Published online: 27 December 2019

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกระบวนการหมักรำข้าวด้วย *ASPERGILLUS ORYZAE* TISTR3102

BIOLOGICAL ACTIVE COMPOUNDS FROM RICE BRAN FERMENTATION BY *ASPERGILLUS ORYZAE* TISTR3102

นางสาวลลิตา ปัตตานี

อีเมล์: lita_patt@hotmail.com

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขา วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ดร.ณัตฐาวุฒิ ฐิติปราโมทย์ อาจารย์ที่ปรึกษา

natthawut.thi@mfu.ac.th

สำนักวิชา วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ดร.ธรณ์ธันย์ สว่างวรรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

thornthans@rumail.ru.ac.th

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

Mae Fah Luang University

บทคัดย่อ

การหมักรำข้าวหอมมะลิสายพันธุ์ 105 ด้วยเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3102 แบบของแข็ง (solid state fermentation) เป็นเวลา 30 วัน โดยปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 ทั้งนี้ได้ทำการสกัดรำข้าวด้วยตัวทำละลายเมทานอลร่วมด้วย จากนั้นนำน้ำหมักรำข้าวและสารสกัดรำข้าวมาวิเคราะห์หาปริมาณและความเข้มข้นของน้ำตาลที่ละลายได้ ศึกษาประสิทธิภาพและปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส พร้อมทั้งศึกษาองค์ประกอบของน้ำหมักรำข้าวด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้กรดแกลลิก กรดแอสคอร์บิค และกรดโกจิกเป็นสารมาตรฐาน ผลการศึกษาพบว่า จากวันแรกของการหมักกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมักในวันที่ 30 ค่า pH ลดต่ำสุดที่ 3.1±0.70 โดยปริมาณและความเข้มข้นของน้ำตาลที่ละลายได้ ในน้ำหมักรำข้าวเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น ผลการศึกษาสารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสในน้ำหมักรำข้าว พบว่าช่วงการหมักวันที่ 7 มีปริมาณสูงสุดคือ 34.82±0.84 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร 78.42±0.32 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อมิลลิลิตร และร้อยละ 38.70±0.21

ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดรำข้าวด้วยเมทานอลมีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเท่ากับ 37.24±1.78 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร 86.67±0.53 มิลลิกรัมสมมูลโทรล็อกซ์ต่อมิลลิลิตร และร้อยละ 36.12±1.99 เมื่อพิจารณาโครมาโตแกรมของน้ำหมักรำข้าวและสารสกัดรำข้าวด้วยเมทานอล พบว่ามีปริมาณกรดแกลลิก 16.07 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดโกจิก 20.04 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่พบกรดแอสคอร์บิค โดยสารสกัดรำข้าวด้วย เมทานอลมีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าในน้ำหมักรำข้าวด้วยเชื้อรา ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการหมักรำข้าวด้วยเชื้อราให้ประสิทธิภาพและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงใกล้เคียงกับการสกัดด้วยตัวทำละลายทางเคมี ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในเครื่องสำอางและยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของรำข้าวให้แก่เกษตรกรอีกด้วย

คำสำคัญ: น้ำหมักรำข้าว/รำข้าว/สารฟีนอลิก/ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ/ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

Abstract

Jasmine 105 Rice bran was fermented in solid state using *Aspergillus oryzae* TISTR3102 for 30 days at 30 ^{o}C and adjusted to pH 6.0, the fermented rice bran was determined by the physical chemical and biological characteristics of phenolic compounds, antioxidant activity and tyrosinase inhibitory activity. As well as the chromatogram of these fermented rice bran were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that when the fermentation process increased, pH decreased, total sugar content and the amount of sugar concentration dissolved in fermented rice bran increased. While the phenolic compounds antioxidant activity and tyrosinase inhibition activity increased from of the fermentation process at day 0 to day 7 and decreased when the fermentation process at day 8 to day 30 reaching their maximum values by the fermentation for 7 days at 34.82±0.84 mg GAE/ml 78.42±0.32 mgTAEC/ml, 38.70±0.21%, respectively, the investigation on chromatogram of these fermented rice bran by HPLC found that there is a significant amount of gallic acid 16.07 mg/l, kojic acid 20.04 mg/l but not found ascorbic acid. The rice extract by methanol results showed that the phenolic compounds antioxidant activity and inhibition of tyrosinase activity at 3 7.24. 6 4 ±1.78 mg GAE / ml, 86.67±0.53 mg TAEC/ ml and 36.12±1.99 % . Therefore, improved rice bran has the potential to be used as an ingredient in cosmetic formulation and high value added for agricultural product.

Mae Fah Luang University

Keywords: Fermented Rice Bran/Rice Bran/Phenolic Compound/Antioxidant Activity/
Inhibition of Tyrosinase Activity

บทนำ

ปัจจุบันสารสกัดธรรมชาติเป็นที่นิยมอย่างมากในสังคมโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มผู้รักสุขภาพซึ่งต่างมุ่งหมายการบริโภคผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติ อย่างเช่น เครื่องสำอางออร์แกนิก เนื่องจากให้ความรู้สึกปลอดภัย ไม่มีการใช้ยาปฏิชีวนะและไม่มีสารเจือปนในกระบวนการผลิตและการจัดการ ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติสามารถผลิตได้จากพืชหลายชนิด เช่น ว่านหางจระเข้ ชะเอมเทศ ธัญพืชต่าง ๆ รวมทั้งข้าว (สุพัทธยา กันภัย , 2557)

ข้าว เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญและเป็นอาหารหลักของชาวไทย ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตปริมาณสูง ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ ในประเทศไทยมีการปลูกข้าวหลากหลายสายพันธุ์ซึ่งให้คุณประโยชน์ที่แตกต่างกัน พันธุ์ข้าวไทย ที่มีชื่อเสียงระดับโลกคือ ข้าวหอมมะลิ (Thai jasmine rice) ดังนั้นเมื่อมีการปลูกข้าวในปริมาณมากทำให้ได้รำข้าวซึ่งเป็นของเสียจากกระบวนการสีข้าวเพิ่มขึ้น โดยทั่วไปเกษตรกรจะนำรำข้าวไปเป็นอาหารสัตว์ซึ่งไม่สามารถเพิ่มมูลค่าได้ ทั้งนี้การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธีการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ถือเป็นเทคโนโลยีหนึ่งที่เปลี่ยนวัตถุดิบที่เป็นผลิตผลทางการเกษตรให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้นได้โดยไม่ใช้สารเคมี ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งหมายเพื่อหมักรำข้าวโดยอาศัยกระบวนการย่อยของเชื้อราทำให้เกิดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการใช้ในทางเครื่องสำอางและสามารถประยุกต์ใช้ในด้านอื่น ๆ เป็นการสร้างรายได้แก่เกษตรกรได้เป็นอย่างมาก

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการเตรียมน้ำหมักรำข้าว ศึกษาประสิทธิภาพและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักที่ได้จากกระบวนการหมักรำข้าว

ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาและวิเคราะห์ ปริมาณ และชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมทั้งประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากกระบวนการหมักรำข้าวหอมมะลิสายพันธุ์ 105 ด้วยเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3102

Mae Fah Luang University

การทบทวนวรรณกรรม

รำข้าว คือ เปลือกนอกที่หุ้มเมล็ดข้าว ได้จากการขัดสีข้าวกล้องให้มีสีขาว เรียกว่า ข้าวสาร ซึ่งรำข้าวส่วนนี้เป็นอาหารสุขภาพที่ดีมากอีกอย่างหนึ่งมีทั้งโปรตีน วิตามิน คาร์โบไฮเดรต ที่อยู่รวมกับเม็ดแป้งเป็นองค์ประกอบโดยส่วนใหญ่ของข้าวเป็นแหล่งพลังงานหลักที่สิ่งมีชีวิตสามารถนำไปใช้ (กิตติมา ไตรรัตนศิริชัย และสาโรจน์ รอดคืน, 2555)

การหมักเป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางอินทรียสารโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้ได้เซลล์เพิ่มขึ้นซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ การหมักมี 3 ประเภทได้แก่การหมักแบบของแข็ง (solid state fermentation) การหมักแบบของเหลว (submerged state fermentation) และการหมักแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semisolid state fermentation)

งานวิจัยของ (Melissa ,2012) ได้ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกและสารต้านอนุมูลอิสระในรำข้าวหมักด้วยเชื้อ *Rhizopus oryzae* CTT 1217 พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกร้อยละ 58.6 มีความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้นต่ำสุด ตามลำดับ ดังนั้นเห็นได้ว่าสารประกอบฟีนอลิกและสารต้านอนุมูลอิสระในรำข้าวหมักด้วยเชื้อ *Rhizopus oryzae* CTT 1217 มีประสิทธิภาพที่ดีสามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ ต่อไป

งานวิจัยของ (Anisah , 2014) ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนส และยับยั้งเอนไซม์อิลาสเตสของสารที่ได้จากการหมักรำข้าวด้วยเชื้อรา 2 สายพันธุ์ คือ *Monascus purpureus* และ *Aspergillus niger* วิเคราะห์สารด้วย HPLC พบว่ามีส่วนประกอบของกรดเฟอร์รูลิค (ferulic acid) ที่เกี่ยวข้องกับทางเครื่องสำอาง ประมาณ 2 ถึง 5 เท่าในสารจากการหมักทั้งหมดเมื่อเทียบกับสารสกัดที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการหมัก ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธีการหมักมีความสามารถและประสิทธิภาพเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างรำข้าว

นำรำข้าวมาคัดเลือกสิ่งสกปรกออก นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะเวลา 15 นาที พักให้เย็นจากนั้นนำไปใช้ในกระบวนการหมักต่อไป

2. ขั้นตอนการวิจัย

2.1 กระบวนการหมักรำข้าวโดยเชื้อรา

ชั่งรำข้าวใส่ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) 1 กิโลกรัม เติมเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3102 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ปรับ pH เท่ากับ 6.0 ด้วย 0.1 โมล

Mae Fah Luang University

Calcium chloride และ 0.1 โมล Lactic acid เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดทำการกรองแยกรำข้าวออก ต้มฆ่าเชื้อในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

2.2 การสกัดรำข้าวโดยใช้ตัวทำลายเมทานอล

ชั่งรำข้าว 100 กรัม แช่ในเมทานอล 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กวนโดยใช้เครื่องกวนสาร (hot plate stirrer) ที่อุณหภูมิห้อง กรองรำข้าวออกจากตัวทำละลายจากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารสุญญากาศ (rotary evaporator)

2.3 การทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อรา

ปิเปตน้ำหมักรำข้าวลงบนผิวหน้าอาหาร Potato dextrose agar ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เกลี่ยให้ทั่ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดูการเจริญของเชื้อราบนผิวหน้าอาหาร แสดงผลในรูปแบบของเครื่องหมาย A (active) มีการเจริญของเชื้อราและเครื่องหมาย NA (non-active) ไม่มีการเจริญของเชื้อรา

2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Total sugar phenol sulfuric method

ปิเปตน้ำหมักรำข้าว 0.25 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมฟีนอลร้อยละ 5 โดยปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริกร้อยละ 95 โดยปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader วิเคราะห์โดยการคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

วัดปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ทั้งหมดโดยหยดน้ำหมักรำข้าวลงบนเครื่อง Refractometer จำนวน 1 หยด อ่านค่าและแสดงผลในหน่วยร้อยละโดยน้ำหนักองศาบริกซ์

2.5 การวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกโดยวิธี Folin-Ciocalteu method

ปิเปตน้ำหมักรำข้าว ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติม Folin & Ciocalteu' phenol reagent 200 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 260 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 8 นาที จากนั้นปิเปต Na_2CO_3 ร้อยละ 7 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บในที่มืด 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader วิเคราะห์โดยการคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกรดแกลลิก

2.6 การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging activity

ปิเปตน้ำหมักรำข้าว 60 ไมโครลิตร และเติม 0.3 มิลลิโมลาร์ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 540 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บในที่มืดอุณหภูมิห้อง 30 นาที ปิเปตสารละลายดังกล่าวปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงใน 96 well microplate นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader โดยใช้ 0.3 มิลลิโมลาร์ DPPH (2,2-diphenyl-1-

Mae Fah Luang University

picrylhydrazyl) ผสมกับเมทานอลเป็นสารละลายควบคุม เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์

2.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง enzyme tyrosinase โดยใช้วิธี dopachrome method

ปิเปต 10 มิลลิโมลาร์ L-dopa ปริมาตร 40 ไมโครลิตรร่วมกับน้ำหมักรำข้าว ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Mushroom tyrosinase (100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ 0.1 โมล phosphate buffer (pH 6.8) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ใน 96-well microplates ผสมให้เข้ากันวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงอีกครั้งที่ความยาวคลื่นเดิม และเตรียมสารละลายวิธีเดียวกันโดยไม่ใช้น้ำหมักรำข้าวเพื่อเป็นสารละลายควบคุม คำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดโกจิก (kojic acid)

2.8 ศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดด้วยเครื่อง High Performance LiquidChromatography (HPLC)

นำน้ำหมักรำข้าวมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบด้วยเครื่อง HPLC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผ่านลงในคอลัมน์วิเคราะห์ XBridge C18 (3.5µm, 150mm x 4.6 mm) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้น้ำร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก กรดฟอร์มิคและเมทานอลเป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ ที่อัตราเร็ว 0.7 มิลลิลิตร/นาที ทำการตรวจสัญญาณโครมาโตแกรมด้วยเครื่อง UV detecter ที่ความยาวคลื่น 280 และ 325 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค กรดแกลลิก และกรดโกจิก

2.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ ANOVA และทดสอบความแตกต่างเป็นรายคู่ด้วยวิธี Duncan ‘new multiple rang test ($p<0.05$, n=5)

ผลการวิจัย

1. ลักษณะทางกายภาพ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำหมักรำข้าว

การหมักรำข้าวด้วยเชื้อราเป็นเวลา 30 วัน มีลักษณะทางกายภาพดังแสดงในตารางที่ 1 น้ำหมักรำข้าวมีค่า pH เริ่มต้น 6.0 กระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมักมีค่า pH ลดลงต่ำสุดที่ 3.1±0.70 โดยรำข้าวที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อรามีลักษณะสีขาวขุ่น ขณะที่รำข้าวที่สกัดด้วยเมทานอลมีสีน้ำตาลข้น เมื่อต้มฆ่าเชื้อน้ำหมักที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 20 นาที สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อราได้ ดังเช่นงานวิจัยของ (Mongkontanawat & Lertnimitmongkol, 2015) พบว่าการให้ความร้อนที่อุณหภูมิตั้งแต่ 60 องศาเซลเซียสสามารถหยุดการเจริญของเชื้อราได้ และมีปริมาณน้ำตาลในน้ำหมักรำข้าวและสารสกัดด้วยเมทานอลสูงสุดที่ 30.86±0.17, 27.10±4.73 มิลลิกรัม

Mae Fah Luang University

ต่อมิลลิลิตรและความเข้มข้นของน้ำตาลที่ละลายได้มากกว่าร้อยละ 30 โดยน้ำหนักองศาบริกซ์ โดยเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมักเช่นเดียวกับงานวิจัยของ (วิไลลักษณ์ กล่อมพงษ์, 2561) โดยค่า pH ของน้ำหมักลดลงและคงที่เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ขณะเดียวกันที่ระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นมีผลให้ปริมาณและความเข้มข้นของน้ำตาลที่ละลายได้ในน้ำหมักเพิ่มขึ้นเช่นกัน

ตารางที่ 1 ลักษณะทางกายภาพ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำหมัก

วัน	pH	Physical of rice bran fermentation	Contamination testing	Total sugar content (mg/ml)	%w/w brix^{o}
0	6.0±0.04	สีขาวขุ่น	NA	6.18±0.1^{j}	0
1	5.5±0.89	สีขาวขุ่น	NA	8.12±0.2^{i}	2
2	5.0±0.04	สีขาวขุ่น	NA	10.34±0.02^{h}	3
3	4.7±0.05	สีขาวขุ่น	NA	13.59±0.31^{g}	7
4	4.1±0.14	สีขาวขุ่น	NA	15.41±0.17^{f}	12
5	3.7±0.08	สีขาวขุ่น	NA	17.40±0.17^{e}	15
6	3.7±0.04	สีขาวขุ่น	NA	19.31±0.32^{d}	20
7	3.7±0.08	สีขาวขุ่น	NA	23.59±0.18^{c}	30
8	3.7±0.10	สีขาวขุ่น	NA	27.46±0.36^{c}	>30
9	3.7±0.13	สีขาวขุ่น	NA	28.52±0.19^{bc}	>30
10	3.7±0.13	สีขาวขุ่น	NA	29.62±0.39^{ab}	>30
11	3.7±0.13	สีขาวขุ่น	NA	29.97±0.46^{ab}	>30
12	3.7±0.05	สีขาวขุ่น	NA	30.28±0.35^{a}	>30
13	3.7±0.10	สีขาวขุ่น	NA	30.37±0.35^{a}	>30
14	3.7±0.08	สีขาวขุ่น	NA	30.43±0.23^{a}	>30
15	3.7±0.05	สีขาวขุ่น	NA	30.54±0.40^{a}	>30
20	3.5±0.08	สีขาวขุ่น	NA	30.79±0.14^{a}	>30
30	3.1±0.70	สีขาวขุ่น	NA	30.86±0.17^{a}	>30
extract by methanol	6.0±0.04	สีน้ำตาลข้นเหนียว	NA	27.10±4.73^{gh}	>30

Mae Fah Luang University

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ; (n=5)

2. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสในน้ำหมักรำข้าว พบว่าการหมักวันที่ 7 มีปริมาณสูงสุดคือ 34.82±0.8 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร 78.42±0.32 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อมิลลิลิตร และร้อยละ38.70±0.21 ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Anisah , 2014) โดยมีร้อยละการยับยั้งคือ 31.46±7.95 ในขณะที่สารสกัดรำข้าวด้วยเมทานอลมีปริมาณเท่ากับ 37.24±1.78 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร 86.67±0.53 มิลลิกรัมสมมูลโทรล็อกซ์ต่อมิลลิลิตร และร้อยละ 36.12±1.99 ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการศึกษาของ (Arab, Alemzadeh and Maghsoud, 2011) ได้ศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดข้าว 2 สายพันธุ์คือ Fajr และ Tarem ตัวทำละลายที่ใช้คือเมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตท พบว่า การใช้เมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด

ตารางที่ 2 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

วัน	Total phenolic content (mg GAE/ml)	DPPH content (mg TAEC/ml)	Tyrosinase Inhibition (%)
0	5.28 ± 0.14^{m}	7.51 ± 0.36^{o}	0.84 ± 0.01^{o}
1	7.81 ± 3.34^{l}	25.39 ± 0.28^{l}	1.37 ± 0.22^{no}
2	13.59 ± 0.22^{ij}	49.55 ± 0.33^{g}	2.63 ± 0.28^{mn}
3	17.15 ± 0.25^{h}	53.38 ± 0.33^{f}	3.82 ± 0.27^{lm}
4	18.39 ± 0.27^{g}	56.42 ± 0.30^{e}	8.46 ± 0.21^{ij}
5	21.57 ± 0.23^{f}	64.36 ± 0.96^{d}	15.29 ± 0.05^{g}
6	23.36 ± 0.35^{e}	65.56 ± 0.23^{c}	23.12 ± 0.34^{e}
7	34.82 ± 0.84^{b}	78.42 ± 0.32^{b}	38.70 ± 0.21^{a}
8	28.91 ± 0.16^{c}	66.19 ± 2.97^{c}	34.46 ± 0.44^{c}
9	26.84 ± 0.40^{d}	55.48 ± 0.11^{e}	24.88 ± 4.74^{d}
10	22.53 ± 0.35^{ef}	52.47 ± 0.22^{f}	18.62 ± 0.28^{f}
11	18.90 ± 0.10^{g}	52.43 ± 0.31^{f}	12.07 ± 0.30^{h}
12	16.79 ± 0.36^{h}	48.08 ± 0.84^{h}	9.45 ± 0.21^{i}

Mae Fah Luang University

ตารางที่ 2 (ต่อ)

วัน	Total phenolic content (mg GAE/ml)	DPPH content (mg TAEC/ml)	Tyrosinase Inhibition (%)
13	14.35±0.42^{i}	42.65±0.27^{i}	7.67±0.30^{j}
14	12.50±0.27^{j}	38.41±0.30^{j}	5.60±0.30^{k}
15	10.49±0.32^{k}	34.51±0.28^{k}	4.63±0.34^{kl}
20	7.67±0.26^{l}	21.39±0.16^{m}	3.96±0.22^{lm}
30	6.73±0.49^{l}	16.54±0.36^{n}	2.83±0.31^{mn}
extract by methanol	37.24±1.78^{a}	86.67 ±0.53^{a}	36.12±1.99^{b}

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ; (n=5)

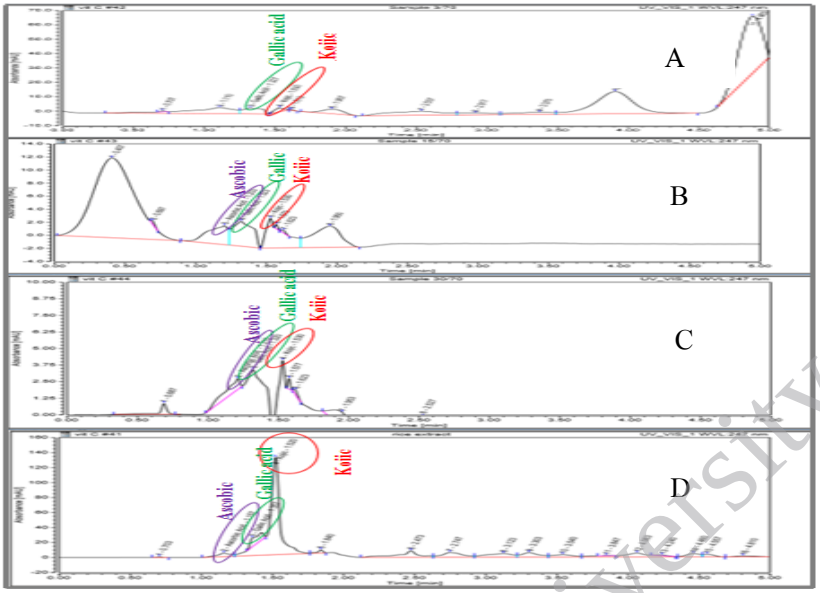
3. การตรวจสอบโดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

การตรวจสอบโดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง กรดแกลลิก กรดแอสคอร์บิก และกรดโกจิกเป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัดรำข้าวด้วยเมทานอลมีปริมาณสารสำคัญสูงกว่าในน้ำหมักรำข้าว (ตารางที่ 3) จากงานวิจัยของ (Dang Lelamurni, 2017) ได้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากการหมักรำข้าว พบว่าน้ำหมักรำข้าวมีสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดได้แก่ กรดโกจิก (kojic acid), กรดอะซิติก (acetic acid), กรดเฟอรูลิก (ferulic acid) กรดพาราคูมาริก (*p*-coumaric acid)

ตารางที่ 3 ปริมาณสารสำคัญของสารสกัดข้าวตรวจสอบโดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

sample	extract by methanol mg/l	fermented extract day 7 mg/l	fermented extract day 15 mg/l	fermented extract day 30 mg/l
Ascobic acid	10.94	Not detect	6.93	1.93
Gallic acid	46.05	16.07	14.95	15.86
Kojic acid	909.02	20.04	31.79	35.56

Mae Fah Luang University



ภาพที่ 1 โครมาโตแกรมของน้ำหมักรำข้าววันที่ 7 (A), 15(B), 30(C) และสารสกัดรำข้าวด้วยเมทานอล(D)

สรุปผลการวิจัย

การหมักข้าวด้วยเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3102 เป็นเวลา 30 วัน ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 และลดลงเมื่อสิ้นสุดการหมัก ขณะที่ปริมาณและความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำหมักรำข้าวเพิ่มขึ้นกระทั่งสิ้นสุดการหมักเช่นกัน ผลการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำหมักรำข้าวให้ผลในทิศทางเดียวกันคือมีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้นของการหมักวันที่ 1-7 และลดลงในการหมักวันที่ 8-30 โดยการหมักวันที่ 7 มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพปริมาณสูงสุดใกล้เคียงกับผลการศึกษาในสารสกัดรำข้าวด้วยเมทานอล ดังนั้นในการเตรียมน้ำหมักจากรำข้าวด้วยเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3102 จึงควรใช้ระยะเวลาในการหมักเพียง 7 วัน นอกจากนี้เมื่อพิจารณาโครมาโตแกรมของน้ำหมักรำข้าวและสารสกัดรำข้าวด้วยเมทานอล พบว่าสารสกัดรำข้าวด้วยเมทานอลมีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าในน้ำหมักรำข้าวด้วยเชื้อรา

ข้อเสนอแนะ

การสกัดน้ำหมักรำข้าวด้วยเชื้อรา เป็นข้อมูลงานด้านวิทยาศาสตร์การหมัก จากผลิตผลทางการเกษตรของไทยที่สามารถนำไปใช้พัฒนาเป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการศึกษาวิจัยเพิ่มเติม ได้แก่ การศึกษาการใช้จุลินทรีย์ในรูปแบบกล้าเชื้อผสมในการหมัก **เช่น**การเติมยีสต์ลงในน้ำหมักเพื่อเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์เนื่องจากปริมาณน้ำตาลที่สูงมีผลต่อความคงตัวในตำรับเครื่องสำอาง และยีสต์ยังสามารถชะลอการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลในน้ำหมักได้

Mae Fah Luang University

รายการอ้างอิง

กิตติมา ไตรรัตนศิริชัย และสาโรจน์ รอดคืน. (2555). *รำข้าว:จากอาหารหมูสู่อาหารเพื่อสุขภาพของคน*. มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง, เชียงราย.

วิไลลักษณ์ กล่อมพงษ์. (2561). *ผลของข้าวเหนียวดำสายพันธุ์พื้นบ้านจังหวัดพัทลุงต่อคุณภาพของข้าวหมากในระหว่างกระบวนการหมัก*. มหาวิทยาลัยทักษิณ, พัทลุง.

สุพัทธยา กันภัย. (2557). *การพัฒนาสารสกัดมาตรฐานจากเศษข้าวหอมมะลิพันธุ์ 105 เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ*. มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง, เชียงราย.

Anisah, J. (2014). Effect of fungal fermentation on tyrosinase and elastase inhibition activity in rice bran. *Agriculture and Agricultiral Science Procedia*, *2*, 252-256.

Arab, F., Alemzadeh, I. & Maghsoud, V. (2011). Determination of antioxidant component and activity of rice bran extract. *Science Iranica*, *18*, 1402-1406.

Dang Lelamurni A. R. (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*, 127-134.

Melissa dos, S. (2012).Phenolic compounds and antioxidante activity in fermented rice (*Oryza sativa*) bran. *food science and technology*, *32*(3), 531-537.

Mongkontanawat, N. & Lertnimitmongkol, W. (2015). Product Development of Sweet Fermented Rice (Khao-mak) from Geminated Native Black Glutinous Rice. *Journal of Agricultural Technology*, *11*(2), 501-515.

Mae Fah Luang University