สภาวะการผลิตที่ศึกษาได้จากขั้นตอนก่อนหน้า นำไปวิเคราะห์คุณภาพด้านต่างๆ เปรียบเทียบกัน ได้แก่ ปริมาณฟอสเฟตอิสระ (available phosphate) ด้วย Fiske and Subbarow method (Kim et al., 1998) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS scavenging activity โดยดัดแปลงจากวิธีของ (Re et al., 1999) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดย dinitrosalicylic acid (DNS) method (Miller et al., 1959) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ด้วย Phenol-sulfuric acid method (BeMiller et al., 2010) และ วิเคราะห์โปรตีนที่ละลายน้ำได้ด้วย Bradford assay method (Hammond et al., 1988).

5. การทดสอบคุณภาพของรำข้าวหมัก

รำข้าวหมักที่ผลิตด้วยกระบวนการจากขั้นตอนที่ 2 จะถูกทำแห้งและนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส (สภาพแห้ง) จากนั้นเก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์เป็นเวลา 8 สัปดาห์แล้วนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบและคุณสมบัติต่างๆ ดังนี้

- ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

- ปริมาณฟอสเฟตอิสระด้วยวิธี Fiske and Subbarow method (Kim et al., 1998)
- ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic compounds) (Schmidt et al., 2014)
- ปริมาณสาร ferulic acid และสารประกอบฟีนอลิกบางชนิด ด้วยเครื่อง HPLC (Razak et al., 2015)
- Proximate analysis ได้แก่ โปรตีนหยาบ ไขมันรวม เส้นใย (AOAC)
- ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด ด้วยวิธี Bradford
- การกระจายตัวของขนาดโมเลกุลโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Zhang et al., 2012)

6. วิธีวิเคราะห์

6.1 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid method (BeMiller et al., 2010) วิเคราะห์ได้โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 98 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ในตู้ดูดควันโดยจับเวลา 10 นาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วในอุณหภูมิต่ำและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้กลูโคสเป็นสารมาตรฐาน

6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี dinitrosalicylic acid (DNS) method (Miller et al., 1959) วิเคราะห์ได้โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตสารละลาย DNS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไป 4 มิลลิลิตร และนำวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรโดยนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้ กลูโคสเป็นสารมาตรฐาน

6.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS scavenging activity โดยดัดแปลงจากวิธีของ (Re และคณะ, 1999) เตรียมสารละลาย ABTS^{•+} ความเข้มข้น 14 มิลลิโมลลาร์ และเตรียมสาร Potassium persulphate ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลลาร์ ผสมสารละลาย ABTS^{•+} ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 12-16 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าการดูดกลืนแสง 0.700 ± 0.003 ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ผสมกับ

สารละลาย ABTS⁺ 990 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและจับเวลา 1 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณ %scavenging activity โดยสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A_{734} \text{ ที่ } 0 \text{ นาที} - A_{734} \text{ ที่ } 1 \text{ นาที}}{A_{734} \text{ ที่ } 0 \text{ นาที}} \times 100$$

และเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐาน และเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ได้แก่ ascorbic acid, α -tocopherol และ β -hydroxy carboxylic acid (BHA)

6.4 การวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตอิสระ

วิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตอิสระด้วยวิธี Fiske and Subbarow method (Kim et al., 1998) วิเคราะห์ได้โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตกรดไตรคลอโรอะซีติก (trichloroacetic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และเติม color reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 55±0.5 องศาเซลเซียส 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 820 นาโนเมตร โดยนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานฟอสเฟต โดยใช้ KH₂PO₄ เป็นสารมาตรฐาน

6.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ด้วย Bradford assay method (Hammond et al., 1988) วิเคราะห์ได้โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตสารละลาย Bradford ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ประมาณ 15 นาที แต่ต้องไม่เกิน 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีน โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน

6.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic compounds)

การหาปริมาณฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยดัดแปลงจาก Schmidt et al. (2014) วิเคราะห์ได้โดยการปิเปตสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ผสมกับรีเอเจนต์ Folin-Ciocalteu เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ในอุณหภูมิห้อง จากนั้นปิเปตสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) ความเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิเป็นเวลา 10 นาที ในที่มืด หลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความ

ยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานซึ่งเตรียมจากสารละลาย gallic acid ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารตัวอย่างแห้ง

6.7 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

6.7.1 เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) และไซลานเนส (xylanase)

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โดยใช้ Carboxymethylcellulose (CMC) เป็นสับสเตรทในการทดสอบกิจกรรม (ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 w/v ในสารละลาย Citric buffer ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลลาร์ pH 4.8) วัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยปิเปตสารละลายสับสเตรท 500 ไมโครลิตร ผสมกับตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 0.5 องศาเซลเซียส 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ต้มเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไป 4 มิลลิลิตร และนำวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้คำนวณเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบกับน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) จากนั้นคำนวณในปริมาณของเอนไซม์ในรูปของค่ากิจกรรมเอนไซม์ โดยกำหนดให้นิยามของกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ย่อย carboxymethylcellulose และปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะทดสอบ

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสมีขั้นตอนเช่นเดียวกับเอนไซม์เซลลูเลสแต่ใช้ไซแลน (birchwood xylan) เป็นสับสเตรทแทน และกำหนดนิยามของกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส 1 ยูนิตหมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ย่อยไซแลนและปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะทดสอบ ทั้งนี้คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเทียบกับน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน

6.7.2 เอนไซม์โปรติเอส (Protease)

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยใช้โปรตีนเคซีน (casein) เป็นสับสเตรทโดยปิเปตสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายเคซีนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (w/v) ที่ละลายใน 0.05 โมลลาร์ phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 0.5 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติกความเข้มข้น 0.4 โมลลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตสารละลายส่วนใส 250 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.4 โมลลาร์ ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Folin ciocalteau reagent 150 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นจากการย่อยของเอนไซม์โดยเทียบกับสารละลายไทโรซีน (tyrosine)

มาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) นิยามของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส 1 ยูนิตหมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสับสเตรทและปลดปล่อยกรดอะมิโน 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะทดสอบ

6.7.3 เอนไซม์ไฟเตส (Phytase)

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสโดยใช้สารละลาย sodium phytate เป็นสารสับสเตรท ทำการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้โดยปิเปตสารละลายเอนไซม์ 500 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย sodium phytate เข้มข้นร้อยละ 0.2 (w/v) ที่ละลายใน citrate buffer เข้มข้น 0.2 โมลลาร์ pH 5.5 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 0.5 องศาเซลเซียส 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายกรดไทโรคลอโรอะซีติกความเข้มข้นร้อยละ 10 (w/v) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตสารละลายส่วนใส 250 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.4 โมลลาร์ ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และผสมกับ Folin ciocalteau reagent 150 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร นำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณฟอสเฟตอิสระที่เกิดขึ้นจากการย่อยของเอนไซม์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม)

กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการปลดปล่อยฟอสเฟตอีนินทรีย์ 1 ไมโครโมล ภายใน 1 นาที ภายใต้สภาวะการทดลองที่ศึกษา

6.7.4 เอนไซม์เอสเทอร์เอส (Esterase)

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอร์เอส โดยใช้ 4-Nitrophenyl butyrate เป็นสารสับสเตรทวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทำได้โดยผสมสารละลายเอนไซม์ 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 4-Nitrophenyl butyrate ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ Phosphate-buffered saline buffer เข้มข้น 0.01 โมลลาร์ pH 7 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ตั้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 410 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณของเอนไซม์เอสเทอร์เอส โดยกำหนดให้ 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาย่อยสับสเตรท 4-Nitrophenyl butyrate แล้วทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ *p*-nitrophenol 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาทีในสภาวะที่กำหนด

6.8 วัดปริมาณการเจริญของเชื้อราด้วยวิธีกลูโคซามีน

วิธีวัดปริมาณกลูโคซามีนจากเซลล์ของเชื้อรา โดยดัดแปลงจากวิธีของ Van de Loo (1976) และ Cochran and Verceletti (1978) โดยชั่งตัวอย่างอบแห้งที่บดละเอียด 0.25 กรัม เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นความเข้มข้นร้อยละ 37 (w/w) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ดูดส่วนใส 2.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 1.0 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ น้ำเดือด นาน 2 ชั่วโมง ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 30 (w/v) และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร นำสารละลาย ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Acetyl acetone 1 มิลลิลิตร ต้มน้ำเดือด นาน 20 นาที เติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย Ehrlich reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร หาปริมาณกลูโคซามีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคซามีนที่ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

6.9 การกระจายตัวของขนาดโมเลกุลโปรตีน

วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Zhang et al., 2012) โดยการสกัดโปรตีนจากตัวอย่าง 10 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 300 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 rpm เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแยกเอาส่วนใสซึ่งเป็นสารละลายโปรตีนไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford ปรับความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายให้อยู่ระหว่าง 0.2 – 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยผสมสารละลายโปรตีนกับสารละลาย 4X sample buffer (0.5 tris-HCl pH 7.4, Glycerol, 10% SDS, bromophenol blue และ β -Mercaptoethanol) (อัตราส่วน 1:2) นำไปต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายผสมดังกล่าว 10 ไมโครลิตรลงในหลุมบนแผ่น polyacrylamide gel ความเข้มข้นร้อยละ 10 (w/v) ให้โปรตีนเคลื่อนในสนามไฟฟ้าที่ กำลังไฟ 150 V ย้อมสีโปรตีนโดยแช่แผ่นเจลในสารละลาย Coomassie blue R-250 เป็นเวลา ประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างสีส่วนเกินด้วย destaining solution จากนั้นอ่านผลและบันทึกผลจากแผ่นเจลที่เทียบกับ protein marker

6.10 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

วิเคราะห์ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) โดยเริ่มจากการสกัดสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Razak et al. (2015) ใช้ตัวอย่าง 1 กรัม ผสมกับสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 (w/v) ปริมาณ 20 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปเขย่าที่ 300 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กรองเก็บสารละลายส่วนใสด้วยกระดาษกรอง และทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง rotary evaporator นำมากรองผ่านเยื่อกรองชนิด syringe filter Nylon ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร (Labfil, China) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ประกอบด้วยคอลัมน์ชนิด Pinnacle C18 (4.6 × 250 mm, 5 µm; GL Sciences, Tokyo, Japan) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาทีปริมาตร ในการฉีดสาร 20 ไมโครลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส วัดค่าการดูดกลืนแสงโดย Diode array detector (DAD) ใช้ความยาวคลื่น 280 และ 325 นาโนเมตร โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ระบบแგრเดียนต์ในช่วงเวลา 0 – 40 นาที ใช้ mobile phase B ร้อยละ 80 และ mobile phase A ร้อยละ 20 ในการชะ ในขณะที่ 40 – 60 นาทีต่อมาใช้ mobile phase B ร้อยละ 60 และ mobile phase A ร้อยละ 40 ในการชะ โดย mobile phase A คือสารละลาย acetic acid ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ละลายในสารละลายเมทานอลและ mobile phase B คือสารละลาย acetic acid ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ละลายในน้ำ Milli Q (Mobile phase B) วิเคราะห์ผลเปรียบเทียบกับสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐานจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ vanillic acid, syringic acid, *p*-Coumaric acid, caffeic acid, trans-ferulic acid และ sinapic acid (Sigma-Aldrich, Thailand)

7. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

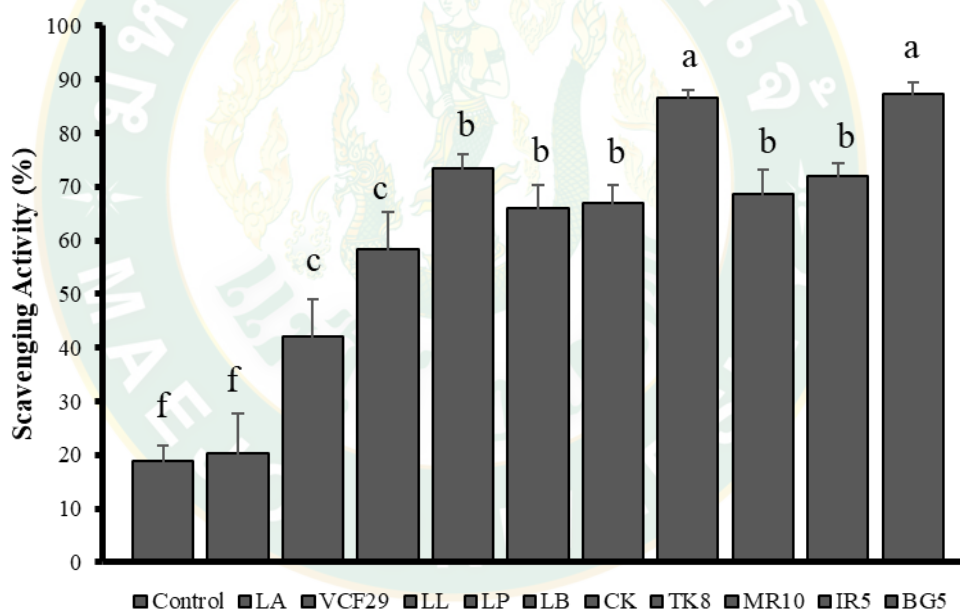
สถิติที่ใช้ในการวิจัยทำการทดลองอย่างน้อยสามซ้ำในแต่ละการทดลองจากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's new multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ STATISTIX[®] ในการวิเคราะห์ข้อมูล

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการหมักรำข้าว

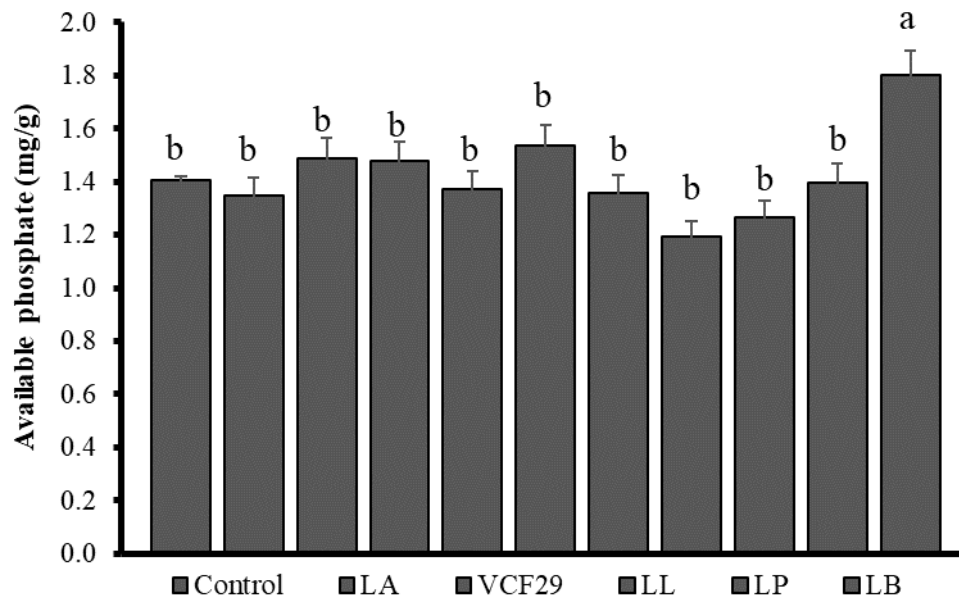
จากการรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์จากคลังเชื้อ โดยเปรียบเทียบการใช้แบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ ยีสต์ 1 สายพันธุ์ และเชื้อรา 1 สายพันธุ์ เพื่อการหมักรำข้าวในระดับห้องปฏิบัติการ การทดลองพบว่าแบคทีเรีย TK8 และเชื้อรา BG5 มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระประมาณร้อยละ 86 และร้อยละ 87 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกันดังภาพที่ 7 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณฟอสเฟตอิสระแล้วพบว่าจากการวิเคราะห์ทางสถิติ ดังภาพที่ 8 รำข้าวที่หมักด้วยเชื้อรา BG5 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนคุณภาพด้านอื่นๆ ของรำข้าวหมัก พบว่ารำข้าวหมักด้วยจุลินทรีย์ทุกสายพันธุ์มีปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ทั้งหมดใกล้เคียงกันในปริมาณ 88 – 117 mg/g (ภาพที่ 9) โดยจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่รำข้าวหมักด้วยเชื้อรา TK8 พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 10) ส่วนผลจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในรำข้าวหมักนั้น พบว่าจากการวิเคราะห์ทางสถิติ (ภาพที่ 11) รำข้าวหมักด้วยเชื้อรา BG5 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งจากผลการศึกษาดังกล่าวนี้นำให้ตัดสินใจเลือกเชื้อรา *R. microsporus* BG5 สำหรับใช้ในการผลิตรำข้าวหมักต่อไป จากผลการทดสอบจึงมีข้อสรุปในการเลือกใช้เชื้อรา *Rhizopus microsporus* BG5 (ดังภาพที่ 12) ในการหมักรำข้าว เนื่องจากมีความสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ในการทดลอง คือช่วยเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ชีวภาพในรำข้าวให้สูงขึ้น อีกทั้งช่วยกำจัด สารต้านโภชนาบางชนิดในรำข้าวได้ ซึ่งในกรณีของรำข้าวนี้พบว่ามี สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน (trypsin inhibitors) hemagglutinin-lectin และกรดไฟติก (Gul et al., 2015) สองชนิดแรกนั้นสามารถถูกกำจัดได้ด้วยความร้อนแต่การกำจัดกรดไฟติกต้องใช้เอนไซม์ไฟเตสในการย่อย ซึ่งทำให้ได้ฟอสเฟตอิสระออกมา ซึ่งนอกจากจะช่วยลดผลจากกรดไฟติกที่มีต่อสุขภาพแล้ว ยังทำให้ได้ฟอสเฟตที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายด้วย ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเชื้อรา BG5 ปลดปล่อยฟอสเฟตจากรำข้าวสูงที่สุดและคาดว่าจะเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสที่เชื้อรานี้ผลิตออกมา โดยจากรายงานของ Oliveira et al. (2010) พบว่าเชื้อราในสกุล *Rhizopus* บางสายพันธุ์ เช่น *R. oryzae*,

R. oligosporus และ *R. stolonifera* สามารถผลิตเอนไซม์ไฟเตส ไลเปส กลูโคส อะไมเลสและอื่นๆ ได้ ซึ่งก่อนหน้านี้ผู้วิจัยได้ทดสอบในห้องปฏิบัติการพบว่า *R. microsporus* สายพันธุ์ BG5 นี้สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และไซแลนเนสได้ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ล้วนมีประโยชน์ช่วยย่อยโครงสร้างเส้นใยของรำข้าวให้เป็นน้ำตาลที่มีขนาดเล็กและละลายน้ำได้ ซึ่งง่ายต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในทางเดินอาหารผู้บริโภคได้ ในขณะที่กลไกที่คาดว่าจะช่วยให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของรำข้าวสูงขึ้นได้คือการเพิ่มปริมาณขึ้นของเพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไทโรซีน เมเทโอนีน ฮิสทิดีน ไลซีน และทริพโตเฟน จากการย่อยของโปรตีนรำข้าวโดยเอนไซม์โปรติเอส เพปไทด์และกรดอะมิโนเหล่านี้ถูกรายงานว่ามีความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูง (Wang and De Meija, 2005)



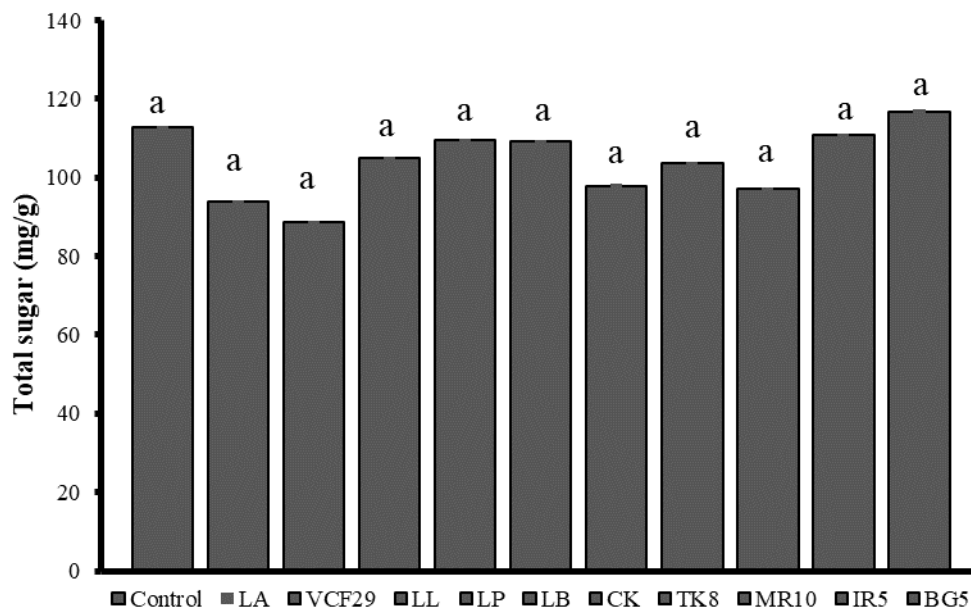
ภาพที่ 9 แผนภูมิแสดงความสามารถในการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS scavenging activity ของรำข้าวหมักด้วยจุลินทรีย์ต่าง ๆ

หมายเหตุ : พยัญชนะตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p < 0.05$)



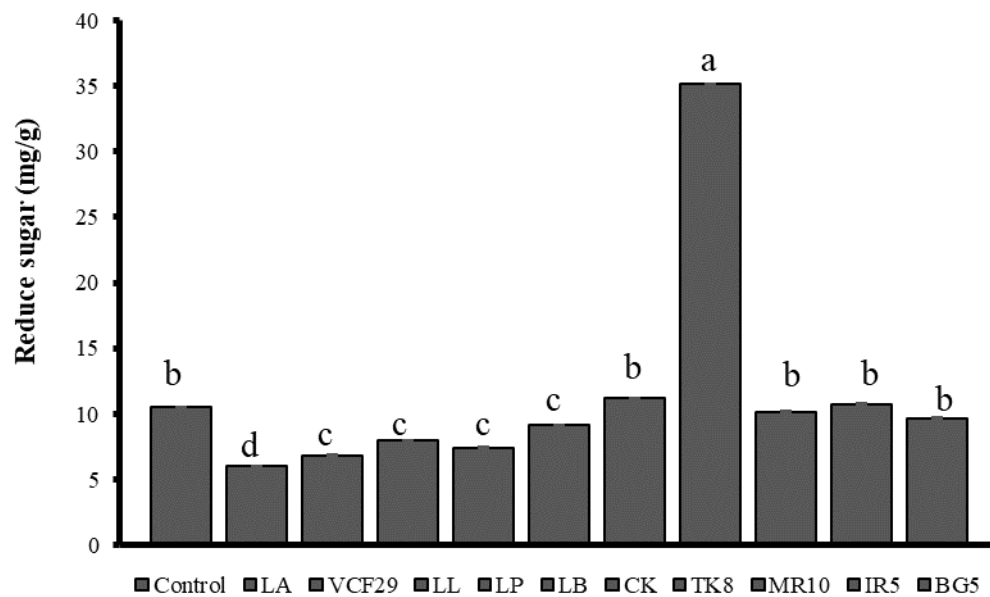
ภาพที่ 10 แผนภูมิแสดงปริมาณฟอสเฟตอิสระของรำข้าวหมักด้วยจุลินทรีย์ต่าง ๆ

หมายเหตุ : พืชพันธุ์ตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p < 0.05$)



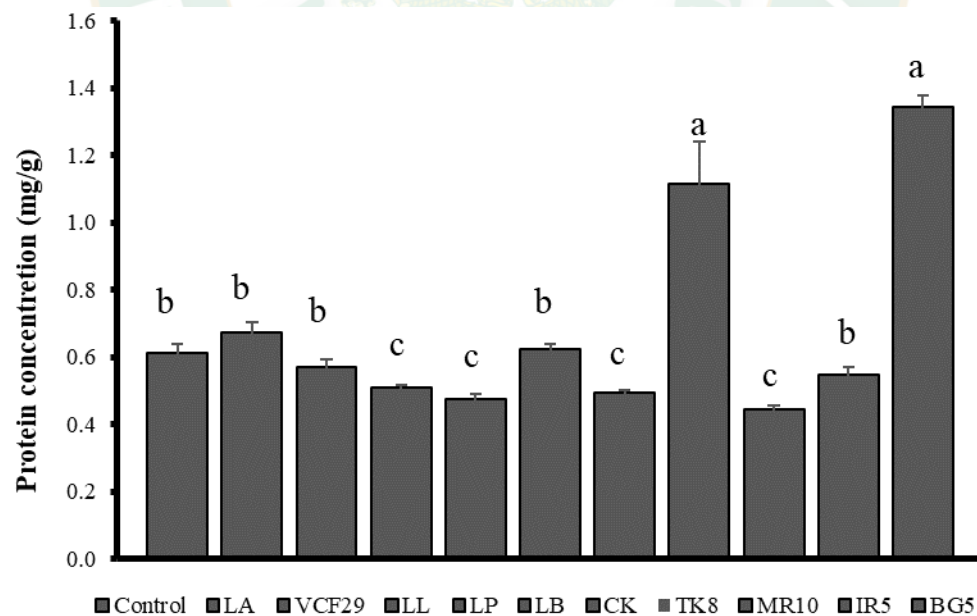
ภาพที่ 11 แผนภูมิแสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของรำข้าวหมักด้วยจุลินทรีย์ต่าง ๆ

หมายเหตุ : พืชพันธุ์ตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p < 0.05$)



ภาพที่ 12 แผนภูมิแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของรำข้าวหมักด้วยจุลินทรีย์ต่าง ๆ

หมายเหตุ : พืชพันธุ์ตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p < 0.05$)



ภาพที่ 13 แผนภูมิแสดงปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ของรำข้าวหมักด้วยจุลินทรีย์ต่าง ๆ

หมายเหตุ : พืชพันธุ์ตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p < 0.05$)



ภาพที่ 14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและรูปลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *Rhizopus microsporus* BG5 (A: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ, B: sporangium)

Scale bar= 10 μm

2. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักรำข้าว

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักรำข้าว โดยใช้แผนการทดลอง Box-Behnken design ชนิด 3 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณความชื้นแบบ dry basis (ร้อยละ 50-100) อุณหภูมิ (25-45 องศาเซลเซียส) และปริมาณหัวเชื้อ (4-6 log cfu ต่อกรัม หรือ สปอร์ต่อกรัม) พารามิเตอร์ที่ใช้วัดคุณภาพรำข้าวหมัก ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟอสเฟตอิสระในรำข้าวหมัก โดยข้อมูลที่ได้นำไปประมวลผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป พบว่าสามารถสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับการทำนายระดับของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟอสเฟตอิสระได้ โดยรูปแบบของสมการแสดงดัง สมการดังต่อไปนี้

$$Y_1 = 61.22 - 0.024 * A - 1.41 * B + 8.47 * C - 4.39 * A * B + 2.53 * A * C + 7.90 * B * C - 3.99 * A^2 - 4.22 * B^2 - 5.55 * C^2$$

$$Y_2 = 5.69 + 0.19 * A - 0.16 * B + 1.24 * C - 0.16 * A * B + 0.54 * A * C + 0.091 * B * C - 0.92 * A^2 - 1.05 * B^2 - 0.43 * C^2$$

เมื่อ Y_1 = ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Y_2 = ปริมาณฟอสเฟตอิสระ

โดยแทนที่ A = ปริมาณความชื้นแบบ dry basis

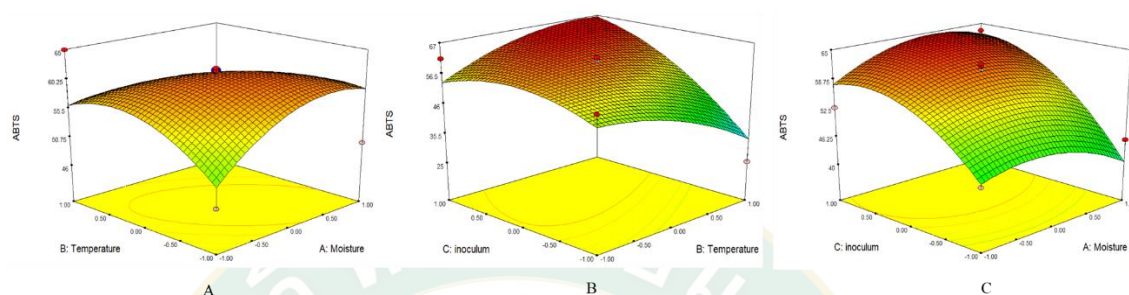
B = อุณหภูมิ

C = ปริมาณหัวเชื้อ

ข้อมูลจากการวิเคราะห์ ANOVA แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (model) และความสมบูรณ์ของแบบจำลอง (Lack of Fit) ที่มีระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ (significant) พบว่าปัจจัยที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟอสเฟตอิสระคือ ปริมาณหัวเชื้อ โดยจากการประมวลผลดังตารางที่ 10 และ ตารางที่ 11 พบว่าปัจจัยที่มีผลเชิงลบต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ อุณหภูมิ ($p < 0.615$) และปริมาณความชื้น ($p < 0.993$) เชิงบวกคือ ปริมาณหัวเชื้อ ($p < 0.015$) โดยแบบจำลองนี้มีค่า R-squared = 0.7560 และจากการทดสอบความสมบูรณ์ของแบบจำลอง (Lack of fit) แสดงให้เห็นว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ให้ความสมบูรณ์กับข้อมูล (P-Lack of fit < 0.05) ที่ระดับนัยสำคัญ ($p = 99.58$) หรือสมการที่ได้ อาจไม่มีความแม่นยำเพียงพอในการพยากรณ์ แต่จากการข้อมูลที่ได้นำไปประมวลผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปพบว่าจากการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์มี

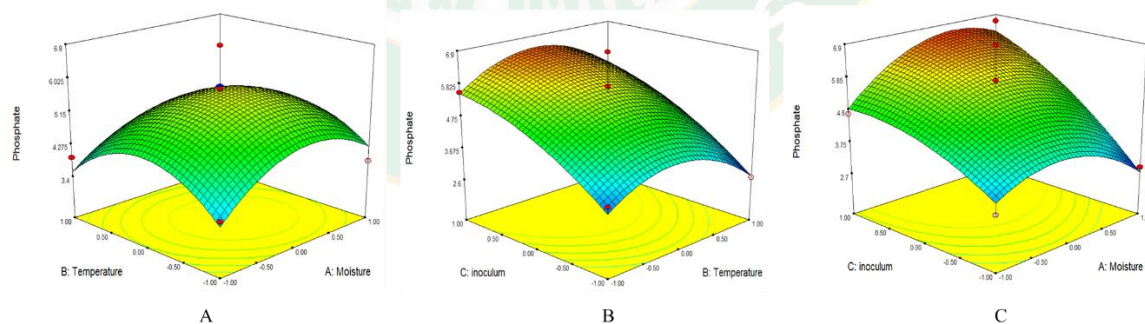
ความแม่นยำเพียงพอในการพยากรณ์ ส่วนปัจจัยที่มีผลเชิงลบของปริมาณฟอสเฟตอิสระ ดังตารางที่ 12 และ ดังตารางที่ 13 คือ อุณหภูมิ ($p < 0.505$) เชิงบวกคือ ปริมาณหัวเชื้อ ($p < 0.001$) และ ปริมาณความชื้น ($p < 0.413$) โดยแบบจำลองนี้มีค่า R-squared = 0.8974 และจากการทดสอบความสมรูปของแบบจำลอง (Lack of fit) แสดงให้เห็นว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ให้มีความสมรูปกับข้อมูล (P-Lack of fit > 0.05) ที่ระดับนัยสำคัญ ($p = 99.58$) หรือสมการที่ได้มีความแม่นยำเพียงพอในการพยากรณ์ นอกจากนี้จากการประมวลผลดังภาพที่ 13 และ 14 ของกราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ (Response Surface Quadratic Model) โดยจากการประมวลผลพบว่าในทางทฤษฎีแล้วสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักรำข้าวโดยใช้ความชื้นร้อยละ 33.6 อุณหภูมิ 35.9 องศาเซลเซียส และปริมาณหัวเชื้อ 6 log สปอร์ต่อกรัมรำข้าว พบว่าสามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและลดปริมาณกรดไฟติกได้สูงที่สุดเมื่อทำการทดลองเพื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี (ตารางที่ 14) พบว่าปริมาณฟอสเฟตในรำข้าวหมัก ทางทฤษฎีมีปริมาณฟอสเฟต 6.632 มิลลิกรัม/กรัมรำข้าว เมื่อทำการทดลองมีปริมาณฟอสเฟต 7.32 ± 0.08 โดยมีค่าคาดเคลื่อน ± 0.69 เนื่องจากค่าจากการทดลองมีค่าปริมาณฟอสเฟตสูงเมื่อบเทียบกับค่าทฤษฎีอาจเนื่องมาจากค่าปริมาณความชื้นและอุณหภูมิในอากาศที่เกิดจากความคลาดเคลื่อนของสิ่งแวดล้อมรอบข้าง ทำให้การวัดซ้ำจะได้ค่าที่แตกต่างกันไปในแต่ละครั้งของการทดลอง จากการศึกษา Ruengsri et al. (2018) ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสัดส่วนของกลุ่มเชื้อรา *Aspergillus oryzae* *Aspergillus awamori* และ *Monascus purpureus* เพื่อเพิ่มสารประกอบฟีนอลิกจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ โดยใช้การหมักแบบอาหารแข็ง ใช้การออกแบบ Box Behnken Design จากการทดลองพบว่าเชื้อราเจริญเติบโตสม่ำเสมอทั่วถึงตลอดระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ปริมาณความชื้นร้อยละ 55, pH เท่ากับ 5.5 และปริมาณหัวเชื้อ 6×10^7 สปอร์/กรัมของรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ โดยเชื้อรา *A. oryzae* และ *M. purpureus* ในสัดส่วนสัดส่วน 0.07 ถึง 0.93 เป็นสัดส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อราแบบผสม แต่พบว่า *A. awamori* ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเพิ่มสารประกอบออกฤทธิ์ รวมถึงจากการศึกษาของ Andhika Cahaya Titisan Sukma et al. (2021) การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนดิบในรำข้าวโดยใช้การหมักแบบอาหารแข็งด้วย *Rhizopus oryzae* ในถังหมักแบบถาด โดยใช้การออกแบบ central composite design (CCD) ศึกษา 3 ปัจจัย ได้แก่ ความหนาของชั้นรำข้าว (1 ถึง 3 เซนติเมตร) อุณหภูมิในการหมัก (28 ถึง 32 องศาเซลเซียส) และความเข้มข้นของสารอาหาร KH_2PO_4 (2 ถึง 6

กรัม/ลิตร) ผลของการศึกษาพบว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างความหนาของชั้นสเตรตและอุณหภูมิในการหมักมีผลอย่างมีนัยสำคัญมากที่สุดต่อการเสริมโปรตีนรวม โดยสามารถเพิ่มโปรตีนได้สูงสุดร้อยละ 62.51 ที่ความหนาของชั้นสเตรต 2 เซนติเมตร โดยใช้อุณหภูมิการหมัก 30 องศาเซลเซียส และความเข้มข้น KH_2PO_4 4 กรัม/ลิตร



ภาพที่ 15 กราฟสามมิติพื้นที่ผิวตอบสนองต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

- A. ความสัมพันธ์ของความชื้นและอุณหภูมิ
- B. ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและปริมาณหัวเชื้อ
- C. ความสัมพันธ์ของความชื้นและปริมาณหัวเชื้อ



ภาพที่ 16 กราฟสามมิติพื้นที่ผิวตอบสนองต่อปริมาณฟอสเฟตอิสระ

- A. ความสัมพันธ์ของความชื้นและอุณหภูมิ
- B. ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและปริมาณหัวเชื้อต่อ
- C. ความสัมพันธ์ของความชื้นและปริมาณหัวเชื้อ

ตารางที่ 10 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน สำหรับแบบจำลองการถดถอย

| Source | SS | DF | MS | F-value | Significant value (p-value) |
|-------------------------|-------|----|------|---------|--------------------------------|
| Model | 24.13 | 9 | 8.35 | 2.41 | 0.1295 |
| Residual | 40.76 | 7 | 7.39 | | |
| Lack of Fit | 39.07 | 3 | 3.02 | 7.46 | <0.0001 |
| Pure Error | 2.69 | 4 | 0.67 | | |
| Total | 66.89 | 16 | | | |
| R ² = 0.8974 | | | | | |

หมายเหตุ: SS= Sum of squares, DF= Degrees of freedom, MS= Mean square

ตารางที่ 11 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ประมาณการโดยแบบจำลองการถดถอย

| Independent variables (parameter) | Coefficient | Standard error | Significant value (p-value) |
|--------------------------------------|-------------|----------------|--------------------------------|
| Intercept | 61.22 | 3.39 | |
| A-Moisture | -0.024 | 2.68 | 0.9930 |
| B-Temperature | -1.41 | 2.68 | 0.6156 |
| C-inoculum | 8.47 | 2.68 | 0.0159 |
| AB | -4.39 | 3.79 | 0.2844 |
| AC | 2.53 | 3.79 | 0.5252 |
| BC | 7.90 | 3.79 | 0.0753 |

หมายเหตุ: มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ($p < 0.05$)

ตารางที่ 12 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน สำหรับแบบจำลองการถดถอย

| Source | SS | DF | MS | F-value | Significant value (p-value) |
|-------------|-------|----|------|---------|--------------------------------|
| Model | 90.02 | 9 | 2.67 | 6.81 | 0.0096 |
| Residual | 2.74 | 7 | 0.39 | | |
| Lack of Fit | 0.75 | 3 | 0.25 | 0.50 | 0.7008 |
| Pure Error | 1.99 | 4 | 0.50 | | |
| Total | 26.76 | 16 | | | |

$R^2 = 0.7560$

หมายเหตุ: SS= Sum of squares, DF= Degrees of freedom, MS= Mean square

ตารางที่ 13 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ประมาณการโดยแบบจำลองการถดถอย

| Independent variables (parameter) | Coefficient | Standard error | Significant value (p-value) |
|--------------------------------------|-------------|----------------|--------------------------------|
| Intercept | 5.69 | 0.28 | |
| A-Moisture | 0.29 | 0.22 | 0.4137 |
| B-Temperature | -0.16 | 0.22 | 0.5058 |
| C-inoculum | 1.24 | 0.22 | 0.0008 |
| AB | -0.16 | 0.31 | 0.6320 |
| AC | 0.54 | 0.31 | 0.1274 |
| BC | 0.091 | 0.31 | 0.7792 |

หมายเหตุ: มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ($p < 0.05$)

ตารางที่ 14 แผนภูมิแสดงปริมาณฟอสเฟตของรำข้าวหมัก

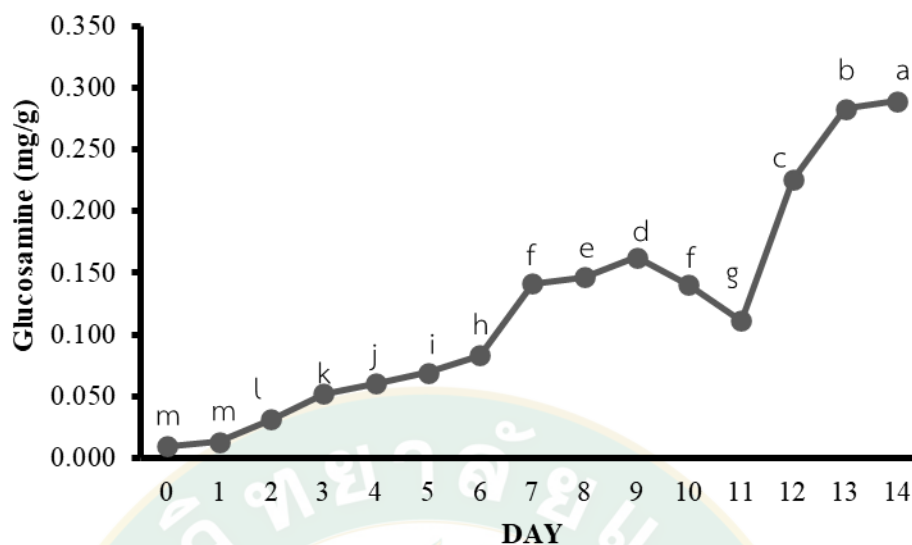
| ชุดการทดลอง | ปริมาณฟอสเฟตในรำข้าวหมัก | | | ปริมาณการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระในรำข้าวหมัก | | |
|-------------|--------------------------|-------------|--------------------|--|-------------|--------------------|
| | ค่าทางทฤษฎี | ค่าการทดลอง | ค่าความคลาดเคลื่อน | ค่าทางทฤษฎี | ค่าการทดลอง | ค่าความคลาดเคลื่อน |
| Max | 6.632 | 7.32±0.08 | ±0.69 | 64.947 | 61.59±8.24 | ±3.36 |
| Medium | 5.354 | 4.24±0.06 | ±1.11 | 25.3943 | 54.59±9.56 | ±0.92 |
| Min | 1.592 | 1.47±0.07 | ±0.12 | 62.2357 | 24.48±6.44 | ±7.65 |

3. ผลของระยะเวลาการหมักที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *R. microsporus* BG5

จากการวิเคราะห์เพิ่มเติมในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักรำข้าว ทางผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์การเจริญของเชื้อรา ในการหมักจะวัดการเจริญด้วยการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน และทำการศึกษากิจกรรมมอนไฮม์ต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก รวมถึงการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฟติกที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมัก จากการวิเคราะห์เบื้องต้นพบว่าการประมวลผล โดยใช้แผนการทดลอง Box-Behnken design พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักรำข้าว นั้นใช้ ความชื้นร้อยละ 33.6 อุณหภูมิ 35.9 องศาเซลเซียส และปริมาณหัวเชื้อ 6 log สปอร์ต่อกรัมรำข้าว จากนั้นทำการทดสอบหมักจริงภายใต้สภาวะทั้งหมดที่ศึกษาได้ โดยดูผลการเปลี่ยนแปลงจาก ระยะเวลาการหมัก 0-14 วัน

3.1 ผลการศึกษาปริมาณกลูโคซามีนจากเซลล์ของเชื้อรา

การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนจากเซลล์ของเชื้อรา *R. microsporus* BG5 พบว่าปริมาณ กลูโคซามีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่หมัก ดังภาพที่ 15 ในขณะที่ Chen and Chiou (1999) โดยพบว่าจากการทดลองวิเคราะห์เชื้อรา 6 ชนิด ได้แก่ *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Colletotrichum coccodes*, *Fusarium oxysporum*, *Geotrichum Candidum* และ *Rhizopus stolonifera* มีรายงานว่าปริมาณกลูโคซามีนโดยเฉลี่ยจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ ของเชื้อรา และจากรายงานของ Chen et al. (1999) ศึกษาปริมาณกลูโคซามีนจากเมล็ดถั่วลิสง โดยบ่มไว้เป็นเวลา 5 สัปดาห์เพื่อให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อราตามธรรมชาติ โดยทำการเก็บตัวอย่าง เป็นระยะๆ และนำไปตรวจวัดปริมาณกลูโคซามีน พบว่าปริมาณกลูโคซามีนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาใน การบ่มที่เพิ่มขึ้น



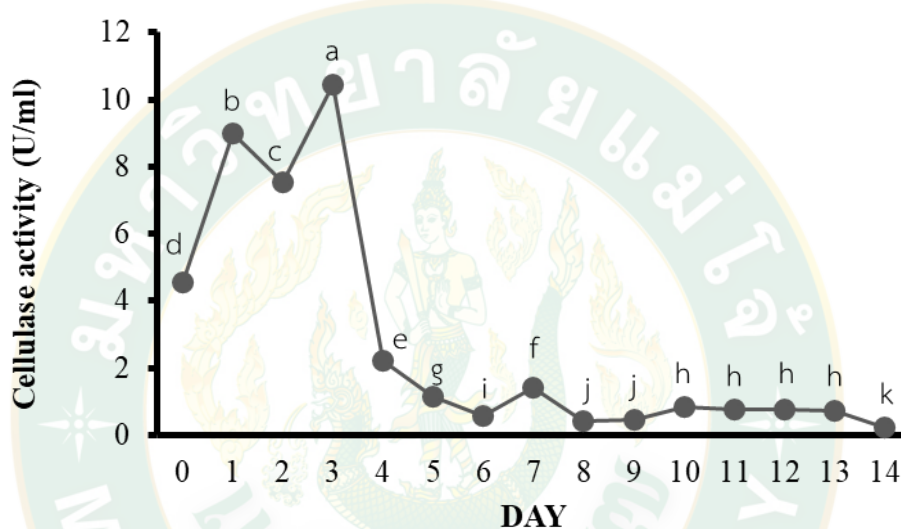
ภาพที่ 17 แผนภูมิแสดงปริมาณกลูโคซามีนจากเซลล์ของเชื้อรา *R. microsporus* BG5

หมายเหตุ : พยัญชนะตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p < 0.05$)

3.2 ผลของระยะเวลาการหมักที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

จากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักรำข้าวด้วยเชื้อรา *R. microsporus* BG5 จากการทดสอบหมักจริงภายใต้สภาวะทั้งหมดที่ศึกษาได้ พบว่าภายใต้สภาวะที่ศึกษานี้ เมื่อทำการวัดกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าแนวโน้มค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมักและมีแนวโน้มลดลงหลังจากการหมักที่ผ่านไปในช่วงระยะเวลาหนึ่ง โดยจากกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (ดังภาพที่ 18) พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส สูงที่สุดในวันที่ 3 ของการหมักถึง $10.43 (\pm 0.02)$ ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยเอนไซม์เซลลูเลสมีบทบาทในการย่อยรำข้าวได้ เนื่องจากรำข้าวเป็นแหล่งอุดมไปด้วยเส้นใยอาหารโดยรำข้าวพบว่ารำ 100 กรัม มีปริมาณใยอาหาร 15 กรัม โดยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนที่พบในผนังเซลล์ของพืช โดยจะทำให้ร่างกายของเราดูดซึมสารอาหารและย่อยได้ง่ายขึ้น จึงอาจช่วยลดปัญหาท้องผูก และช่วยลดการดูดซึมไขมันจากอาหาร ส่งผลให้ระดับคอเลสเตอรอลในเลือดลดลงได้ จากการศึกษาของ Trakarnpaiboon et al. (2017) การหมักแบบแข็งเพื่อผลิตเอนไซม์ในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้เชื้อ *R. microsporus* จากผลการทดลอง พบว่าส่วนผสมของสารตั้งต้นที่ประกอบด้วย รำข้าว: ชั่งข้าวโพด:มันสำปะหลัง:ขานอ้อย ในอัตราส่วน 8: 10: 2 กรัม สามารถผลิตเอนไซม์สูงสุดคือ 201.6 ยูนิตต่อกรัม โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมัก พบว่ามีความชื้นเริ่มต้น ร้อยละ 65, 35 องศาเซลเซียส , pH เริ่มต้น 6.0 และสปอร์ 5×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ซึ่งให้กิจกรรม

ของเอนไซม์สูงสุดถึง 389.5 ยูนิตต่อกรัม และจากรายงานของ Tang et al. (2012) จากการวิจัยพบเชื้อราสายพันธุ์ใหม่โดย สามารถระบุได้เป็น Zygomycotina, Phycomycetes, Mucorales, Mucoraceae และ *R. stolonifer* var. *reflexus* สายพันธุ์ TP-02 จากผลการทดลองพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) และผลิตเอนไซม์ Carboxymethyl cellulase (CMCase) ผลิตได้ถึง 7.56 ยูนิตต่อมิลลิตร และ 28.5 ยูนิตต่อมิลลิตร ตามลำดับ หลังจากการหมัก 96 ชั่วโมง



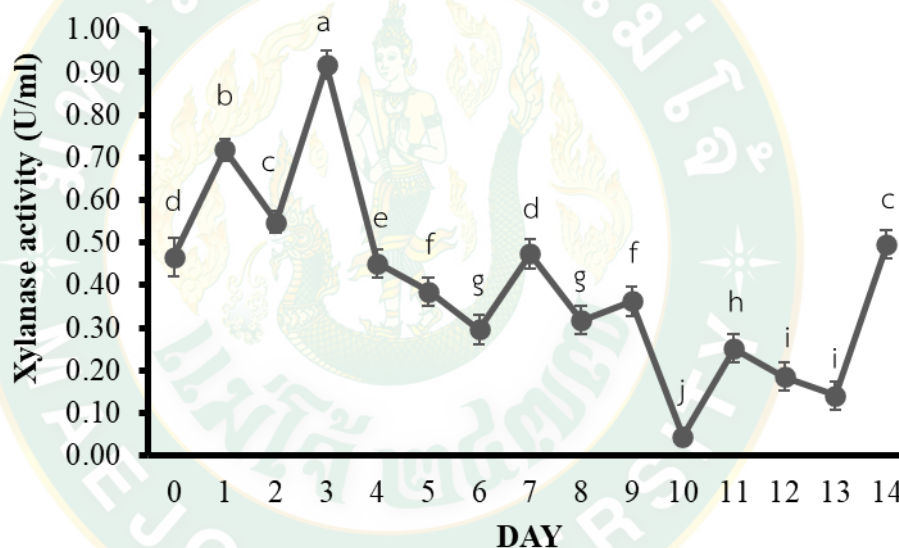
ภาพที่ 18 แผนภูมิแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการหมักรำข้าวด้วยเชื้อรา *R. microsporus* BG5

หมายเหตุ : พยัญชนะตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p < 0.05$)

3.3 ผลของระยะเวลาการหมักที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส

จากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักรำข้าวด้วยเชื้อรา *R. microsporus* BG5 จากการทดสอบหมักจริงภายใต้สภาวะทั้งหมดที่ศึกษาได้ พบว่าภายใต้สภาวะที่ศึกษานี้ เมื่อทำการวัดกิจกรรมเอนไซม์ไซแลนเนส พบว่าแนวโน้มค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมักและมีแนวโน้มลดลงหลังจากการหมักที่ผ่านไปในช่วงระยะเวลาหนึ่ง เอนไซม์ไซแลนเนสสามารถมีบทบาทสามารถย่อยรำข้าวได้ เอนไซม์ไซแลนเนสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยไซแลนซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนที่พบในผนังเซลล์พืช โดยจากกิจกรรมเอนไซม์ไซแลนเนส (ดังภาพที่ 19) พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์ไซแลนเนส สูงที่สุดในวันที่ 3 ของการหมักถึง $0.92 (\pm 0.03)$ ยูนิตต่อมิลลิตร

จากรายงานวิจัยของ Zhang et al. (2013) การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต เอนไซม์ไซลานเนส จากเชื้อรา *R. stolonifer* JS-1008 โดยทำการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน หาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้แผนการทดลอง central composite design (CCD) กำหนดตัวแปรเชิงปริมาณ 4 ตัวแปรที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ แหล่งไนโตรเจน ปริมาณความชื้นเริ่มต้น เกลืออนินทรีย์ และสารลดแรงตึงผิวการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ปริมาณความชื้น และแหล่งไนโตรเจน (ยูเรีย) ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ต่อการทำงานของไซลานเนส จากผลการทดลองพบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดประกอบด้วย ยูเรีย: 0.15, $ZnSO_4$: 0.022, tween-80: 0.08, ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 (กรัม/กรัม ซังข้าวโพดแห้ง) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมพบกิจกรรมของไซลานเนสสูงสุดที่ 13.90 หน่วยต่อกรัม ในวันที่ 10 ของการหมัก



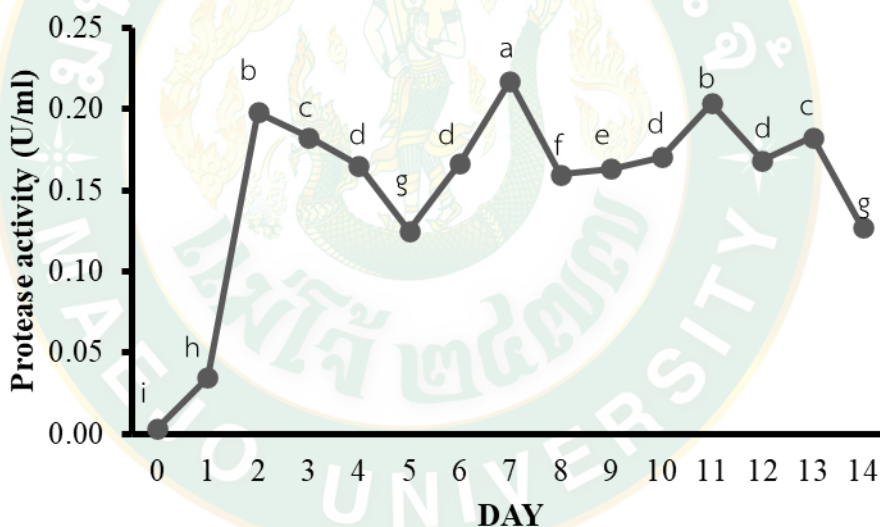
ภาพที่ 19 แผนภูมิแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จากการหมักรำข้าวด้วยเชื้อรา *R. microsporus* BG5

หมายเหตุ : พยัญชนะตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p < 0.05$)

3.4 ผลของระยะเวลาการหมักที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

จากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักรำข้าวด้วยเชื้อรา *R. microsporus* BG5 จากการทดสอบหมักจริงภายใต้สภาวะทั้งหมดที่ศึกษาได้ พบว่าภายใต้สภาวะที่ศึกษานี้ เมื่อทำการวัดกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส พบว่าแนวโน้มค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมักและมีแนวโน้มลดลงหลังจากการหมักที่ผ่านไปในช่วงระยะเวลาหนึ่ง โดยจาก

กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (ดังภาพที่ 20) พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส สูงที่สุดในวันที่ 2 ของการหมักถึง 0.19 (± 0.01) ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร รำข้าวประกอบด้วยโปรตีนซึ่งการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *R. microsporus* BG5 มีส่วนช่วยในการย่อยรำข้าวโดยสลายโปรตีนเป็นเปปไทด์และกรดอะมิโนให้มีขนาดเล็กลง ทำให้ร่างกายสามารถดูดซึมได้ง่ายขึ้นในระหว่างการย่อยอาหาร จากรายงานของสุนทร ปิติเจริญพันธ์ และคณะ (2549) ได้ทำการศึกษาหาวัสดุหมักที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยใช้ คือ รำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้า โดยใช้ปริมาณต้นเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ร้อยละ 0.3 แป้งสาลีร้อยละ 10 ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักร้อยละ 50 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าวัสดุหมักที่ผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าร้อยละ 25 : 75 ของน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง ให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงกว่าวัสดุหมักที่สัดส่วนอื่น ๆ โดยมีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุด คือ 936 ยูนิต์ต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้งในชั่วโมงการหมักที่ 96



ภาพที่ 20 แผนภูมิแสดงกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการหมักรำข้าวด้วยเชื้อรา *R. microsporus* BG5

หมายเหตุ : พยัญชนะตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p < 0.05$)

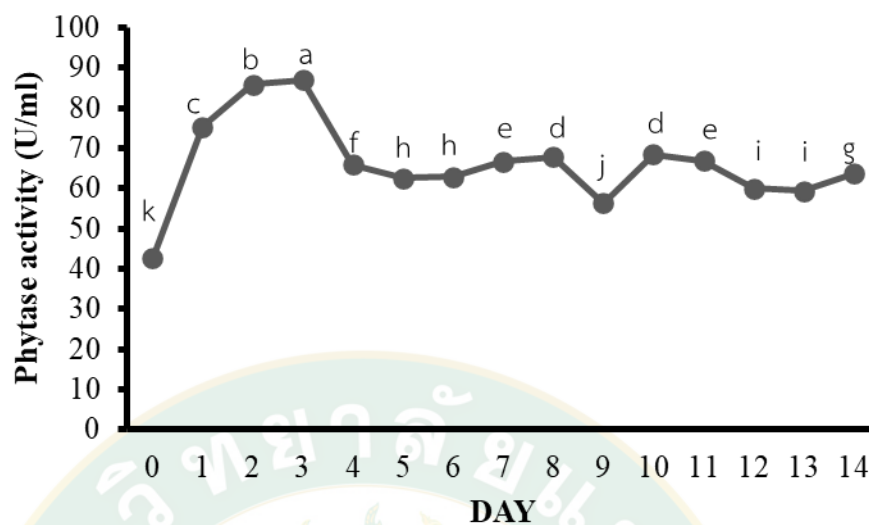
3.5 ผลของระยะเวลาการหมักที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส

จากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักรำข้าวด้วยเชื้อรา *R. microsporus* BG5 จากการทดสอบหมักจริงภายใต้สภาวะทั้งหมดที่ศึกษาได้ พบว่าภายใต้สภาวะที่ศึกษานี้ เมื่อทำการวัดกิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส พบว่าแนวโน้มค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลา

ในการหมักและมีแนวโน้มลดลงหลังจากการหมักที่ผ่านไปในช่วงระยะเวลาหนึ่ง โดยจากกิจกรรม เอนไซม์เซลลูเลส (ดังภาพที่ 21) พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส สูงที่สุดในวันที่ 2 ของการหมักถึง $86.95 (\pm 0.15)$ ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นที่ทราบกันว่าเชื้อรา *Rhizopus* spp. โดยเฉพาะ *R. oryzae* สามารถผลิตเอนไซม์ไฟเตสที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยรำข้าว โดยเอนไซม์ไฟเตสเป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์กรดไฟติก ส่งผลให้มีการปล่อยฟอสเฟตอนินทรีย์ โดยกรดไฟติกเป็นรูปแบบการกักเก็บฟอสฟอรัส ในเนื้อเยื่อพืช ส่วนหนึ่งของฟอสฟอรัสจะถูกเก็บไว้เป็นกรดไฟติกหรือไฟเตต ไฟเตตเป็นรูปแบบหลัก ในการกักเก็บฟอสฟอรัสในเนื้อเยื่อพืช แต่ร่างกายไม่สามารถดูดซึมสารอาหารได้ เนื่องจากไฟเตตจับ แคลเซียมที่มีวาเลนต์ต่างกัน เช่น แคลเซียม ทองแดง แมกนีเซียม เหล็ก แมงกานีส และสังกะสี เพื่อป้องกันการดูดซึมสารอาหารเหล่านี้ในลำไส้ แต่การสลายกรดไฟติกโดยไฟเตสทำให้เกิดอินซิทอลและ ฟอสเฟต ส่งผลให้ฟอสฟอรัสและแร่ธาตุบางชนิดสามารถดูดซึมได้มากขึ้น โดยมีรายงานวิจัย Rani and Ghosh (2011) ทำการศึกษาโดยใช้กากน้ำมันลินซีด (linseed oil) เป็นซับสเตรทในการผลิตไฟเตต ด้วยเชื้อรา *R. oryzae* ใช้วิธีการทางสถิติหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้แผนการทดลอง central composite design (CCD) ภายใต้การหมักแบบอาหารแข็ง พบว่าการผลิตไฟเตสโดยรวมเพิ่มขึ้น 8.41 เท่า โดยจากการทดลองกากน้ำมันลินซีดและรำข้าวสาลี (1: 1) สามารถผลิตไฟเตตได้สูงสุดถึง (17.68 ± 0.23) ยูนิตต่อกรัม) ที่ 96 ชั่วโมงหลังจากการหมัก ข้อเปรียบเทียบปริมาณไฟเตสจากการหมัก ซับสเตรทต่างๆ ด้วยเชื้อรา กลุ่ม *Rhizopus* spp. ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ปริมาณไฟเตสจากการหมักซับสเตรทต่างๆ ด้วยเชื้อรา กลุ่ม *Rhizopus* spp.

| สายพันธุ์เชื้อรา | ซับสเตรท | ปริมาณไฟเตสที่สามารถผลิตได้ | เอกสารอ้างอิง |
|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| <i>Rhizopus</i> spp. | กากน้ำมัน | 35 ยูนิตต่อกรัม | Ramachandran et al. (2005) |
| <i>Rhizopus oligosporus</i> | กากน้ำมันมะพร้าว | 14.29 ยูนิตต่อกรัม | Sabu et al. (2002) |
| <i>Rhizopus oligosporus</i> | รำข้าวสาลี | 39 ยูนิตต่อมิลลิลิตร | Haritha et al. (2009) |
| MTCC556 | | | |
| <i>Rhizopus oryzae</i> | ฟางข้าวผสมและกากถั่วเหลือง | 6.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร | Kanti and Sudiana (2018) |



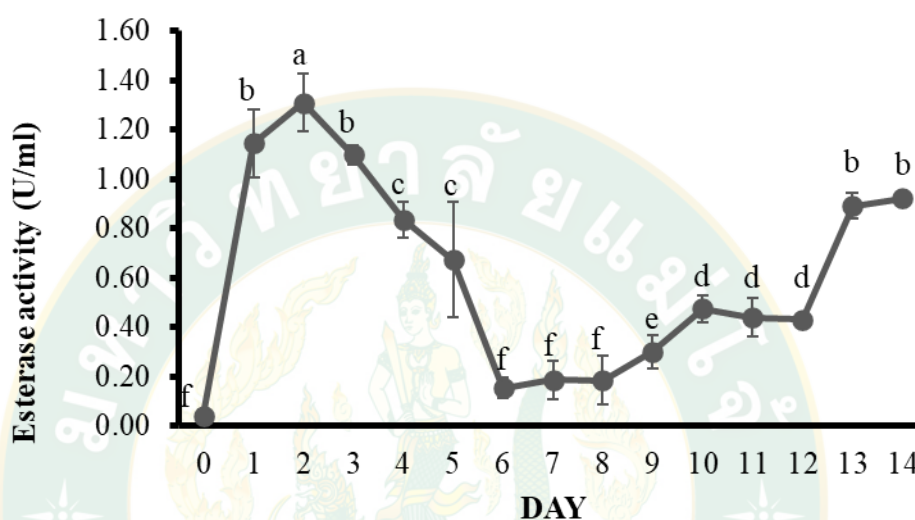
ภาพที่ 21 แผนภูมิแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสที่ได้จากการหมักรำข้าวด้วยเชื้อรา *R. microsporus* BG5

หมายเหตุ : พยัญชนะตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p < 0.05$)

3.6 ผลของระยะเวลาการหมักที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอร์เลส

จากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักรำข้าวด้วยเชื้อรา *R. microsporus* BG5 จากการทดสอบหมักจริงภายใต้สภาวะทั้งหมดที่ศึกษาได้ พบว่าภายใต้สภาวะที่ศึกษานี้ เมื่อทำการวัดกิจกรรมเอนไซม์เอสเทอร์เลสพบว่าแนวโน้มค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมักและมีแนวโน้มลดลงหลังจากการหมักที่ผ่านไปในช่วงระยะเวลาหนึ่ง โดยจากกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (ดังภาพที่ 22) พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์เอสเทอร์เลส สูงที่สุดในวันที่ 3 ของการหมักถึง $1.31 (\pm 0.12)$ ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร รำข้าวประกอบด้วยไขมันหลายชนิดในรูปของไตรกลีเซอไรด์ ฟอสโฟลิพิด และสารประกอบอื่นๆ ที่มีเอสเทอร์ เอสเทอร์เลส คือเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเอสเทอร์ เช่น การสลายโมเลกุลของไขมันและน้ำมัน เอนไซม์เอสเทอร์เลสอาจมีบทบาทในการย่อยรำข้าวโดยการทำลายพันธะเอสเทอร์ และเชื้อรากลุ่ม *Rhizopus* spp. โดยเฉพาะ *R. oryzae* เป็นที่ทราบกันดีว่าผลิตเอนไซม์หลายชนิด รวมถึงไลเปสและเอสเทอร์เลส ดังนั้นการผลิตเอสเทอร์เลสโดย *Rhizopus* spp. มีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการทางอุตสาหกรรมต่างๆ รวมถึงการผลิตอาหารและไบโอดีเซล และจากการศึกษาของ Vaseghi et al. (2013) การศึกษานี้เกี่ยวข้องกับการผลิตเอสเทอร์เลส ในการหมักแบบอาหารแข็งโดย *R. oryzae* จากชานอ้อย ผลิตไลเปสสูงสุดภายใต้สภาวะการหมักที่เหมาะสมหลังจากการบ่ม 72 ชั่วโมง กิจกรรมเอสเทอร์เลส สูงสุด 215.16

ยูนิตต่อกรัม รวมถึงรายงานวิจัยของ Cordova et al. (1998) กากน้ำมันมะกอกจากโมร็อกโก และ ชานอ้อย ถูกนำมาใช้เพื่อการผลิตเอสเทอร์สด้วยเชื้อรา *Rhizomucor pusillus* และ *R. rhizopodiformis* โดยผลิตเอสเทอร์สสูงสุด 1.73 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.97 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



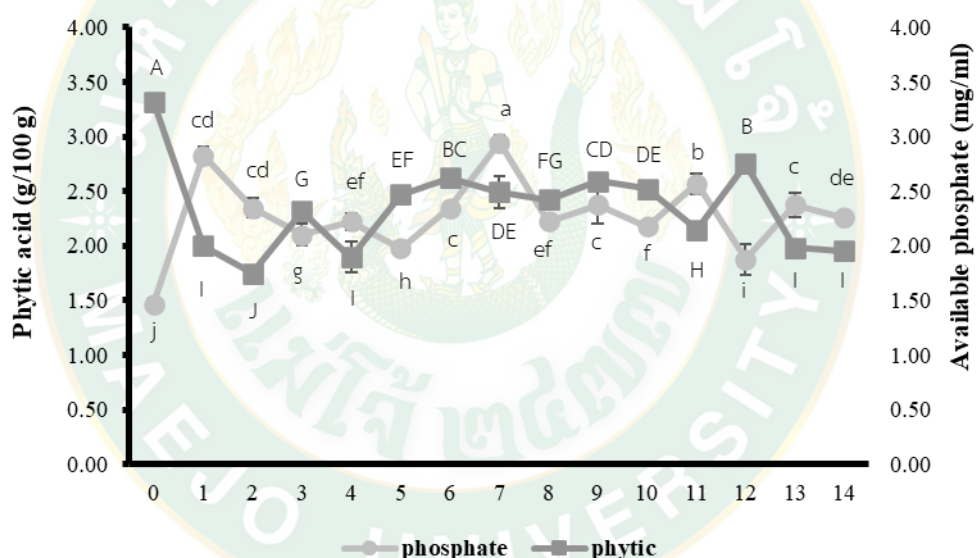
ภาพที่ 22 แผนภูมิแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอร์สที่ได้จากการหมักรำข้าว ด้วยเชื้อรา *R. microsporus* BG5

หมายเหตุ : พยัญชนะตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p < 0.05$)

3.7 ผลการศึกษาปริมาณกรดไฟติกของรำข้าวหมักด้วยเชื้อรา *R. microsporus* BG5

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฟติกและปริมาณฟอสเฟตอิสระที่ปลดปล่อยออกมา พบว่ารำข้าวหมักด้วยเชื้อรา *R. microsporus* BG5 จากการทดสอบหมักจริงภายใต้สภาวะทั้งหมดที่ศึกษาได้พบว่าภายใต้สภาวะที่ศึกษานี้ สามารถผลิตไฟเตสในการลดปริมาณกรดไฟติกจากผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณของปริมาณฟอสเฟตอิสระที่ปลดปล่อยออกมาและกรดไฟติกให้ผลสอดคล้องกันโดยพบว่าปริมาณกรดไฟติกลดลงหลังจากการหมักผ่านไป 24 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณฟอสเฟตอิสระที่ปลดปล่อยออกมาเพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 23 โดยการหมักสามารถลดกรดไฟติกได้ถึงร้อยละ 60.24 ภายหลังจากการหมัก 24 ชั่วโมง เนื่องจากไฟเตสเป็นเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลซ์กรดไฟติก และปลดปล่อยฟอสเฟตอนินทรีย์ออกมา กรดไฟติกมีคุณสมบัติเป็นสารต้านการดูดซึมแร่ธาตุ และเป็นสารต้านออกซิเดชันด้วย (Reddy and Sathe, 2001) ส่งผลให้สารอาหารที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ได้มีปริมาณลดลง

โดยที่รำข้าวมีกรดไฟติกหรือที่เรียกว่าอินซิทอล เฮกซะฟอสเฟต (IP6) กรดไฟติกเป็นรูปแบบการกักเก็บฟอสฟอรัสในพืช และมักพบในชั้นนอกของเมล็ดพืช เมล็ดพืช และรำข้าว เมื่อไฟเตสสลายกรดไฟติก ปริมาณกรดไฟติกโดยรวมในรำข้าวจะลดลง การลดลงนี้มีประโยชน์เนื่องจากช่วยเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และสังกะสี ซึ่งมักจับกับกรดไฟติก และในระหว่างการหมักช่วยเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุ ทำให้แร่ธาตุเหล่านี้ดูดซึมได้ง่ายขึ้นโดยระบบย่อยอาหาร และจากการศึกษาของ Liang et al. (2007) การหมัก Sourdough (30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง) นำไปสู่การลดกรดไฟติกร้อยละ 60 ในแป้งสาลีทั้งหมดด้วยการเพิ่มขึ้นของธาตุเหล็กและสังกะสีร้อยละ 30 ระหว่างการดูดซึมในร่างกายหนู หลังจากเร่งการหมัก 12 ชั่วโมงร้อยละ 60 ของกรดไฟติกในข้าวฟ่างก็เสื่อมสภาพ และยังพบว่า การแช่ การงอกและการหมักทำให้กรดไฟติกในข้าวกล้องลดลงแนวทางที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด สามารถลดกรดไฟติกได้ถึงร้อยละ 96 ของกรดไฟติกทั้งหมด (Liang et al., 2008)

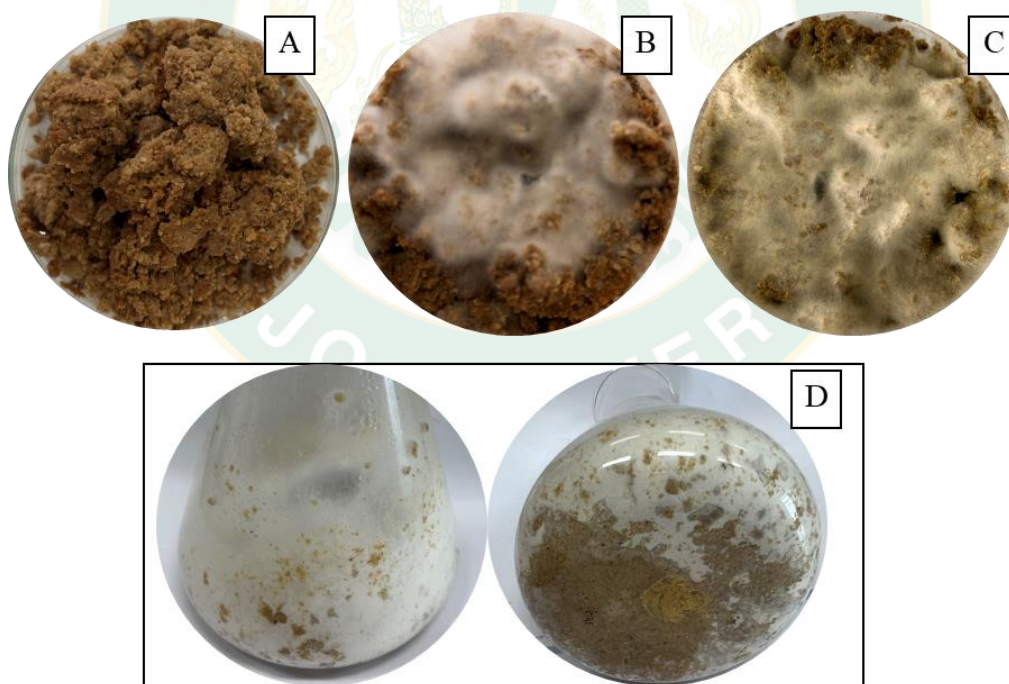


ภาพที่ 23 แสดงปริมาณกรดไฟติกของรำข้าวหมักด้วยเชื้อรา *R. microsporus* BG5

หมายเหตุ : พยัญชนะตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยปริมาณกรดไฟติก ($p < 0.05$)

พยัญชนะตัวพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของปริมาณฟอสเฟสอิสระ ($p < 0.05$)

จากการวิเคราะห์เบื้องต้นพบว่าการประมวลผล โดยใช้แผนการทดลอง Box-Behnken design พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักรำข้าวนั้นใช้ความชื้นร้อยละ 33.6 อุณหภูมิ 35.9 องศาเซลเซียส และปริมาณหัวเชื้อ 6 log สปอร์ต่อกรัมรำข้าว จากนั้นทำการทดสอบหมักจริง ภายใต้สภาวะทั้งหมดที่ศึกษาได้ พบผลของการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ พบว่ารำข้าวหมักด้วยเชื้อรา *R. microsporus* BG5 ให้กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส กิจกรรมเอนไซม์ไซแลนเนสและกิจกรรมเอนไซม์เอสเทอร์สสูงที่สุดในวันที่ 3 ของการหมักถึง 10.43 (± 0.02) 0.92 (± 0.03) และ 1.31 (± 0.12) ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร โดยให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสและกิจกรรมเอนไซม์ไฟเตสสูงที่สุดในวันที่ 2 ของการหมักถึง 0.19 (± 0.01) และ 86.95 (± 0.15) ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่หลังการหมักสามารถลดกรดไฟติกได้ถึงร้อยละ 60.24 ภายหลังจากหมัก 24 ชั่วโมง จากข้อมูลวิเคราะห์พบว่าระยะเวลาการหมักที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 2-3 วัน และจากภาพที่ 24 รำข้าวหมักในวันที่ 3 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา ระหว่างการหมักทั่วถึงและให้ผลของกิจกรรมเอนไซม์โดยเฉลี่ยที่สูงที่สุด พบว่าการหมักสามารถผลิตกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส กิจกรรมเอนไซม์ไซแลนเนสและกิจกรรมเอนไซม์ไฟเตสเพิ่มขึ้นได้ถึง 2 เท่า จากวันที่ 0 และยังสามารถผลิตกิจกรรมเอนไซม์เอสเทอร์ส กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสและเพิ่มขึ้นได้ถึง 18 และ 26 เท่าจากวันที่ 0



ภาพที่ 24 การเจริญของเส้นใยเชื้อราระหว่างการหมักของรำข้าวสลายในการหมักด้วยเชื้อ *R. microsporus* BG5 ในสภาวะการหมักความชื้นร้อยละ 33.6 อุณหภูมิ 35.9 องศาเซลเซียส และ ปริมาณหัวเชื้อ 6 log สปอร์ต่อกรัมรำข้าว

(A. รำข้าวหมัก 0 วัน B. รำข้าวหมัก 1 วัน C. รำข้าวหมัก 2 วัน D. รำข้าวหมัก 3 วัน)

4. ผลการศึกษาความเป็นไปได้ในการขยายขนาดการหมัก

จากผลการศึกษาความเป็นไปได้ในการขยายขนาดการหมัก การศึกษาในขั้นตอนนี้จึงทำการทดลองขยายการหมักจากระดับ 40 กรัม เป็นรำข้าว 1000 กรัมต่อ 1 ถาดสแตนเลส โดยมีการเจาะรูเพื่อให้มีการหมุนเวียนของอากาศและระบายความร้อนได้ดีขึ้น ดังภาพที่ 25 จากผลการทดลองพบว่าเชื้อราสามารถเจริญในรำข้าวทุกชุดการทดลองดังภาพที่ 26 โดยลักษณะทางกายภาพจากการสังเกตรำข้าวหมักในแต่ละถาดพบว่าขึ้นกึ่งกลางระหว่างรำข้าวหมักจะมีการเจริญของเชื้อราน้อยที่สุดอันเนื่องมาจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นเกิดขึ้นระหว่างการหมัก โดยชั้นกลางของรำข้าวมีอุณหภูมิสูงถึง 40-45 องศาเซลเซียส และภายหลังการหมักพบผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในชุดการทดลองที่หมักขนาด 1000 กรัม และ 40 กรัม มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระประมาณร้อยละ 86 และ 87 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกันดังภาพที่ 27 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณฟอสเฟตอิสระแล้วพบว่าจากการวิเคราะห์ทางสถิติดังภาพที่ 28 รำข้าวหมักขนาดเล็กมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตรวจพบปริมาณฟอสเฟตอิสระสูงกว่าการหมักขนาดใหญ่ถึงร้อยละ 42 ดังแสดงในภาพที่ 29A ส่วนคุณภาพด้านอื่นๆ ของรำข้าวหมัก พบว่าการหมักรำข้าวในชุดการทดลองขนาดเล็กเชื้อราสามารถย่อยเส้นใยโพลีแซคคาไรด์ของรำข้าวได้น้ำตาลทั้งหมดละลายออกมาในปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ละลายได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเชื้อราผลิตเอนไซม์หลายชนิด รวมถึงอะไมเลส เซลลูเลส และเฮมิเซลลูเลส ซึ่งไฮโดรไลซ์คาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน เช่น แป้ง เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ที่มีอยู่ในรำข้าวให้เป็นโมโนแซ็กคาไรด์และไดแซ็กคาไรด์ โดยทั่วไปรำข้าวหมักจะมีน้ำตาลประมาณร้อยละ 1 ถึง 2 โดยน้ำหนัก ปริมาณน้ำตาลนี้ส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลูโคส ซูโครส และฟรุคโตส โดยเป็นน้ำตาลที่ร่างกายสามารถดูดซึมได้ แต่ในขณะที่การหมักในถาดด้วยรำข้าวปริมาณ 1000 กรัม นั้น พบมีกลุ่มน้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้นมากกว่าการหมักในขนาด 40 กรัม ดังแสดงในภาพที่ 29B อาจเนื่องมาจากอุณหภูมิชั้นรำข้าวในการหมักขนาดใหญ่อยู่ที่ประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าที่หมักในขวดรูปชมพู่อย่างชัดเจน โดยอุณหภูมิที่สูงขึ้นนี้คาดว่าน่าจะเหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์กลุ่ม lignocellulose ของเชื้อราชนิดนี้มากกว่าที่อุณหภูมิห้อง จึงคาดว่าเป็นสาเหตุทำให้พบน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเป็นผลผลิตจากการไฮโดรไลซิสโดยเอนไซม์เหล่านี้มากขึ้น โดยสลายคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนในรำข้าวให้เป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยว เช่น กลูโคสและฟรุคโตส น้ำตาลที่มีขนาดเล็กลงนี้ทำให้เกิดผลดีในด้าน

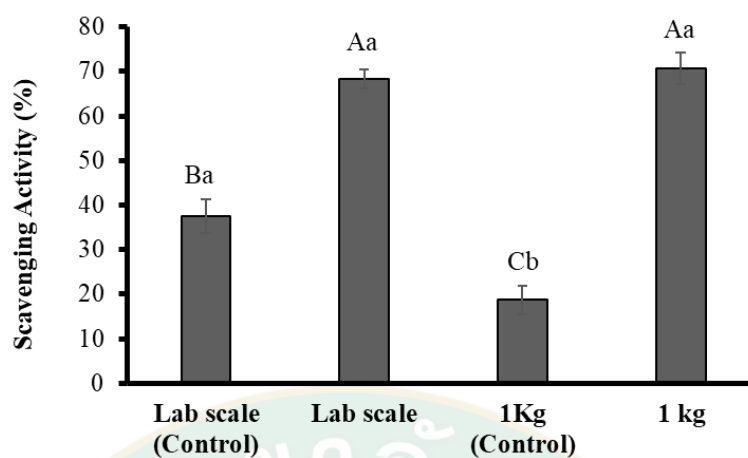
โภชนาการได้อีกด้วย อีกทั้งน้ำตาลกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์จากรำข้าวยังมีแนวโน้มเป็นสารพรีไบโอติกที่มีศักยภาพ และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วย ส่วนผลจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในรำข้าวหมักนั้น พบว่าจากการวิเคราะห์ทางสถิติ (ภาพที่ 29C) รำข้าวหมักด้วยเชื้อรา BG5 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากผลการทดลองทั้งหมดนี้พบว่ามีความเป็นไปได้ในการขยายกำลังการผลิตรำข้าวหมักในภาชนะขนาด 1 กิโลกรัม โดยมีความเป็นไปได้ในการนำไปพัฒนาต่อในระดับอุตสาหกรรมได้โดยควบคุมปัจจัยภายนอกในกระบวนการผลิต



ภาพที่ 25 ภาชนะที่ใช้ในการหมักรำข้าว และบริเวณห้องที่ใช้ในการหมักรำข้าว



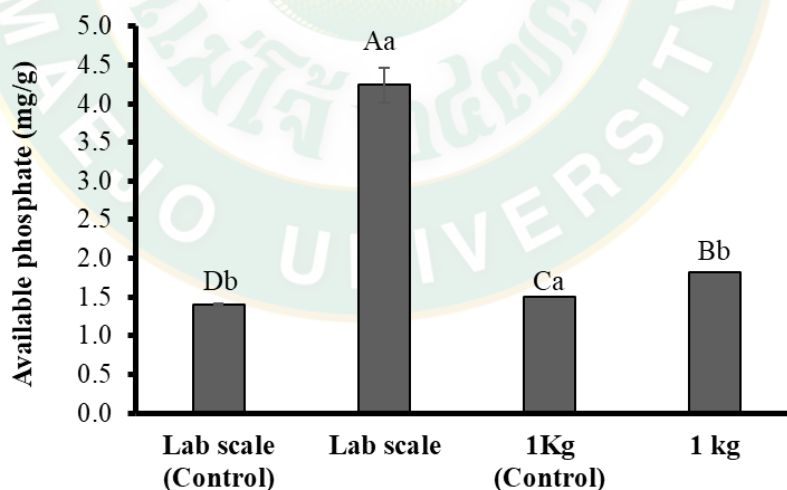
ภาพที่ 26 ลักษณะของรำข้าวหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. microsporus* BG5 ด้วยการหมักในขนาดต่างๆ



ภาพที่ 27 แผนภูมิแสดงความสามารถในการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS scavenging ของรำข้าวหมัก

หมายเหตุ : พืชพันธุ์ตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกันอย่างแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยปริมาณการหมัก ($p < 0.05$)

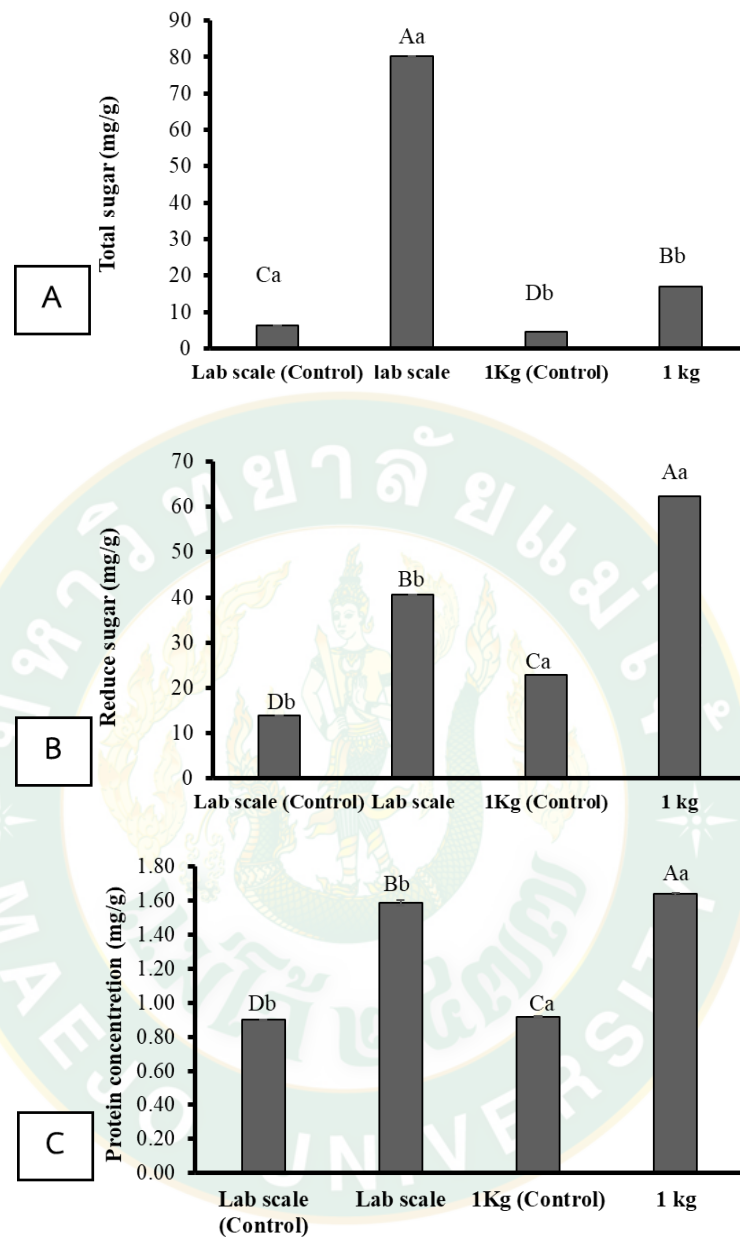
พืชพันธุ์ตัวพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันอย่างแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของปริมาณขนาดการทดลอง ($p < 0.05$)



ภาพที่ 28 แผนภูมิแสดงปริมาณฟอสเฟตของรำข้าวหมัก

หมายเหตุ : พืชพันธุ์ตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกันอย่างแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยปริมาณการหมัก ($p < 0.05$)

พืชพันธุ์ตัวพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันอย่างแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของปริมาณขนาดการทดลอง ($p < 0.05$)



ภาพที่ 29 แผนภูมิแสดงผลการทดสอบอื่น ๆ ของรำข้าวหมัก

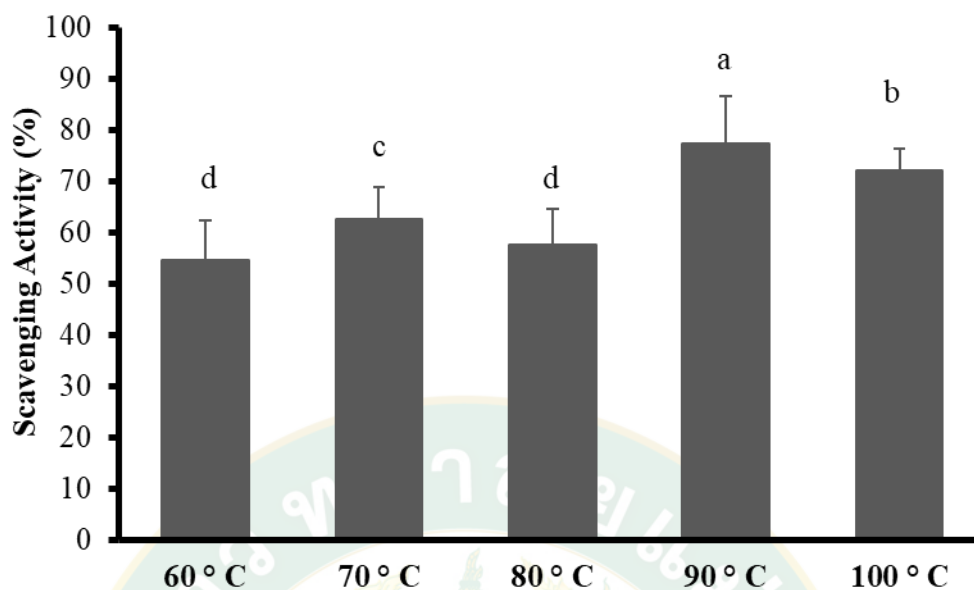
ก. ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ข. ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค. ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

หมายเหตุ : พืชขนาดเล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยปริมาณการหมัก ($p < 0.05$)

พืชนขนาดใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของปริมาณขนาดการทดลอง ($p < 0.05$)

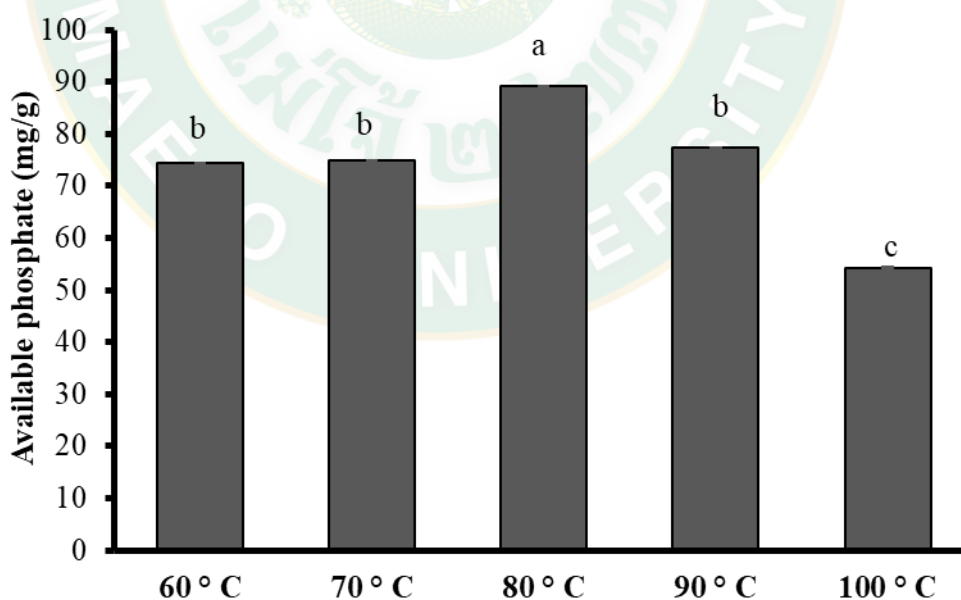
5. ผลของอุณหภูมิต่อการทำแห้ง

รำข้าวหมักที่หมักภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษานี้ได้ถูกนำมาทดสอบทำแห้งด้วยตู้อบลมร้อนโดยทำการทดลองเทียบอุณหภูมิทำแห้ง ที่ 60 70 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส จากนั้นเปรียบเทียบคุณภาพด้านต่างๆ ผลการศึกษาพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการอบที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียสมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำแห้งที่อุณหภูมิต่ำอื่น (ภาพที่ 30) ในขณะที่ปริมาณฟอสเฟตอิสระพบสูงสุดในผลิตภัณฑ์อบแห้งที่ 90 องศาเซลเซียส โดยพบในปริมาณ 77 mg/g แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลิตภัณฑ์จากการอบที่ 100 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 31) ปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ทั้งหมดมีค่าใกล้เคียงกันในทุกชุดการทดลอง (ภาพที่ 32) อย่างไรก็ตาม พบว่าเมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนที่ละลายได้กลับพบว่าการเพิ่มอุณหภูมิต่ำทำให้มีค่าลดลงโดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 33 และ 34) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนมีค่าลดลงเมื่อใช้อุณหภูมิสูงในการทำแห้งเช่นในช่วงอุณหภูมิ 80 - 100 องศาเซลเซียส ค่าที่ลดลงนี้คาดว่ามาจากการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์กับกรดอะมิโน โปรตีน หรือสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ โดยมีความร้อนเร่งปฏิกิริยา สารประกอบจากปฏิกิริยาเมลลาร์ดแม้ว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงดังปรากฏในผลการทดลอง ซึ่งแม้การทำแห้งที่อุณหภูมิสูงจะทำให้ได้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟอสเฟตสูงขึ้น แต่กลับทำให้สารอาหารอื่นลดลง ดังนั้นผู้วิจัยได้พิจารณาแล้วและตัดสินใจเลือกการทำแห้งรำข้าวหมักที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นระดับที่ยังคงปริมาณโปรตีนและน้ำตาลไว้ ในขณะที่ยวระดับของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระก็ไม่ได้ต่ำมากเกินไป และลักษณะของผงรำข้าวหมักที่ผ่านการทำแห้งและบดละเอียดแสดงดังภาพที่ 35



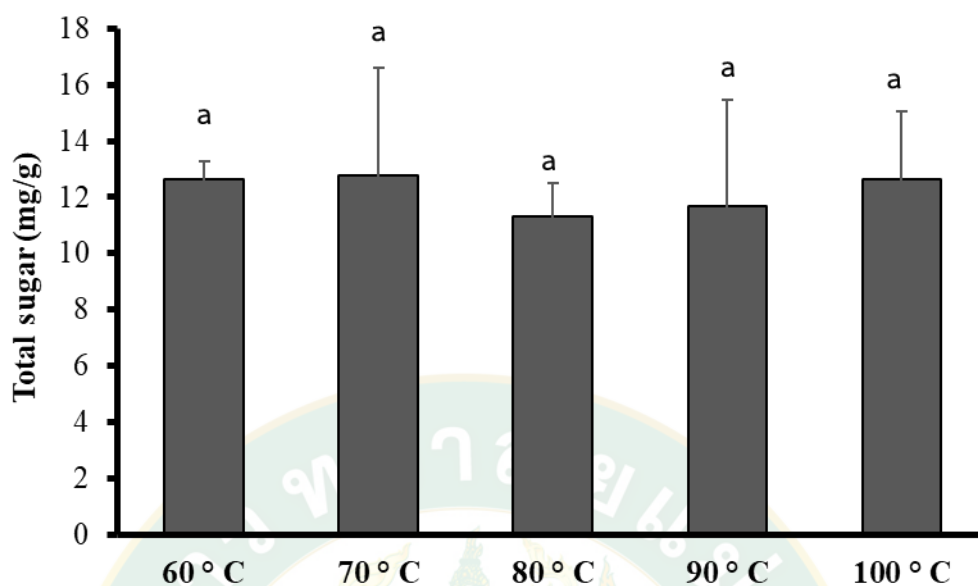
ภาพที่ 30 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในค่า scavenging activity ด้วยวิธี ABTS scavenging ในตัวอย่างรำข้าวหมักที่ ทำแห้งที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน

หมายเหตุ : พืชพันธุ์ตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p < 0.05$)



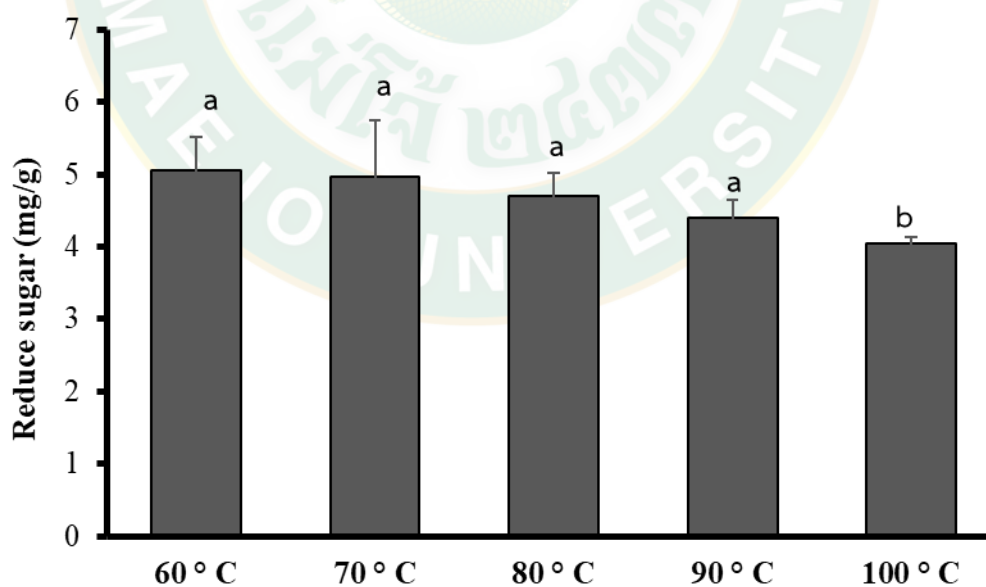
ภาพที่ 31 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตอิสระ (available phosphate) ในตัวอย่างรำข้าวหมักที่ ทำแห้งที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน

หมายเหตุ : พืชพันธุ์ตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p < 0.05$)



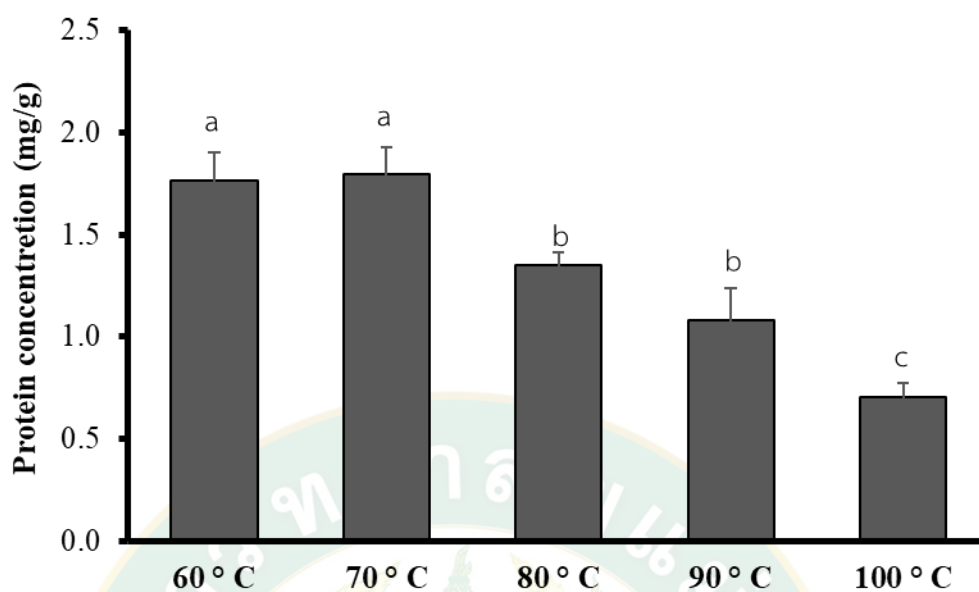
ภาพที่ 32 ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ละลายได้ (total soluble sugar) ในตัวอย่างรำข้าวหมักที่ทำแห้งที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน

หมายเหตุ : พยัญชนะตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p < 0.05$)



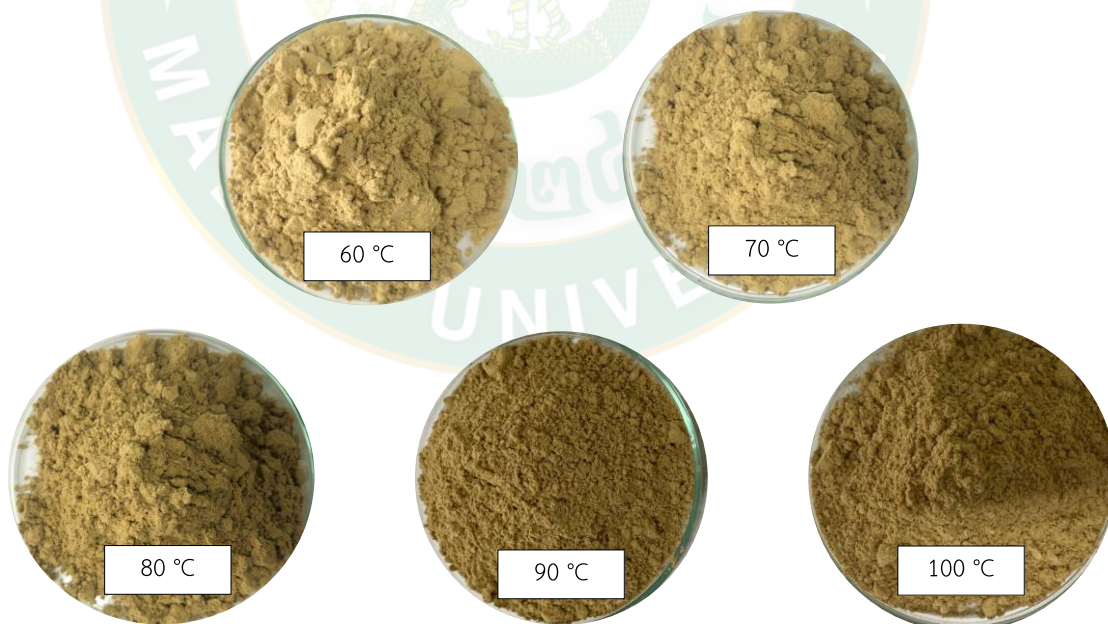
ภาพที่ 33 ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ละลายได้ (reducing sugar) ในตัวอย่างรำข้าวหมักที่ทำแห้งที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน

หมายเหตุ : พยัญชนะตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p < 0.05$)



ภาพที่ 34 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (soluble protein) ในตัวอย่างรำข้าวหมักที่ทำแห้งที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน

หมายเหตุ : พยัญชนะตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p < 0.05$)



ภาพที่ 35 แสดงลักษณะของผงรำข้าวหมักที่ผ่านการอบทำแห้งที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ

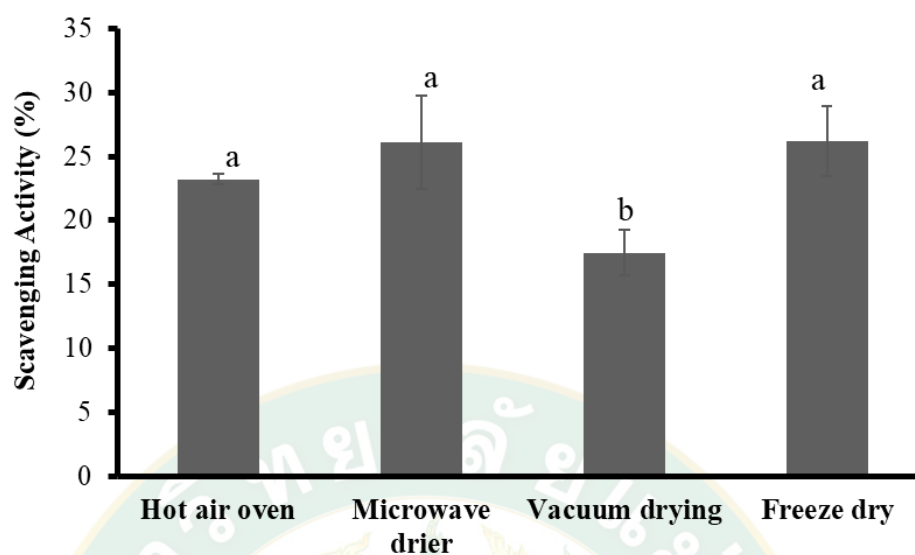
6. ผลการเปรียบเทียบการทำแห้งผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่องมือทำแห้งชนิดต่างๆ

ศึกษาเปรียบเทียบการทำแห้งผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่องมือทำแห้งชนิดต่างๆ ได้แก่ ตู้อบลมร้อน เครื่องปั่นแบบจากคณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ตู้อบชนิดสูญญากาศ เครื่องอบแห้งโดยใช้คลื่นไมโครเวฟและเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง จากผลการทดลอง ดังตารางที่ 16 พบว่าการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟพบว่าโดยมีความชื้นหลงเหลืออยู่ร้อยละ 4.93 โดยใช้ระยะเวลาในการอบแห้ง 20 นาที แต่ในระหว่างการอบมีกลิ่นไหม้ การอบแห้งโดยใช้คลื่นไมโครเวฟมักให้ความร้อนที่ไม่สม่ำเสมอจากคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ทำให้เกิดความร้อนขึ้นอย่างรวดเร็ว และทำให้ให้ผลิตภัณฑ์ที่ทำกรอบแห้งเกิดรอยไหม้ขึ้นได้ในบางตำแหน่งของผลิตภัณฑ์ (Zhang et al., 2006) รองลงมาคือ การอบด้วยตู้อบลมร้อน โดยมีความชื้นหลงเหลืออยู่ร้อยละ 5.80 โดยใช้ระยะเวลาในการอบแห้ง 22 ชั่วโมง การอบด้วยตู้อบชนิดสูญญากาศ และเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง มีความชื้นหลงเหลืออยู่ร้อยละ 37.65 และ 10.11 ตามลำดับ และใช้ระยะเวลาในการอบแห้งมากกว่า 24 ชั่วโมง และ 28 ชั่วโมง ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ในช่วงต้น พบว่าการอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน เครื่องอบแห้งโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ และเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง หลงเหลือความชื้นในผลิตภัณฑ์ อยู่ระหว่างร้อยละ 2-10 ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีแล้วโดยทั่วไปผลิตภัณฑ์ผงแห้งควรจะเหลือความชื้นในอาหารนั้นต่ำกว่าร้อยละ 10 เพราะการทำแห้งผลิตภัณฑ์เป็นการช่วยยืดอายุการเก็บรักษาการทำแห้งช่วยลดความชื้นในผลิตภัณฑ์ ทำให้มีความสามารถในการเก็บรักษานานขึ้น โดยลดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และสาเหตุการเสียหายที่เกิดจากความชื้น นอกจากนี้ยังช่วยรักษาคุณภาพและรสชาติของผลิตภัณฑ์ โดยไม่ส่งผลให้เกิดการเสียหายทางเคมีหรือการเปลี่ยนแปลงทางสัมผัส และจากการวิเคราะห์ด้านเคมีของผลิตภัณฑ์ พบว่าการอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน เครื่องอบแห้งโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ และเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งให้ผลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่มีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังภาพที่ 36 และจากภาพที่ 37 พบว่าการทำแห้งโดยใช้คลื่นไมโครเวฟสามารถปลดปล่อยออกมาฟอสเฟตอิสระได้สูงที่สุด โดยมีรายงาน Kamiloglu et al. (2016) พบว่า การทำแห้งมีผลทำให้ได้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟอสเฟตสูงขึ้น แต่กลับทำให้สารอาหารอื่นๆ ลดลง เนื่องจากความร้อน และอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้สารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดเสียสภาพไป และยังพบว่าความร้อนยังมีผลต่อเอนไซม์ไฟเตส โดยไฟเตสสามารถทนความร้อนต่อการย่อยสลายจากการปรุงอาหารได้ในระดับหนึ่ง แต่ในทางกลับกันไฟเตสจากพืชนั้นทนความร้อนได้ แต่หากสัมผัสกับอุณหภูมิสูงเป็นเวลานานอาจนำไปสู่การ

เสียสภาพและหยุดการทำงานของเอนไซม์ (Kumar et al., 2021) นอกจากนี้ยังมีข้อมูลประกอบในภาพที่ 38 พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดละลายออกมาในปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ละลายได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และยังมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีน ดังภาพที่ 39 และ 40 มีค่าลดลงที่มาจากเกิดการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด เกิดขึ้นระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์ กับกรดอะมิโน โปรตีน หรือสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ โดยมีความร้อนเร่งปฏิกิริยา ซึ่งทำให้คุณค่าทางโภชนาการลดลง จากผลข้างต้นจึงทำการเลือกวิธีการอบแห้งโดยใช้ตู้อบลมร้อนเนื่องจากสามารถคงคุณค่าทางโภชนาการและยังคงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและลดปริมาณกรดไฟติกได้สูง รวมถึงเป็นการลดต้นทุนในการผลิตผลิตภัณฑ์อีกด้วย

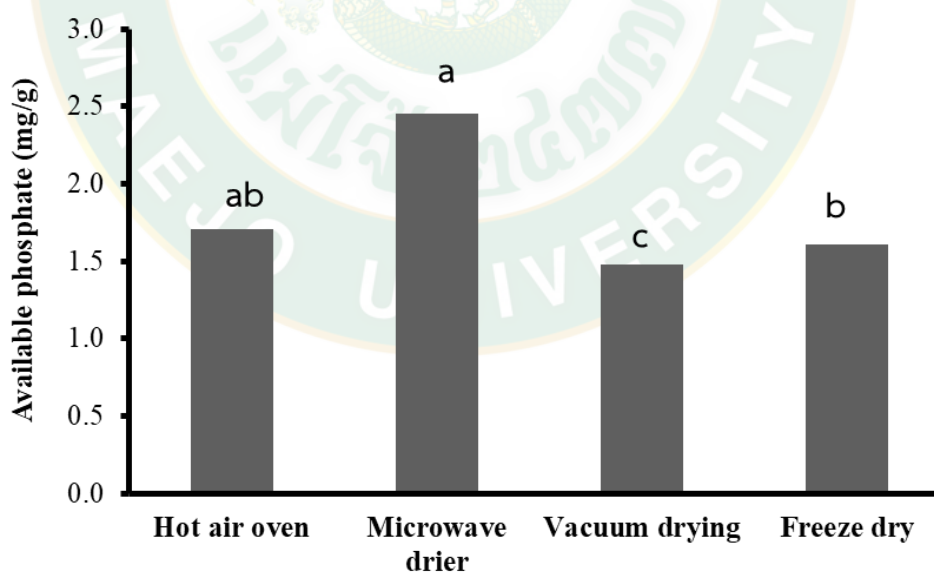
ตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์ความชื้นในผงรำข้าวหมักที่ผ่านการทำแห้งด้วยอุปกรณ์ต่างๆ

| เครื่องมือ | ปริมาณความชื้น (ร้อยละ) | ระยะเวลาที่ในการอบ |
|-----------------|-------------------------|--------------------|
| Hot air oven | 4.93±0.62 | 18 ชั่วโมง |
| Microwave drier | 5.80±0.41 | 20 นาที |
| Vacuum drying | 37.65±0.98 | 24 ชั่วโมง |
| Freeze dry | 10.11±3.20 | 28 ชั่วโมง |



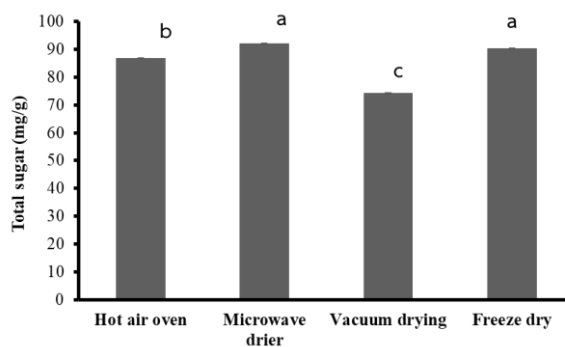
ภาพที่ 36 แผนภูมิแสดงผลการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระของรำข้าวหมัก

หมายเหตุ : พยัญชนะตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p < 0.05$)



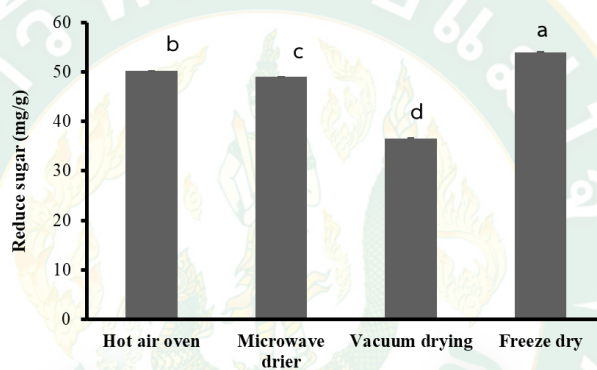
ภาพที่ 37 แผนภูมิแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตของรำข้าวหมัก

หมายเหตุ : พยัญชนะตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p < 0.05$)



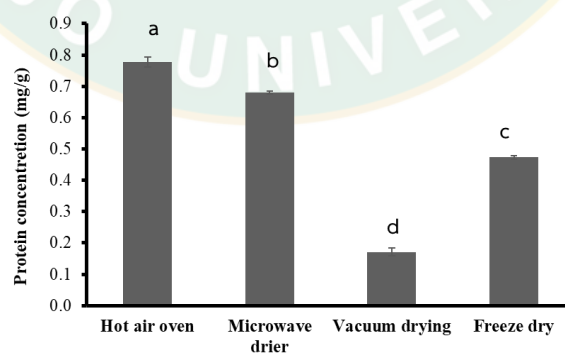
ภาพที่ 38 แผนภูมิแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ละลายได้ของรำข้าวหมัก

หมายเหตุ : พยัญชนะตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p < 0.05$)



ภาพที่ 39 แผนภูมิแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ละลายได้ของรำข้าวหมัก

หมายเหตุ : พยัญชนะตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p < 0.05$)



ภาพที่ 40 แผนภูมิแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของรำข้าวหมัก

หมายเหตุ : พยัญชนะตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p < 0.05$)

7. การทดสอบคุณภาพของรำข้าวหมัก

7.1 การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของรำข้าว

จากการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของรำข้าวที่ผ่านการหมัก โดยผลการวิเคราะห์รายงานผลการทดสอบโดยฝ่ายบริการห้องปฏิบัติการ สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ หมายเลขปฏิบัติการ 65/C-02742 ทำการส่งวิเคราะห์ ถั่ว ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และคาร์โบไฮเดรต คิดเป็นร้อยละ 11.64, 0.00, 11.71, 8.23, 14.05 และ 68.39 ตามลำดับ ดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 รายงานผลการทดสอบรำข้าวหมัก

| รายการทดสอบ | ผลการทดสอบ (กรัมต่อ 100 กรัม) | วิธีทดสอบ |
|--------------|-------------------------------|---------------------|
| ถั่ว | 11.64 | AOAC (2012), 942.05 |
| ความชื้น | 0.00 | AOAC (2012), 930.15 |
| โปรตีน | 11.71 | AOAC (2012), 991.20 |
| ไขมัน | 8.23 | AOAC (2012), 954.02 |
| เยื่อใย | 14.05 | AOAC (2012), 978.10 |
| คาร์โบไฮเดรต | 68.39 | By difference |

7.2 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)

ทำการศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในรำข้าว ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) โดยทำการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก 6 ชนิด ได้แก่ vanilic acid, caffeic acid, syringic acid, *p*-Coumaric acid, transferulic acid และ sinapic acid โดยในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในรำข้าว ดังตารางที่ 19 พบสารประกอบฟีนอลิก 3 ชนิด ทั้งในรำข้าวที่ไม่ผ่านการหมัก และรำข้าวหมักในระดับห้องปฏิบัติการ ได้แก่ *p*-coumatic acid, transferulic acid และ sinapic acid โดยมีปริมาณเฉลี่ยในรำข้าวที่ไม่ผ่านการหมัก 6.83, 60.36 และ 8.44 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ส่วนรำข้าวหมักในระดับห้องปฏิบัติการ 14.53, 99.09 และ 13.83 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ โดยจากผลการทดลองรำข้าวหมักขยายการผลิต (1 กิโลกรัมต่อภาค) พบสารประกอบฟีนอลิก 4 ชนิด ได้แก่ *p*-coumatic acid, transferulic acid, sinapic acid และ caffeic acid โดยมีปริมาณเฉลี่ย 17.22, 198.34, 13.57 และ 7.10 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ จากข้อมูลในการวิเคราะห์พบว่ารำข้าวที่ไม่ผ่านการหมัก ไม่พบ vanilic acid และ caffeic acid แต่พบ caffeic acid ในรำข้าวที่ผ่านการหมัก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Razak et al. (2015) แต่กลับตรงกันข้ามกับรายงานวิจัยของ Schmidt et al. (2014) ซึ่งตรวจพบสารประกอบเหล่านี้ในรำข้าวที่ไม่ผ่านการหมัก โดยการไม่พบกรดฟีนอลิกเหล่านี้ในการศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้สามารถอธิบายได้จากงานวิจัยของ Figueiredo et al. (2008) กล่าวว่าความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกในพืชขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ รวมถึงความแปรผันทางสรีรวิทยาและภูมิศาสตร์ สภาพแวดล้อม และพันธุกรรมของพืช นอกจากนี้ กิจกรรมจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักอาจส่งผลต่อระดับของสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมถึงกรดฟีนอลิกอย่างมีนัยสำคัญ (Hölker et al., 2004) การสลายโครงสร้างของผนังเซลล์ที่เกิดจากการหมักสามารถนำไปสู่การปลดปล่อยหรือการสังเคราะห์สารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ รวมถึงการผลิตเอนไซม์ต่างๆ มีบทบาทในการเพิ่มขึ้นของกรดฟีนอลิก (Zheng and Shetty, 2000) อย่างไรก็ตามการเกิดออกซิเดชันอาจทำให้ปริมาณกรดฟีนอลิกในตัวอย่างหมักลดลงได้เช่นกัน การเปลี่ยนแปลงโปรไฟล์ของกรดฟีนอลิกผ่านการหมักขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ รวมถึงประเภทของสารตั้งต้น สายพันธุ์เชื้อราเฉพาะที่ใช้ และสภาวะการหมักที่ใช้ (Martins et al., 2011) โดยสรุป

ความแปรผันของปริมาณกรดฟีนอลิกที่สังเกตได้ระหว่างรำข้าวที่ไม่หมักและรำข้าวหมักนั้นมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัยร่วมกัน รวมถึงลักษณะเฉพาะของพืช กิจกรรมของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมัก

ตารางที่ 18 รายงานผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

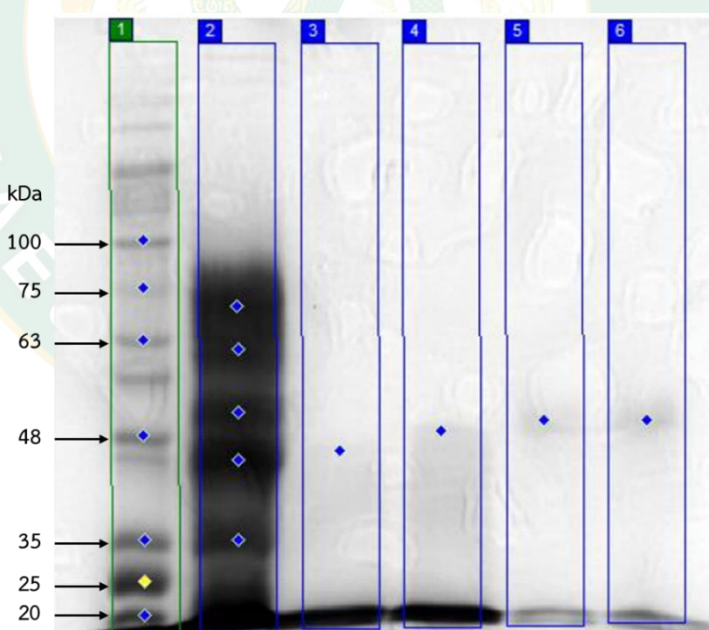
| ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (มิลลิกรัมต่อกรัม) | รำข้าวที่ไม่ผ่านการหมัก | รำข้าวหมักใน ห้องปฏิบัติการ | รำข้าวหมักขยายการผลิต (1 กิโลกรัมต่อถาด) |
|--|--------------------------|--------------------------------|---|
| Vanilic acid | ND | ND | ND |
| Caffeic acid | ND | ND | 7.10±0.96 ^a |
| Syringic acid | ND | ND | ND |
| <i>p</i> -Coumaric acid | 6.83 ± 1.68 ^b | 14.53 ± 0.98 ^a | 17.22±3.15 ^c |
| Transferulic acid | 60.36±1.63 ^b | 99.09 ± 1.26 ^a | 198.34±7.10 ^c |
| Sinapic acid | 8.44±1.87 ^b | 13.83 ± 1.28 ^a | 13.57±1.91 ^a |

หมายเหตุ: ^{a-c} ตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงว่ามีผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), ND = ไม่ตรวจพบ

7.3 ผลศึกษาการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ในผลิตภัณฑ์รำข้าวหมัก

ผลการศึกษารูปแบบของแถบโปรตีนด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) โดยพบว่ารำข้าวที่ไม่ผ่านการหมักในช่วงที่ 2 (ภาพที่ 41) มีขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่แยกได้กระจายตัวอยู่ในช่วงประมาณ 30-70 กิโลดัลตัน และหลังการหมักในช่วงที่ 3-6 พบว่ามีขนาดโมเลกุลของโปรตีนเปปไทด์อยู่ในช่วงประมาณ 45-50 กิโลดัลตัน ซึ่งรำข้าวที่ผ่านการหมักพบว่ามีความเล็กลง เมื่อเทียบกับรำข้าวที่ไม่ผ่านการหมัก โดยได้มีการส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์กรดอะมิโนอิสระ (free amino acid) เพิ่มเติมซึ่งมีผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่ารำข้าวที่ไม่ผ่านการหมักสามารถปลดปล่อยหมู่กรดอะมิโนอิสระออกมาได้ 34.20±0.17 mg/L ส่วนรำข้าวหมักระดับ 40 กรัม และ 1000 กรัม สามารถปลดปล่อยหมู่กรดอะมิโนอิสระออกมาได้ 93.85±5.69 และ 61.83±3.26 mg/L แสดงให้เห็นว่ากระบวนการหมักด้วยเชื้อรา *R. microsporus* BG5 สามารถย่อยโปรตีนจากรำข้าวด้วยเอนไซม์โปรติเอสในการผลิตเปปไทด์ได้ ทำให้โปรตีนในรำข้าวที่ถูกย่อยมีขนาดโปรตีนเล็กลง โดยเอนไซม์โปรติเอสจะตัดโมเลกุลของโปรตีนเป็นช่วงเล็กๆ ที่เรียกว่าเปปไทด์ ซึ่งเปปไทด์เหล่านี้มักจะมี

คุณค่าทางโภชนาการหรือมีคุณสมบัติที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย โดยเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้มีคุณสมบัติในการส่งเสริมสุขภาพต่างๆ เช่น ช่วยลดความดันโลหิต ฤทธิ์ต้านเบาหวาน ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Liu et al., 2019) โดยมีคณะวิจัยหลายท่านได้ศึกษาการผลิตเปปไทด์จากโปรตีนในรำข้าว โดยพบว่าผลการศึกษาดังกล่าวสามารถผลิตเปปไทด์จากโปรตีนรำข้าวได้ (Bandyopadhyay et al., 2008; Manfredini et al., 2021; Bisly et al., 2022) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนจากรำข้าวมีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยโปรตีนจากรำข้าวมีความอุดมไปด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย และยังพบว่าโปรตีนจากรำข้าวมีคุณสมบัติไม่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ (Bisly et al., 2022) โดยจากผลการทดลองไม่สามารถระบุได้ว่าเปปไทด์ที่ได้หรืออะมิโนที่ได้เป็นกลุ่มใดหรือมีการเรียงตัวในรูปแบบใด แต่คาดว่ากรรมกรรรมการหมักรำข้าวด้วยเชื้อรากลุ่ม *Rhizopus* spp. สามารถผลิตโปรตีนเปปไทด์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายรวมถึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารเสริมหรือผลิตภัณฑ์อาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ รวมถึงสามารถใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ได้



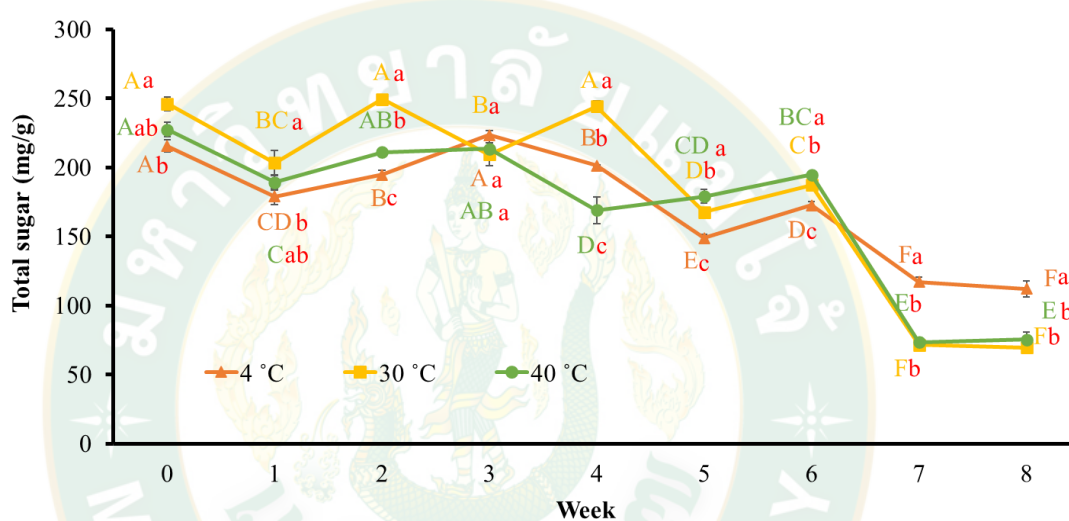
ภาพที่ 41 ภาพแสดงกระจายตัวของขนาดโมเลกุลโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ช่วงที่ 1 protein marker, ช่วงที่ 2 รำข้าวที่ไม่ผ่านการหมัก, ช่วงที่ 3-4 รำข้าวหมักขนาด 40 กรัม และช่วงที่ 5-6 รำข้าวหมักขยายขนาดการหมัก 1000 กรัม

7.4 การทดสอบคุณภาพระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิต่างๆ

ทำการผลิตต้นแบบรำข้าวหมักและนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส (สภาพแห้ง) จากนั้นเก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีโดยพบว่าปริมาณของน้ำตาลที่ละลายได้ทั้งหมดลดลงเล็กน้อยอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์ของการเก็บรักษา โดยในการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส น้ำตาลที่ละลายได้เหลือเพียงร้อยละ 54 ในขณะที่การเก็บที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำตาลลดลงเหลือร้อยละ 28 และ 32 ตามลำดับ ในทำนองเดียวกันพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเช่นกัน เหลือเพียงประมาณร้อยละ 20 เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 (ภาพที่ 42 และ 43) โปรตีนที่ละลายได้ของรำข้าวหมักได้ถูกวิเคราะห์เช่นกัน โดยพบว่าปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 6 และ 7 ดังภาพที่ 44 อุณหภูมิเป็นอีกหนึ่งกลไกการทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ การเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงสามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดโดยเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีน ดังนั้นทำให้ผลของภาพรวมทำให้น้ำตาลลดลง

ในส่วนของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่อยู่ในรูปอิสระเป็นอีกกลุ่มที่ลดปริมาณลงในผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาอุณหภูมิการเก็บรักษาและระยะเวลาในการเก็บรักษาไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยระยะ 4 สัปดาห์แรกปริมาณสารประกอบฟีนอลิกลดลงไม่มาก แต่ต่อมาในสัปดาห์ที่ 7 กลับพบมีปริมาณลดลงเป็นอย่างมาก (ภาพที่ 45) ในการเก็บที่อุณหภูมิต่ำ 4 พบว่าลดลงเหลือประมาณร้อยละ 35 จากเริ่มต้น ในส่วนอุณหภูมิห้องห้อง 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่สูงขึ้น 45 องศาเซลเซียส ลดลงเหลือประมาณร้อยละ 40 และ 39 ตามลำดับ จากเริ่มต้น โดยการลดลงสามารถเกิดได้จากการออกซิเดชัน (oxidation) ของโมเลกุลสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ทำให้ฟีนอลิกลดลงโดยเกิดจากการออกซิเดชันของโมเลกุลสารประกอบฟีนอลิกและอาจเกิดจากการเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างโปรตีนและสารประกอบฟีนอลิก และมีการตกตะกอน ส่งผลให้ฟีนอลิกลดลงและสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการได้ ดังนั้นการป้องกันการออกซิเดชันของโมเลกุลสารประกอบฟีนอลิกสามารถทำได้โดยการใช้สารต้านออกซิเดชัน (antioxidants) หรือการเพิ่มความเป็นกรด (acidity) เพื่อลดการตอบสนองต่ออากาศ อีกวิธีหนึ่งคือการจัดเก็บผลิตภัณฑ์ในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำและหลีกเลี่ยงแสงแดดโดยทั่วไป เพื่อลดโอกาสให้เกิดการออกซิเดชัน (Hellwig, 2019) ในขณะที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์พบว่าในช่วง

1 เดือนแรกของการเก็บรักษาไม่ได้ให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่หลังจากการเก็บรักษาภายหลังหนึ่งเดือนพบว่ามียผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาพที่ 46) แต่จากการเก็บที่อุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้เสียสภาพและลดลงไป ปริมาณฟอสเฟตอิสระของรำข้าวหมักจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าเพิ่มปริมาณขึ้นเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากนั้นลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงสัปดาห์ที่ 6 โดยลดลง 4 เท่า (ภาพที่ 47)



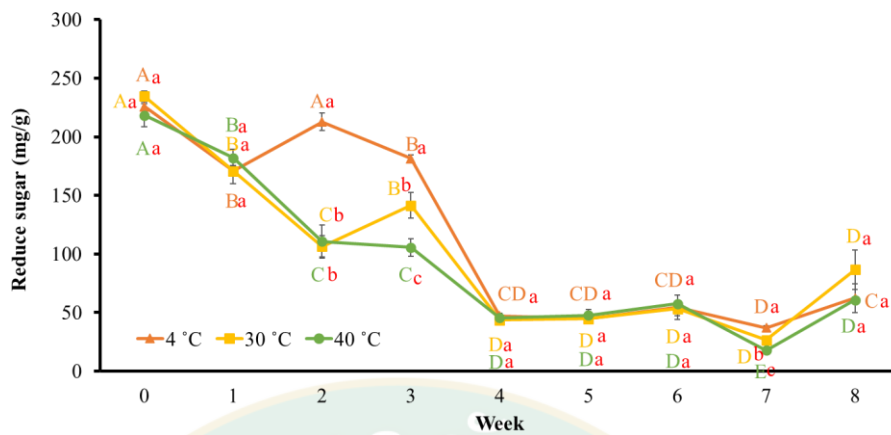
หมายเหตุ : ^{A,F} แสดงค่าความแตกต่างทางสถิติในการทดลองแต่ละสัปดาห์ ($p<0.05$)

^{a,c} แสดงค่าความแตกต่างทางสถิติในการทดลองแต่ละอุณหภูมิ ($p<0.05$)

ภาพที่ 42 แผนภูมิแสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของรำข้าวหมักจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิต่างๆ

หมายเหตุ : พยัญชนะตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยในการทดลองแต่ละสัปดาห์ ($p<0.05$)

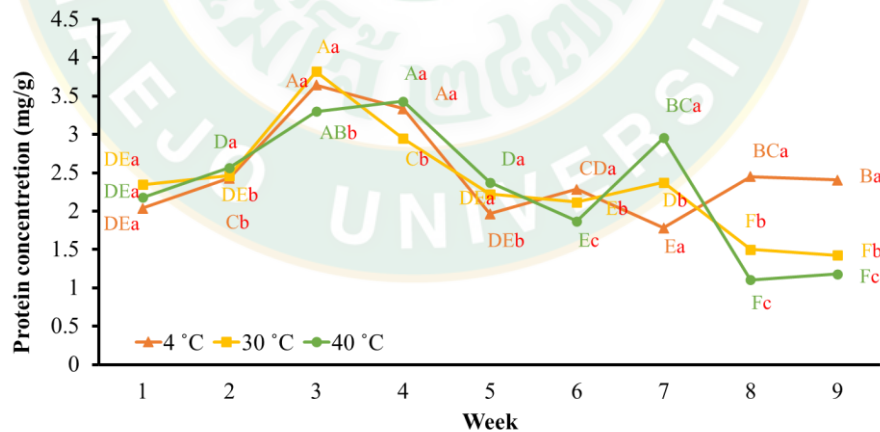
พยัญชนะตัวพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยในการทดลองแต่ละอุณหภูมิ ($p<0.05$)



ภาพที่ 43 แผนภูมิแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของรำข้าวหมักจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิต่างๆ

หมายเหตุ : พืชขนาดเล็กที่ต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยในการทดลองแต่ละสัปดาห์ ($p < 0.05$)

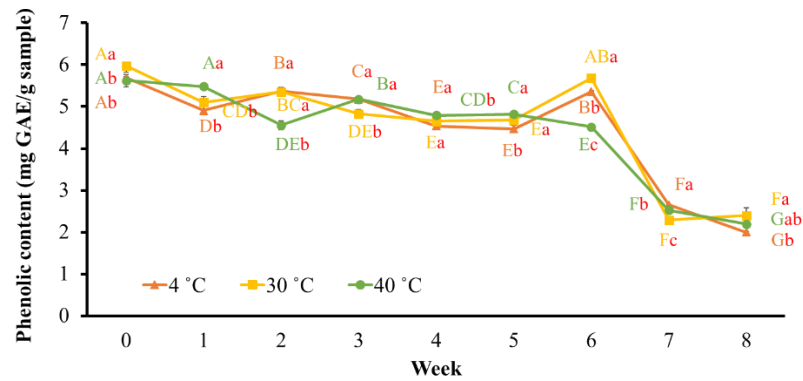
พืชมัฒนภาพใหญ่ที่ต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยในการทดลองแต่ละอุณหภูมิ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 44 แผนภูมิแสดงปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ของรำข้าวหมักจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิต่างๆ

หมายเหตุ : พืชขนาดเล็กที่ต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยในการทดลองแต่ละสัปดาห์ ($p < 0.05$)

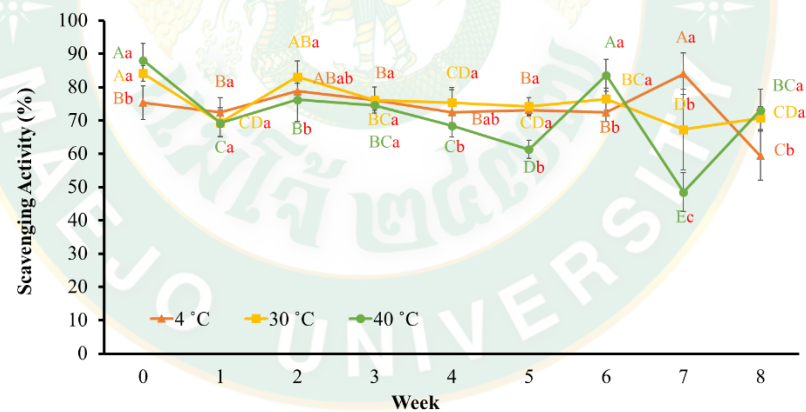
พืชมัฒนภาพใหญ่ที่ต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยในการทดลองแต่ละอุณหภูมิ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 45 แผนภูมิแสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของรำข้าวหมักจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิต่างๆ

หมายเหตุ : พืชชนิดตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยในการทดลองแต่ละสัปดาห์ ($p < 0.05$)

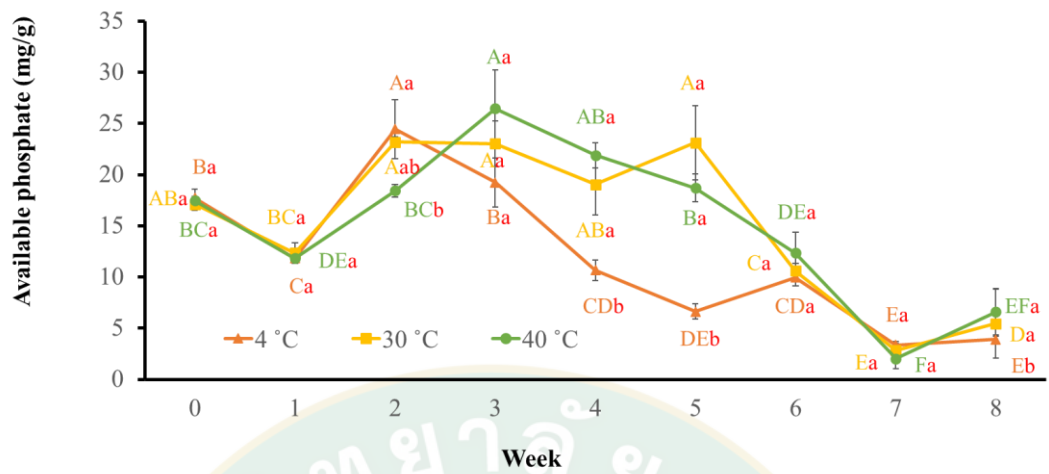
พืชนิดตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยในการทดลองแต่ละอุณหภูมิ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 46 แผนภูมิแสดงความสามารถในการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระของรำข้าวหมักจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิต่างๆ

หมายเหตุ : พืชชนิดตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยในการทดลองแต่ละสัปดาห์ ($p < 0.05$)

พืชนิดตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยในการทดลองแต่ละอุณหภูมิ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 47 แผนภูมิแสดงปริมาณฟอสเฟตอิสระของรำข้าวหมักจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิต่างๆ

หมายเหตุ : พืชขนาดเล็กที่ต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยในการทดลองแต่ละสัปดาห์ ($p < 0.05$)

พืชนั้นตัวพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยในการทดลองแต่ละอุณหภูมิ ($p < 0.05$)

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดสอบจึงมีข้อสรุปในการเลือกใช้เชื้อรา *Rhizopus microsporus* BG5 ในการหมักรำข้าว เนื่องจากมีความสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ในการทดลอง คือช่วยเพิ่มฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระในรำข้าวให้สูงขึ้น กำจัดกรดไฟติกในรำข้าวได้ และเพิ่มปริมาณน้ำตาลและโปรตีนที่ละลายได้ สภาวะที่เหมาะสมในการหมักรำข้าว ได้แก่ ความชื้นร้อยละ 33.6 โดยน้ำหนักแห้ง อุณหภูมิ 35.9 องศาเซลเซียส และปริมาณหัวเชื้อ 6 log สปอร์ต่อกรัมรำข้าว ซึ่งสามารถเพิ่มฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระในและกำจัดกรดไฟติกได้สูงสุด อีกทั้งเพิ่มปริมาณน้ำตาลและโปรตีนที่ละลายได้ การผลิตรำข้าวหมักดังกล่าวสามารถผลิตได้ถึง 1 กิโลกรัม สภาวะการทำหมักรำข้าวที่เหมาะสมคือ การใช้ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถคงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีนที่ละลายได้ รวมถึงฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ ผลิตภัณฑ์รำข้าวชนิดผงสามารถเก็บรักษาได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่ปริมาณน้ำตาลและโปรตีนที่ละลายได้ สารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระลดลง หลังจกเก็บรักษาเป็นเวลา 8 สัปดาห์

ผลิตภัณฑ์รำข้าวหมักที่ผลิตได้ อุดมด้วยสารอาหารและฤทธิ์ชีวภาพ ได้แก่ ปริมาณโปรตีนรวมร้อยละ 11.71 สารประกอบฟีนอลิก 4 ชนิด ได้แก่ *p*-coumaric acid, transferulic acid, sinapic acid และ caffeic acid อีกทั้งโปรตีนที่ได้มีคุณภาพดีขึ้นเนื่องจากขนาดโมเลกุลที่เล็กลง

อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์นี้เป็นเพียงต้นแบบ ผลิตอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ แต่การนำไปใช้จริงในด้านอุตสาหกรรม จำเป็นต้องมีการทดสอบยืนยันประสิทธิภาพมากขึ้นและยืนยันความปลอดภัยทางชีวภาพก่อนการใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์

ข้อเสนอแนะ

1. ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ได้โดยสมบูรณ์มีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาเพิ่มเติมในหลายประเด็นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครอบคลุมและเชื่อถือได้เกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ต้นแบบ ดังนี้:

คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ: การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของผลิตภัณฑ์ชนิดรวม เช่น ลักษณะทางกายภาพของแคปซูล การละลายในน้ำและสารละลายอื่น ๆ สามารถช่วยให้เข้าใจถึงลักษณะและคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ได้อย่างละเอียด

ฤทธิ์ชีวภาพในระดับสัตว์ทดลอง: การทดสอบฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ในระดับสัตว์ทดลอง เช่น การทดสอบความสามารถในการกระตุ้นสมดุจลินทรีย์ในลำไส้ การวัดฤทธิ์ลดไขมันในเลือด และการวัดฤทธิ์ลดการอักเสบ เป็นต้น สามารถช่วยให้เห็นภาพรวมเกี่ยวกับผลกระทบของผลิตภัณฑ์ต่อร่างกายได้

การทดสอบด้านพิษวิทยาของผลิตภัณฑ์: การศึกษาผลกระทบของผลิตภัณฑ์ต่อสุขภาพและความปลอดภัย ทั้งในระยะสั้นและระยะยาว โดยการทดสอบด้านพิษวิทยา เช่น การทดสอบความพร้อมทางชีวภาพและสมบัติพิษของสารเคมีที่อาจปรากฏในผลิตภัณฑ์

รวมถึงการทดสอบขยายกำลังการผลิตผลิตภัณฑ์ การศึกษาวิธีการขยายกำลังการผลิตผลิตภัณฑ์ เพื่อให้มั่นใจว่าสามารถผลิตในปริมาณที่เพียงพอและมีคุณภาพที่คงที่ได้ตลอดเวลาการศึกษาเหล่านี้จะช่วยให้ทราบถึงคุณสมบัติและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในแง่มุมต่าง ๆ ซึ่งสามารถช่วยให้การนำผลิตภัณฑ์ไปสู่การใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัยที่สุด

2. การขยายขนาดการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ควรมีการควบคุมสภาพแวดล้อมในการผลิต เช่น อุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณหัวเชื้อ ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ต้องมีการออกแบบห้องหมักให้เหมาะสมต่อการใช้งานในระดับอุตสาหกรรมต่อไปเพื่อให้การผลิตมีประสิทธิภาพและมีคุณภาพสูง



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสาร

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract Peptone Dextrose (YPD)

| | |
|-----------------|-----------------|
| Yeast extract | 3 กรัม |
| Malt extract | 3 กรัม |
| Peptone | 5 กรัม |
| Glucose | 10 กรัม |
| Distilled water | 1,000 มิลลิลิตร |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 5.5 กรณอาหารแข็ง เติมน้ำ 15 กรัม/ ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระ

1) การเตรียมสารละลาย ABTS⁺

เตรียม ABTS⁺ ความเข้มข้น 14 มิลลิโมลลาร์ ชั่งสาร 0.0144 กรัม เตรียมสาร Potassium persulphate ชั่งสาร 0.132 กรัม ผสมสารละลาย ABTS⁺ ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 12-16 ชั่วโมง เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าการดูดกลืนแสง 0.700 ± 0.003 ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยนำตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ผสมกับ สารละลาย ABTS⁺ ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าการดูดกลืนแสง 0.700 ± 0.003 ในอัตราส่วน 990 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและจับเวลา 1 นาที ด้วยนาฬิกาจับเวลา และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณเปอร์เซ็นต์สารต้านอนุมูลอิสระ

2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

การเตรียมสารละลาย Vitamin C ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลลาร์ ทำการชั่ง 0.356 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และทำการเจือจางที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, มิลลิโมลลาร์ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

การเตรียมสารละลาย Vitamin E ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลลาร์ ทำการชั่ง 0.086 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และทำการเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน เช่นเดียวกับ Vitamin C

การเตรียมสารละลาย BHA ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลลาร์ ทำการชั่ง 0.086 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และทำการเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อสร้างกราฟ มาตรฐาน เช่นเดียวกับ Vitamin C และ Vitamin E

3. การเตรียมสารละลายวิเคราะห์โปรตีนที่ละลายน้ำได้ด้วยวิธี Bradford assay

1. การเตรียมสารละลาย Bradford

ชั่ง Billiant Blue G-250 ปริมาตร 0.1 กรัม ละลายในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรด phosphoric acid ความเข้มข้นร้อยละ 85 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 200 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองด้วยกระดาษกรอง whatman No.1 เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา อุณหภูมิ 27 ± 3 องศาเซลเซียส

2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง Bovine serum albumin (BSA) ปริมาตร 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ด้วยวิธี Bradford assay

1. เตรียมกราฟมาตรฐานสารละลายมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. สารละลายมาตรฐาน BSA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง
3. เติมสารละลาย Bradford 900 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ ประมาณ 15 นาที แต่ต้องไม่เกิน 1 ชั่วโมง
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงไป คำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี Bradford

4. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตอิสระด้วยวิธีของ Fiske and Subbarow

1. การเตรียมสารละลาย

1.1 เตรียมสารละลาย TCA ความเข้มข้นร้อยละ 10

ซังสาร trichloroacetic acid ปริมาณ 10 กรัม และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.2 เตรียมสารละลาย color reagent

- เตรียม 6N H_2SO_4

- เตรียมสารละลาย Ammonium molybdate ความเข้มข้นร้อยละ 2.5

- เตรียม Ascorbic acid ความเข้มข้นร้อยละ 10 (เก็บไว้ในขวดสีชา)

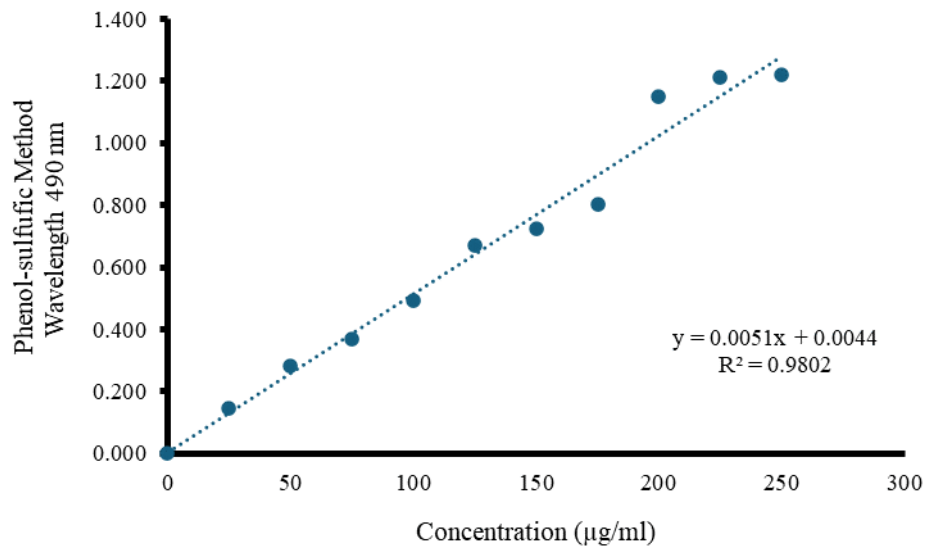
อัตราส่วน 6N H_2SO_4 : Ammonium molybdate : 10% Ascorbic acid : Distilled water

(1: 1: 1: 2) เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน

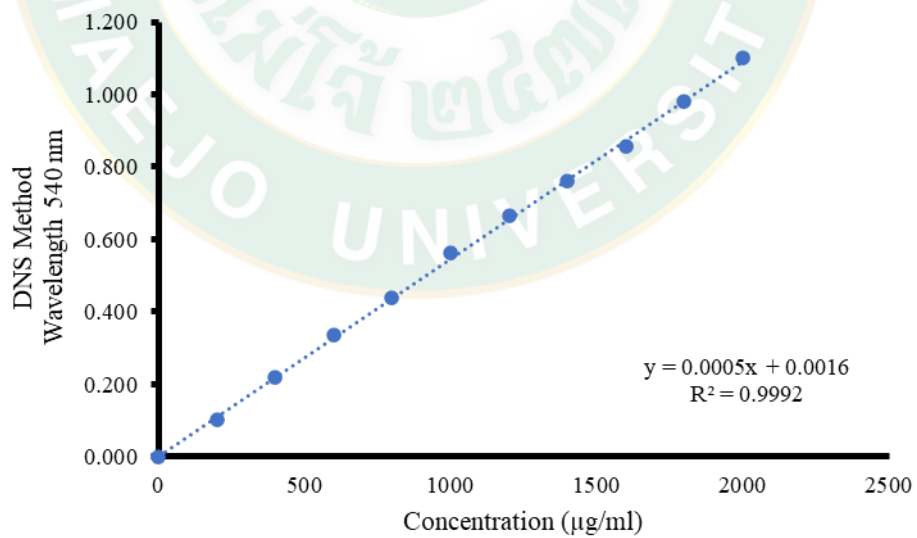
2. การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสเฟต ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ซังสาร Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) ปริมาณ 0.05 กรัม ละลายน้ำ 1 ลิตร

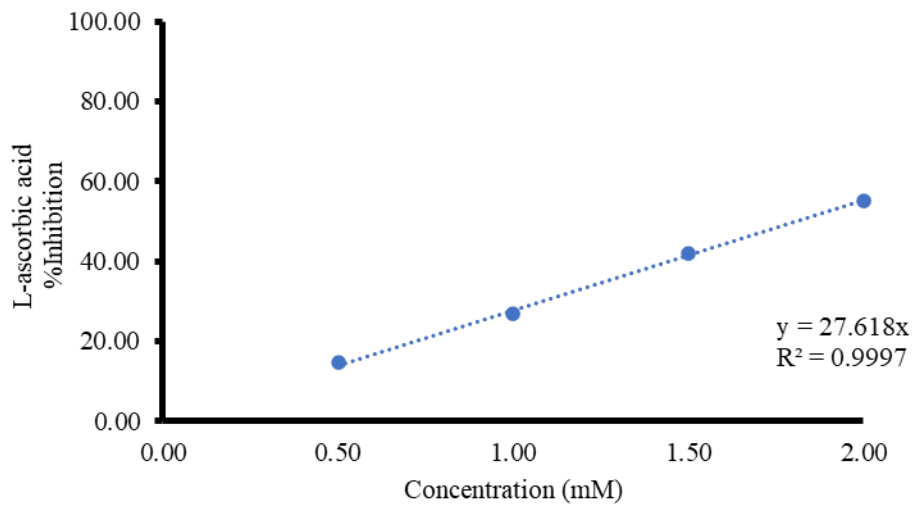
ภาคผนวก ข
กราฟสารมาตรฐาน



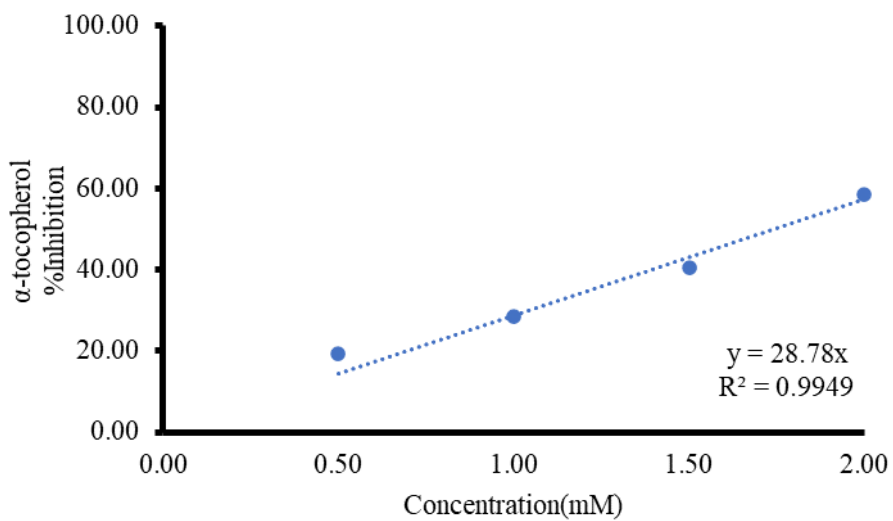
ภาพที่ 48 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส โดยวิธี Phenol-sulfuric Method ความเข้มข้น 0 – 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



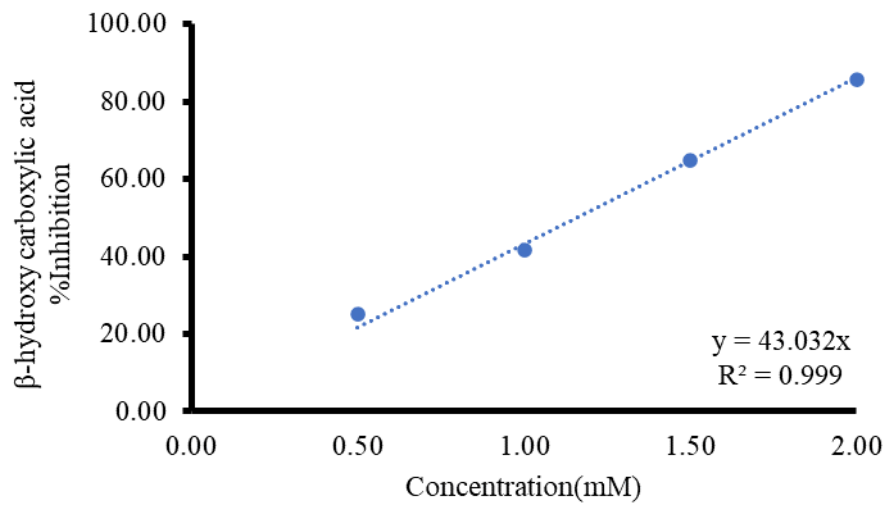
ภาพที่ 49 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส โดยวิธี DNS Method ความเข้มข้น 0 – 2500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



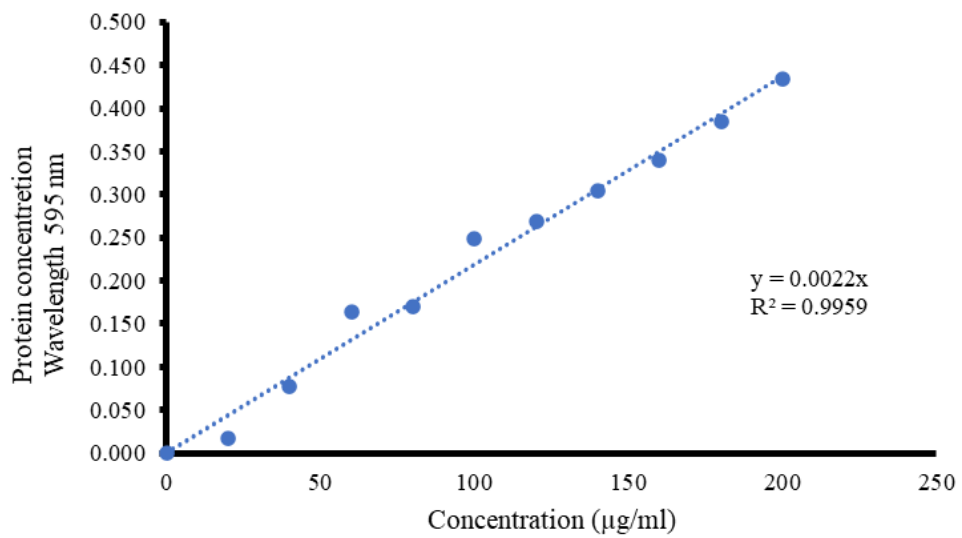
ภาพที่ 50 กราฟมาตรฐาน L-ascorbic acid ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 2 มิลลิโมลาร์



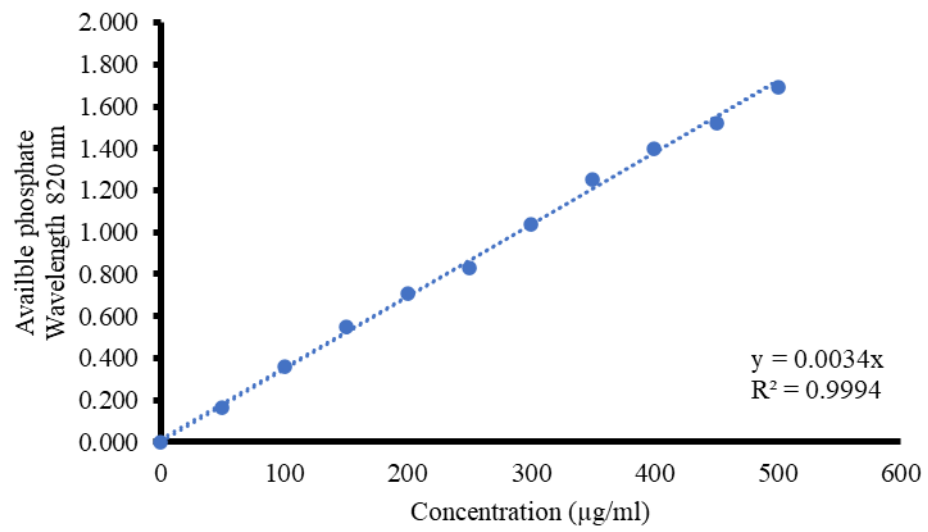
ภาพที่ 51 กราฟมาตรฐาน α -tocopherol ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 2 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 52 กราฟมาตรฐาน β -hydroxy carboxylic acid ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 2 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 53 กราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin ความเข้มข้น 0 – 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 54 กราฟมาตรฐาน Potassium dihydrogen phosphate ความเข้มข้น 0 – 500 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร



ภาคผนวก ค

การจำแนกจุลินทรีย์ด้วยวิธีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ

การจำแนกจุลินทรีย์ด้วยวิธีการหาลำดับเบส rRNA ประกอบไปด้วยขั้นตอนหลักๆ ได้แก่ สกัด DNA ของแบคทีเรียและเชื้อรา คือ สกัด DNA ของแบคทีเรียและเชื้อรา การเพิ่มปริมาณยีน ด้วยวิธี PCR การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ การหาลำดับเบส และนำผลของลำดับเบสที่ได้มาเทียบกับฐานข้อมูล

วิธีการจำแนกจุลินทรีย์โดยใช้ข้อมูลของลำดับเบสบนยีน rRNA นั้น ประกอบด้วยขั้นตอนหลักๆได้แก่ สกัด DNA ของแบคทีเรียและเชื้อรา การเพิ่มปริมาณยีน ด้วยวิธี PCR การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ การหาลำดับเบส และนำผลของลำดับเบสที่ได้มาเทียบกับฐานข้อมูล

1.วิธีการสกัดดีเอ็นเอ ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Genomic DNA Mini Kit

2.การทำ PCR และทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit

| ส่วนประกอบของ ปฏิกิริยา | ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร) | คูณจำนวนตัวอย่าง +1 |
|----------------------------|---------------------------------|---------------------|
| PCR Mastermix | 25 | 25*11=275 |
| Primer I | 4 | 4*11=44 |
| Primer II | 4 | 4*11=44 |
| dH ₂ O | 15 | 15*11=165 |
| DNA | 2 | - |
| Total | 50 | |

หมายเหตุ: สำหรับแบคทีเรีย Universal Primer ที่ใช้ คือ 27F และ 1522R และสำหรับเชื้อรา Universal Primer ที่ใช้ คือ ITS1 และ ITS4

โปรแกรม PCR reaction

สำหรับแบคทีเรีย (Primer 27F และ 1522R)

| | | |
|----------------------|------------------------|----------|
| Initial Denaturation | 95 องศาเซลเซียส 5 นาที | |
| Denaturation | 95 องศาเซลเซียส 1 นาที | } 25 รอบ |
| Annealing | 55 องศาเซลเซียส 1 นาที | |
| Extension | 72 องศาเซลเซียส 1 นาที | |
| Final Extension | 72 องศาเซลเซียส 5 นาที | |
| Set Hold | 20 องศาเซลเซียส | |

สำหรับเชื้อรา (Primer ITS1 และ ITS4)

| | | |
|----------------------|---------------------------|----------|
| Initial Denaturation | 95 องศาเซลเซียส 52 นาที | |
| Denaturation | 94 องศาเซลเซียส 1 นาที | } 30 รอบ |
| Annealing | 54 องศาเซลเซียส 30 วินาที | |
| Extension | 72 องศาเซลเซียส 1 นาที | |
| Final Extension | 72 องศาเซลเซียส 5 นาที | |
| Set Hold | 20 องศาเซลเซียส | |

3. การตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีการ run gel-electrophoresis ดังนี้

1. นำ 1.5% agarose gel ปริมาณ 30 ml ไปหลอมด้วยไมโครเวฟ
2. ตั้งทิ้งไว้ให้เจลมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส
3. เติม gel star ปริมาตร 1 µl/agarose gel 10 ml
4. เทเจลลงในแม่พิมพ์และเสียบหัวลิงไป เพื่อให้เกิดช่องสำหรับหยดตัวอย่าง
5. รอให้เจลแข็งและนำเจลไปบ่มไว้ที่มีด
6. เมื่อเจลแข็งให้ค่อยๆดึงหัวออกแล้วนำแผ่นเจลไปวางไว้ในเครื่อง electrophoresis
7. เติม TAE buffer ลงไปให้ท่วมเจล นำ marker และตัวอย่างมาหยอดลงในแต่ละช่องดังนี้
 - marker: marker 1 µl + TAE buffer 4 µl + loading dye 2 µl
 - sample: DNA 3 µl + loading dye 2 µl
8. ปิดฝาเครื่อง electrophoresis โดยตั้งค่าไว้ที่ 100v ให้เคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก
9. ทิ้งไว้ประมาณ 30-45 นาที จากนั้นปิดเครื่อง electrophoresis
10. นำแผ่นเจลไปวางบนเครื่องตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

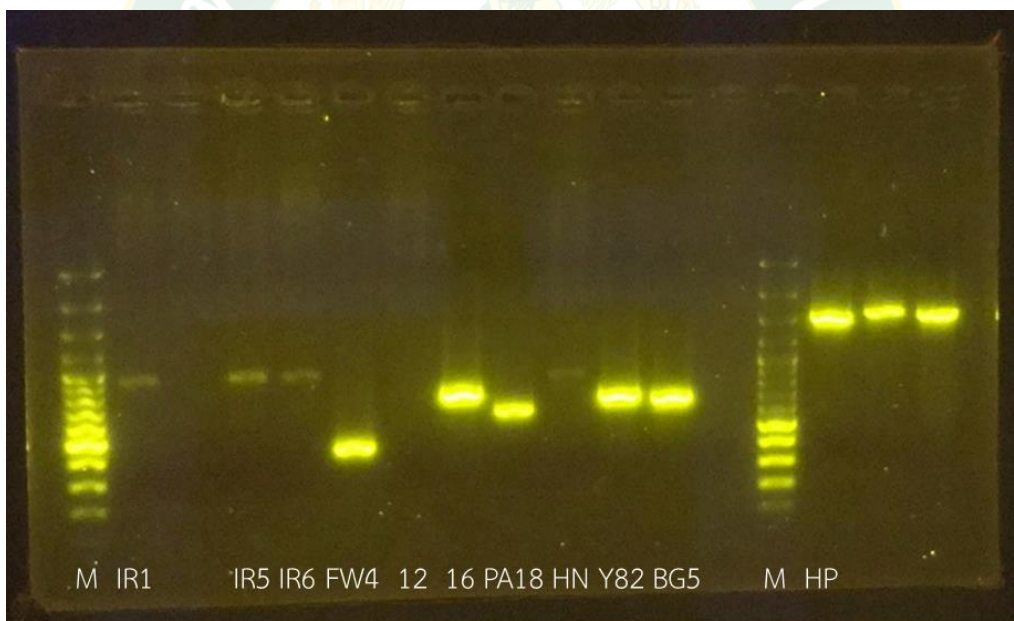
4. นำผลของลำดับเบสที่ได้มาเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม bioEdit และเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI

ผลการทดลองการจำแนกจุลินทรีย์ด้วยวิธีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ

จากการจำแนกจุลินทรีย์ด้วยวิธีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอเพื่อทำการจำแนกยีสต์ รา และแบคทีเรีย พบว่า ไอโซเลต IR5 และ BG5 คือ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Rhizopus microspores* ตามลำดับ โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ที่ร้อยละ 98.20 และ 100.00 ตามลำดับ ดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ผลการจำแนกยีสต์ รา และแบคทีเรียโดยวิธีทางโมเลกุล

| Isolate | bp. | Result | Sequence ID | %Identities |
|------------|---------|---------------------------------|-------------|-------------------|
| IR5 (ITS4) | 500 bp. | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | MG865964.1 | 491/500 (98.20%) |
| BG5 (ITS1) | 600 bp. | <i>Rhizopus microsporus</i> | MN177926.1 | 603/603 (100.00%) |



ภาพที่ 55 ภาพ run gel ของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ผ่านการทำ PCR แล้ว

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

การเตรียมเจล

1.separation gel

| | | |
|-----|----|--|
| 4.1 | ml | H ₂ O |
| 3.3 | ml | gel solution 30% acrylamide/bis solution |
| 2.5 | ml | Tris HCl (1.5M) pH 8 |
| 100 | μl | 10% SDS |
| 32 | μl | APS 10% (w/v) ammonium persulphate |
| 10 | μl | TEMED |

2.stacking gel

| | | |
|-----|----|----------------------|
| 6.1 | ml | H ₂ O |
| 1.3 | ml | gel solution |
| 2.5 | ml | Tris HCl (0.5M) pH 7 |
| 100 | μl | 10% SDS |
| 100 | μl | APS 10% (w/v) |
| 10 | μl | TEMED |

ขั้นตอนการเตรียมเจล

1. เตรียมส่วนของ separation gel ก่อนทิ้งไว้ให้แข็งตัว (กรณีเกิดฟองเติม isopropanol เมื่อเจลแข็งจึงขับออก)
2. พอเจลส่วนแรกแข็งตัว จึงเตรียมส่วนของ stacking gel โดยเทเข้าไปในส่วนที่สอง จากนั้นเสียบหวี ทิ้งไว้ให้แข็งตัว
3. แกะแผ่นกระจกที่มีเจลมาประกอบเครื่องรันเจล แล้วแกะหวีออก

ขั้นตอนการ run gel

1. ประกอบเครื่องเท buffer ลงไปในส่วนที่เป็นตัวอย่างให้เต็มก่อน รอสักพักตรวจดูการรั่วไหลจากนั้นจึงเท buffer ลงไปในขีดที่กำหนด ส่วนของตัวอย่างผสมตัวอย่างกับ Laemmli buffer ที่มีการเติม BME ความเข้มข้นร้อยละ 10 (v/v) 1:1 denature heat 90-95 องศาเซลเซียส 5 นาที
2. ปิดฝา จากนั้นต่อเครื่องตั้งค่า 120-150 โวลต์ กดปุ่ม run รอประมาณ 1.30 ชั่วโมง เมื่อถึงระยะที่กำหนดทำการปิดเครื่อง

ขั้นตอนการย้อมสีเจล

1. ค่อยๆ แกะเจลออกมาจากพิมพ์ใส่ลงในกล่อง จากนั้นเทสีย้อม Coomassie blue staining
2. นำไปเข้าไมโครเวฟ 15 วินาที แล้วย้อมสีข้ามคืนด้วยเครื่องเขย่าแบบอัตโนมัติ

ขั้นตอนการล้างเจล

1. Acetic acid 30 ml, methanol 50 ml และ H₂O 20 ml
2. Acetic acid 80 ml, methanol 160 ml และ H₂O 40 ml
3. Acetic acid 80 ml, methanol 160 ml และ H₂O 40 ml

การอ่านผล : ดูเทียบกับ protein ladder ในหน่วยของ kDa

บรรณานุกรม

- ฉลวย ทับศรี ม่วงพรวน. 2555. การศึกษาผลการบริโภคผลิตภัณฑ์เสริมอาหารน้ำมันรำข้าวและจมูกข้าว P2PLUS. งานวิจัยบริษัทปฐมสิทธิ์จำกัด. จังหวัดปทุมธานีประเทศไทย.
- เชาวนีพร ชิพประสพ, ถุทัยทิพย์ อโนมุณี & สาเหล็ม, แ. ห. 2559. องค์ประกอบทางเคมีและปริมาณอะไมโลสในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จังหวัดพัทลุง. มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.
- ทิพย์ธิดา แก้วตาทิพย์. 2556. สารระเหยให้กลิ่นในอาหารหมัก. วารสารวิชาการสถาบันคั่นคว่ำและพัฒนาลิขสิทธิ์อาหาร, ปีที่ 43 ฉบับที่ 4 ตุลาคม – ธันวาคม 2556.
- นัยนา บุญทิววัฒน์. 2533. ปริมาณไฟเตทในพืชชนิดต่างๆ. โภชนาการสาร (24): 1-8.
- นัยนา บุญทิววัฒน์, เ. จ. 2558. เรื่องน่ารู้ของน้ำมันรำข้าว และน้ำมันจมูกข้าว. หน้า 12(กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์).
- นิตยา รัตนাপนนท์. 2541. วิทยาศาสตร์การอาหารของไขมันและน้ำมัน. เชียงใหม่: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 193 น.
- พนารัตน์ บุญฤทธิการ. 2542. ปริมาณวิตามินซีที่มีผลต่อการเพิ่มธาตุเหล็กที่ดูดซึมได้ในอาหารที่มีเส้นใยและไฟเตทโดยการศึกษาในหลอดทดลอง วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยมหิดล, 92 น.
- รัชณี คงคาอุยฉาย, ริญ เจริญศิริ, อภิชาติ วรรณวิจิตร & ศิริพัฒน์ เรื่องพยัคฆ์. 2558. อนุมูลอิสระ (Free Radicle) มาจากไหน. สถาบันวิจัยโภชนาการ ม.มหิดล, ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว ม.เกษตรศาสตร์ กำแพงแสน.
- ศิริธร ศิริอมรพรรณ. 2557. สารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร = Antioxidants in food . กรุงเทพฯ :โอเดียนสโตร์.
- อรอนงค์ นัยวิกุล. 2547. ข้าว: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- Abd Razak, D. L., Abd Rashid, N. Y., Jamaluddin, A., Sharifudin, S. A., Abd Kahar, A. & Long, K. 2017. Cosmeceutical potentials and bioactive compounds of rice bran fermented with single and mix culture of *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae*. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16(2), 127-134.
- Abd Razak, D. L., Abd Rashid, N. Y., Jamaluddin, A., Sharifudin, S. A. & Long, K. 2015.

- Enhancement of phenolic acid content and antioxidant activity of rice bran fermented with *Rhizopus oligosporus* and *Monascus purpureus*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 4(1), 33-38.
- Andhika Cahaya Titisan Sukma, A., Herwati Oktavianty, H. & Siswo Sumardiono, S. 2021. Optimization of solid-state fermentation condition for crude protein enrichment of rice bran using *Rhizopus oryzae* in tray bioreactor. **Indonesian Journal of Biotechnology**, 26(1), 33-40.
- Arab, F., Alemzadeh, I. & Maghsoudi, V. 2011. Determination of antioxidant component and activity of rice bran extract. **Scientia iranica**, 18(6), 1402-1406.
- Bandyopadhyay, K., Misra, G. & Ghosh, S. 2008. Preparation and characterisation of protein hydrolysates from Indian defatted rice bran meal. **Journal of Oleo Science**, 57(1), 47-52.
- Bartnik, M. & Florysiak, J. 1988. Phytate hydrolysis during breadmaking in several sorts of Polish bread. **Food/Nahrung**, 32(1), 37-42.
- Bisly, A. A. 2022. Preparation of Proteins and Peptides from Heat-Stabilized Defatted Rice Bran Via Solid State Fermentation and Investigating for Skin Health.
- Chen, W. & Chiou, R. Y.-Y. 1999. A modified chemical procedure for rapid determination of glucosamine and its application for estimation of mold growth in peanut kernels and koji. **Journal of agricultural and food chemistry**, 47(5), 1999-2004.
- Chinma, C., Ilowefah, M. & Muhammad, K. 2014. Optimization of rice bran fermentation conditions enhanced by baker's yeast for extraction of protein concentrate. **Nigerian Food Journal**, 32(1), 126-132.
- Christ-Ribeiro, A., Chiattoni, L. M., Mafaldo, C. R. F., Badiale-Furlong, E. & de Souza-Soares, L. A. 2021. Fermented rice-bran by *Saccharomyces cerevisiae*: Nutritious ingredient in the formulation of gluten-free cookies. **Food Bioscience**, 40(100859).
- Cochran, T. W. & Vercelotti, J. R. 1978. Hexosamine biosynthesis and accumulation by fungi in liquid and solid media. **Carbohydrate research**, 61(1), 529-543.
- Cordova, J., Nemmaoui, M., Ismaili-Alaoui, M., Morin, A., Roussos, S., Raimbault, M. &

- Benjilali, B. 1998. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 5(1-4), 75-78.
- Fabian, C., Huynh, L. & Ju, Y. 2010. Precipitation of rice bran protein using carrageenan and alginate. **LWT-food Science and Technology**, 43(2), 375-379.
- Greiner, R., Muzquiz, M., Burbano, C., Cuadrado, C., Pedrosa, M. M. & Goyoaga, C. 2001. Purification and characterization of a phytate-degrading enzyme from germinated faba beans (*Vicia faba* var. Alameda). **Journal of agricultural and food chemistry**, 49(5), 2234-2240.
- Gul, K., Yousuf, B., Singh, A., Singh, P. & Wani, A. A. 2015. Rice bran: Nutritional values and its emerging potential for development of functional food—A review. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, 6(1), 24-30.
- Hellwig, M. 2019. The chemistry of protein oxidation in food. **Angewandte Chemie International Edition**, 58(47), 16742-16763.
- Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y.-C., Choi, I. & Kim, G.-B. 2014. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. **Food chemistry**, 160(346-356).
- Kamiloglu, S., Toydemir, G., Boyacioglu, D., Beekwilder, J., Hall, R. D. & Capanoglu, E. 2016. A review on the effect of drying on antioxidant potential of fruits and vegetables. **Critical reviews in food science and nutrition**, 56(sup1), S110-S129.
- Kim, Y.-O., Kim, H.-K., Bae, K.-S., Yu, J.-H. & Oh, T.-K. 1998. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. **Enzyme and microbial technology**, 22(1), 2-7.
- Kumar, A., Singh, B., Raigond, P., Sahu, C., Mishra, U. N., Sharma, S. & Lal, M. K. 2021. Phytic acid: Blessing in disguise, a prime compound required for both plant and human nutrition. **Food Research International**, 142(110193).
- Lestienne, I., Icard-Vernière, C., Mouquet, C., Picq, C. & Trèche, S. 2005. Effects of soaking whole cereal and legume seeds on iron, zinc and phytate contents. **Food chemistry**, 89(3), 421-425.
- Liang, J., Han, B.-Z., Nout, M. R. & Hamer, R. J. 2008. Effects of soaking, germination and fermentation on phytic acid, total and in vitro soluble zinc in brown rice.

Food chemistry, 110(4), 821-828.

- Liang, J., Han, B. Z., Han, L., Nout, M. R. & Hamer, R. J. 2007. Iron, zinc and phytic acid content of selected rice varieties from China. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 87(3), 504-510.
- Liu, Y., Strappe, P., Shang, W. & Zhou, Z. 2019. Functional peptides derived from rice bran proteins. **Critical reviews in food science and nutrition**, 59(2), 349-356.
- Manfredini, P. G., Cavanhi, V. A. F., Costa, J. A. V. & Colla, L. M. 2021. Bioactive peptides and proteases: characteristics, applications and the simultaneous production in solid-state fermentation. **Biocatalysis and Biotransformation**, 39(5), 360-377.
- Moon, S.-H. & Chang, H.-C. 2021. Rice bran fermentation using *Lactiplantibacillus plantarum* EM as a starter and the potential of the fermented rice bran as a functional food. **Foods**, 10(5), 978.
- Mullaney, E. J., Ullah, A. H., Turner, B., Richardson, A. & Mullaney, E. 2007. Phytases: attributes, catalytic mechanisms and applications. **Inositol phosphates: linking agriculture and the environment**, 97-110.
- Oliveira, M. d. S., Feddern, V., Kupski, L., Cipolatti, E., Badiale-Furlong, E. & de Souza-Soares, L. 2010. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass Caracterización físico-química de la biomasa del salvado de arroz fermentado. **CyTA–Journal of Food**, 8(3), 229-236.
- Orthofer, F. T. & Eastman, J. 2005. Rice bran oil. **Bailey's industrial oil and fat products**, 2(7), 465-489.
- Rani, R. & Ghosh, S. 2011. Production of phytase under solid-state fermentation using *Rhizopus oryzae*: Novel strain improvement approach and studies on purification and characterization. **Bioresource technology**, 102(22), 10641-10649.
- Rao, A. S., Reddy, S. G., Babu, P. P. & Reddy, A. R. 2010. The antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extracts from Njavara rice bran. **BMC complementary and alternative medicine**, 10(1), 4.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization

- assay. **Free radical biology and medicine**, 26(9-10), 1231-1237.
- Reddy, N. R. & Sathe, S. K. 2001. **Food phytates**. CRC Press.
- Ruengsri, S., Eshtiaghi, M. N. & Yoswattana, N. 2018. Optimization of solid-state mixed fungal fermentation of total phenolic compounds from defatted riceberry bran using subcritical water extraction. **Kasem Bundit Engineering Journal**, 8(87-100).
- Saunders, R. M. 1990. The properties of rice bran as a foodstuff. **Cereal Foods World** 35(632).
- Schmidt, C. G., Gonçalves, L. M., Prietto, L., Hackbart, H. S. & Furlong, E. B. 2014. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*. **Food chemistry**, 146(371-377).
- Shin, H.-Y., Kim, S.-M., Lee, J. H. & Lim, S.-T. 2019. Solid-state fermentation of black rice bran with *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae*: Effects on phenolic acid composition and antioxidant activity of bran extracts. **Food chemistry**, 272(235-241).
- Siah, S., Konczak, I., Wood, J. A., Agboola, S. & Blanchard, C. L. 2014. Effects of roasting on phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of Australian grown faba beans (*Vicia faba* L.). **Plant foods for human nutrition**, 69(85-91).
- Sohail, M., Rakha, A., Butt, M. S., Iqbal, M. J. & Rashid, S. 2017. Rice bran nutraceuticals: A comprehensive review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 57(17), 3771-3780.
- Soman, S., Kumarasamy, S., Narayanan, M. & Ranganathan, M. 2020. Biocatalyst: phytase production in solid state fermentation by OVAT strategy. **Bioin. Res. App. Chem**, 10(6119-6127).
- Song, E.-H., Shang, J. & Ratner, D. 2012. Polysaccharides. **Polymer science: a comprehensive reference**, 137-155.
- Tang, B., Pan, H., Tang, W., Zhang, Q., Ding, L. & Zhang, F. 2012. Fermentation and purification of cellulase from a novel strain *Rhizopus stolonifer* var. *reflexus* TP-02. **Biomass and Bioenergy**, 36(366-372).
- Trakampaiboon, S., Srisuk, N., Piyachomkwan, K., Sakai, K. & Kitpreechavanich, V. 2017. Enhanced production of raw starch degrading enzyme using agro-industrial

- waste mixtures by thermotolerant *Rhizopus microsporus* for raw cassava chip saccharification in ethanol production. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 47(8), 813-823.
- Urbano, G., Lopez-Jurado, M., Aranda, P., Vidal-Valverde, C., Tenorio, E. & Porres, J. 2000. The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function? **Journal of physiology and biochemistry**, 56(3), 283-294.
- Van de Loo, H.-M. 1976. An improved method for the quantitative determination of hexosamines according to Elson and Morgan. **Analytical Biochemistry**, 76(2), 556-560.
- Van Hoed, V., Depaemelaere, G., Ayala, J. V., Santiwattana, P., Verhé, R. & De Greyt, W. 2006. Influence of chemical refining on the major and minor components of rice brain oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 83(315-321).
- Vaseghi, Z., Najafpour, G. D., Mohseni, S. & Mahjoub, S. 2013. Production of active lipase by *Rhizopus oryzae* from sugarcane bagasse: solid state fermentation in a tray bioreactor. **International Journal of Food Science & Technology**, 48(2), 283-289.
- Wang, W. & De Meija, E. G. 2005. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, 4(4), 63-78.
- Wiboonsirikul, J., Kimura, Y., Kadota, M., Morita, H., Tsuno, T. & Adachi, S. 2007. Properties of extracts from defatted rice bran by its subcritical water treatment. **Journal of agricultural and food chemistry**, 55(21), 8759-8765.
- Wongputtisin, P., Khanongnuch, C., Khongbantad, W., Niamsup, P. & Lumyong, S. 2012. Screening and selection of *Bacillus* spp. for fermented corticate soybean meal production. **Journal of applied microbiology**, 113(4), 798-806.
- Zhang, H.-J., Zhang, H., Wang, L. & Guo, X.-N. 2012. Preparation and functional properties of rice bran proteins from heat-stabilized defatted rice bran. **Food Research International**, 47(2), 359-363.
- Zhang, M., Tang, J., Mujumdar, A. & Wang, S. 2006. Trends in microwave-related drying of fruits and vegetables. **Trends in Food Science & Technology**, 17(10), 524-

534.

Zhang, Z., Li, J., Feng, F., Liu, D., Pang, Q., Li, M. & Chen, K. 2013. Optimization of Nutrition Constituents for Xylanase Activity by *Rhizopus stolonifer* Under Solid-State Fermentation on Corn cob. **BioResources**, 8(2).



ประวัติผู้วิจัย

- ชื่อ-สกุล** นางสาวอรจินดา กานุมัด
- เกิดเมื่อ** 5 มีนาคม 2541
- ประวัติการศึกษา**
- มีนาคม 2563 มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
 - มีนาคม 2559 โรงเรียนสันป่าตองวิทยาลัย
มัธยมศึกษาตอนปลาย สายวิทย์ - คณิต
- ประวัติการทำงาน**
- 1 กรกฎาคม ถึง 31 ตุลาคม 2562
ฝึกประสบการณ์สหกิจศึกษา ณ ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)
- ผลงาน proceedind
- นำเสนอผลงานภาคบรรยายหัวข้อ “การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสม
สำหรับการผลิตรำข้าวหมักเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ” การประชุม
วิชาการระดับชาติ ประจำปี 2564 “นวัตกรรมเกษตร อาหาร และสุขภาพ”
ณ อาคารเรียนรวม 80 ปี มหาวิทยาลัยแม่โจ้
- นำเสนอผลงานภาคบรรยายในงานประชุมวิชาการระดับชาติหัวข้อ “การ
คัดเลือกยีสต์ที่ผลิตน้ำตาลที่มีฤทธิ์ชีวภาพ” การประชุมวิชาการระดับชาติ
วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและนวัตกรรม ครั้งที่ 3 คณะ
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้