

1. บทนำ

ข้าว (rice, *Oryza sativa* Linn.) ถือว่าเป็นหนึ่งในผลิตผลทางการเกษตรที่สำคัญที่สุดในประเทศไทย ทั้งเพื่อการส่งออกและการบริโภคภายในประเทศ โดยประชากรในภูมิภาคต่างๆ ในประเทศไทยได้มีการนำภูมิปัญญาท้องถิ่นมาประยุกต์ใช้เพื่อแปรรูปข้าวให้อยู่ในรูปแบบของผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่เหมาะสมกับการบริโภค เช่น การนำข้าวมาตากให้มีความนุ่มและรสชาติดีขึ้น หรือการนำข้าวมาคั่วเพื่อให้มีกลิ่นหอมที่เหมาะสมกับการนำไปปรุงแต่งอาหารหรือนำมาเป็นเครื่องดื่ม นอกจากนี้ ข้าวแปรรูปดังกล่าวยังถือว่ามีศักยภาพในการที่จะนำไปพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพได้อีกด้วย อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าผลิตภัณฑ์จากข้าวแปรรูปจะได้รับการยอมรับเป็นอย่างดีทั้งในด้านรสชาติ รสสัมผัส และการประยุกต์ใช้ในรูปแบบต่างๆ แต่ก็ยังไม่มีผลพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์อย่างแน่ชัดที่บ่งบอกถึงปริมาณสารสำคัญ กิจกรรมทางชีวภาพ และความอยู่ตัวของสารสำคัญในข้าวแปรรูป การนำสารสำคัญต่างๆ ในข้าวมาพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์จะช่วยให้มีความรู้และความเข้าใจในผลิตภัณฑ์ข้าวแปรรูปได้ดีขึ้น เพื่อจะนำความรู้ดังกล่าวไปต่อยอดเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์จากข้าวให้ได้รับการยอมรับและมีศักยภาพเพื่อเป็นอาหารหรือองค์ประกอบที่สำคัญในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพรูปแบบต่างๆ ซึ่งการพัฒนาดังกล่าวยังจะช่วยยกระดับคุณค่าของข้าวพื้นเมืองของไทย ให้ได้รับการยอมรับในวงกว้างของเวทีตลาดโลก

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงได้นำข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ที่เพาะปลูกในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย ได้แก่ ข้าวดอกมะลิ กข105 ข้าวเหนียว กข6 ข้าวหอมแดง (หอมมะลิแดง) และข้าวเก่า (ข้าวเหนียวดำ) มาทำการแปรรูปให้อยู่ในข้าวกล้องงอก (ข้าวเปลือกที่ผ่านการกะเทาะเปลือกให้เป็นข้าวกล้อง แล้วนำมาผ่านการงอก) ข้าวฮาง (ข้าวเปลือกที่นำมางอกทั้งเปลือก) และข้าวคั่ว จากนั้นนำมาทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 วัน เพื่อทดสอบหาปริมาณและกิจกรรมของสารสำคัญ (สารต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก สาร GABA สาร Glutathione และคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์) ที่มีอยู่ในสารสกัดจากข้าวพื้นเมืองที่ผ่านการแปรรูป และความคงตัวของสารสำคัญนั้นในช่วงระยะเวลาของการเก็บรักษา

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (สารต้านอนุมูลอิสระ, สารประกอบฟีนอลิก, GABA และ Glutathione) และคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสารสกัดจากข้าวพื้นเมืองที่ผ่านการแปรรูป
- 2) เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาข้าวพื้นเมืองที่ผ่านการแปรรูปเพื่อให้คงปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์

3. การทบทวนวรรณกรรม

ข้าว (rice, *Oryza sativa* Linn.) จัดอยู่ในวงศ์ Gramineae ถือว่าเป็นพืชเศรษฐกิจหลักของประเทศไทย ทั้งในด้านการส่งออกและการบริโภคภายในประเทศ ข้าวที่รับประทานภายในประเทศมีหลายพันธุ์ เช่น ข้าวดอกมะลิ (jasmine rice หรือ Khao Dawk Mali 105) ซึ่งเป็นข้าวที่ได้รับความนิยมสูงสุด ข้าวเหนียว

(sticky rice หรือ RD6) ข้าวหอมแดง (red hawn rice) และข้าวเหนียวดำหรือข้าวกำ (purple rice) เป็นต้น ในหลายจังหวัดของประเทศไทยก็มีการเพาะปลูกข้าวพันธุ์พื้นเมืองมากมาย โดยแต่ละพันธุ์จะมีคุณค่าทางอาหารแตกต่างกันไป (ตาราง ก) เป็นที่รู้กันดีอยู่แล้วว่า เมล็ดข้าวเป็นอาหารที่อุดมไปด้วยสารอาหารมากมาย แต่โดยทั่วไปเมล็ดข้าวที่มีเม็ดสีมักจะถูกพบว่ามีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าเมล็ดข้าวที่ไม่มีสี (Choi et al., 2007, Sharma and Gujral, 2010) สารประกอบฟีนอลิกที่พบในเมล็ดข้าวที่มีเม็ดสี ได้แก่ flavonoids และ anthocyanins และในเมล็ดข้าวบางพันธุ์ก็จะพบ proanthocyanidins อีกด้วย มีรายงานว่า สารประกอบฟีนอลิกในธัญพืชสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราได้ (Viswanath et al., 2009) นอกจากนี้ สารประกอบฟีนอลิกที่พบในเมล็ดข้าวนี้ก็ยังมียับยั้งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ และอาจจะมียับยั้งในการลดภาวะความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเรื้อรังที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ เช่น มะเร็ง เบาหวาน โรคหัวใจ และโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเส้นประสาท (Massaretto et al., 2011, Vichapong et al., 2010, Butsat and Siriamornpun, 2010, Shen et al., 2009) นอกจากนี้ ในเมล็ดข้าวยังมีการค้นพบสารประเภท Glutathione ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระประเภทหนึ่ง ที่มีบทบาทในการลดความเป็นพิษที่เกิดจากประจุโลหะหนัก เช่น แคดเมียมและทองแดง (Zhang and Ge, 2008, Jiménez and Speisky, 2000) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์ตับที่มีหน้าที่กำจัดสารพิษ การมีปริมาณ Glutathione ในเซลล์ต่ำเกินไป อาจส่งผลให้ calcium homeostasis ในเซลล์เกิดความผิดปกติและนำไปสู่การตายของเซลล์ (Lima et al., 2006)

ข้าวที่คนไทยรับประทานเป็นอาหารหลักมาช้านาน คือ ข้าวดอกมะลิ ซึ่งมักจะอยู่ในรูปเมล็ดข้าวขาวซึ่งผ่านการกะเทาะเปลือกแล้วขัดสีจนมีสีขาว (white rice, WR) แต่ในปัจจุบัน ผู้บริโภคหันมานิยมเมล็ดข้าวในลักษณะที่ผ่านการกะเทาะเปลือกและขัดสีน้อยซึ่งทำให้มีเปลือกสีน้ำตาลอ่อนหรือที่เรียกว่าข้าวกล้อง (brown rice, BR) ที่ถูกพบว่ามีคุณค่าทางอาหารสูงกว่าข้าวขาว เนื่องจากเมล็ดข้าวกล้องยังคงมีส่วนของจมูกข้าวและเยื่อหุ้มเมล็ดเหลืออยู่ ซึ่งเป็นแหล่งของสารอาหารต่างๆ เช่น โยอาอาหาร วิตามินบี วิตามินอี เป็นต้น จึงช่วยในการขับถ่าย ช่วยป้องกันโรคเหน็บชาและอาการปากนกกระจอก และยังมีคุณสมบัติของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติอีกด้วย อย่างไรก็ตาม เมล็ดข้าวกล้องยังคงมีเยื่อโยอาอาหารอยู่สูง จึงทำให้เมื่อปรุงแล้ว จะยังคงมีเนื้อสัมผัสค่อนข้างแข็งซึ่งทำให้ยากต่อการรับประทาน ด้วยเหตุนี้ เมล็ดข้าวกล้องจึงได้รับการพัฒนาให้อยู่ในรูปของเมล็ดข้าวกล้องงอก (germinated brown rice, GBR) ซึ่งเมื่อผ่านการปรุงแล้วจะมีความนุ่มมากกว่า โดยนำเมล็ดข้าวกล้องไปแช่น้ำที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นการงอก ซึ่งในช่วงนี้จะทำให้ hydrolytic enzymes ในเมล็ดข้าวได้รับการกระตุ้นปฏิกิริยาทางชีวเคมี ทำให้เกิดการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในเมล็ดให้กลายเป็น simple sugars และ oligosaccharides นอกจากนี้ โปรตีนที่ถูกเก็บอยู่ในเมล็ดก็จะถูกย่อยเป็น amino acids และ peptides (Saman et al., 2008) และมีการผลิตและสะสมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ได้แก่ ascorbic acids, tocopherols, tocotrienols, phenolic compounds ซึ่งมีคุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระ (Fernandez-Orozco et al., 2008, Frias et al., 2005, Tian et al., 2004, Sharma and Gujral, 2010) ในกระบวนการงอกนี้ ยังมีการผลิต γ -aminobutyric acid (GABA), ferulic acid, magnesium, potassium, zinc, prolylendopeptidase inhibitor และ γ -orazynol เป็นต้น (Kayahara et al., 2000) โดยสารดังกล่าวได้รับการสนับสนุนว่าเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณประโยชน์มากมาย เมื่อเกิดการงอกแล้ว เมล็ดข้าวจะถูกหยุดปฏิกิริยาโดยการใช้ความร้อน (การนึ่ง) และทำให้แห้งเพื่อการเก็บและบริโภคต่อไป (Moongngarm and Saetung, 2010) แท้จริงแล้ว เทคนิคการผลิตเมล็ดข้าวกล้องงอกนั้น มีการคิดค้นขึ้นในประเทศไทยและหลายประเทศในแถบเอเชียมาช้านาน นอกจากนี้ก็มีความเป็นไปได้ว่า คน

ในสมัยโบราณเองก็มีการบริโภคข้าวกล้องงอกอย่างแพร่หลาย และมีการค้นพบว่า สาร GABA ในเมล็ดข้าวกล้องงอกนั้นมีคุณสมบัติลดความดันเลือดและบรรเทาอาการนอนไม่หลับในผู้ที่อยู่ในช่วงวัยทอง (Shoichi, 2004) มีงานวิจัยมากมายที่มีการพบคุณค่าทางโภชนาการและประโยชน์ของเมล็ดข้าวกล้องงอกเพื่อการบำบัดรักษาทางการแพทย์ เช่น บรรเทาภาวะเสี่ยงต่อโรคเบาหวานในอาสาสมัคร (Zhang et al., 2010a) ลดน้ำตาลในเลือดของหนูที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน (Hagiwara et al., 2004, Seki et al., 2005) ลดอาการซึมเศร้าของหนูทดลอง (Mamiya et al., 2007) สามารถแก้ไขภาวะความจำเสื่อมในหนูวัยรุ่นที่ได้รับพิษจากตะกั่ว (Zhang et al., 2010b) ซึ่งมีงานวิจัยที่บ่งชี้ว่าคุณประโยชน์ของข้าวดังกล่าว มาจากการที่ข้าวนั้นอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย เช่น สาร GABA ที่เป็นองค์ประกอบหนึ่งของสารเคมีสื่อประสาทในสมอง (Tian et al., 2004, Sharma and Gujral, 2010, Kayahara et al., 2000)

ผลิตภัณฑ์ข้าวงอกอีกประเภทหนึ่งที่เป็นที่นิยมในจังหวัดแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย คือ ข้าวฮาง (Khao Hang หรือ germinated rough rice, GRR) โดยมีขั้นตอนการผลิตที่แตกต่างจากข้าวกล้องงอก ซึ่งการทำข้าวฮางจะใช้เมล็ดข้าวเปลือกในช่วงก่อนที่จะถึงระยะเวลาเก็บเกี่ยวเล็กน้อย นำมาแช่น้ำเพื่อกระตุ้นให้งอก จากนั้นจึงนำมานึ่งและทำให้แห้ง แล้วนำไป กะเทาะเปลือกแล้วขัดสีเช่นเดียวกับข้าวเปลือกทั่วไป จึงนับได้ว่า ข้าวฮางมีเอกลักษณ์ของไทยซึ่งต่างจากข้าวฮางที่พบในประเทศอื่นๆ (ชนิษฐา ทานีฮิล, 2552) เมื่อไม่นานมานี้ Moongngarm and Saetung (2010) ได้ค้นพบว่า เมล็ดข้าวฮางมีคุณค่าทางอาหารสูงกว่าเมล็ดข้าวกล้องงอก โดยเมล็ดข้าวฮางมีวิตามินบี (thiamine, niacin, pyridoxine) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (total phenolic compounds, phytic acid, α -tocopherol และ γ -oryzanol) และกรดอะมิโนสูงกว่า โดยเฉพาะ leucine, lysine, GABA และ glycine นอกจากนี้ เมล็ดข้าวฮางยังมีอัตราการงอกสูงกว่าเมล็ดข้าวกล้องงอกอีกด้วย อย่างไรก็ตาม แม้จะมีการค้นพบว่าในเมล็ดข้าวฮางมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในปริมาณที่สูงกว่าเมล็ดข้าวกล้องงอก แต่ก็ยังไม่มีการศึกษาวิจัยมากนักที่กล่าวถึงประโยชน์ของข้าวฮางทั้งในเชิงการบำบัดรักษาทางการแพทย์และเชิงเครื่องสำอาง

ในประเทศแถบเอเชีย โดยเฉพาะประเทศญี่ปุ่นและเกาหลี ได้มีการแปรรูปข้าวบาร์เลย์เพื่อเป็นข้าวคั่ว (roasted rice, RR) ที่ใช้ทำชาข้าว โดยในภาษาญี่ปุ่นเรียกชาข้าวว่า Mugicha และในภาษาเกาหลีเรียกว่า Boricha ซึ่งเป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะในช่วงเวลาที่มีอากาศร้อน การผลิตข้าวคั่วเพื่อใช้ทำชาข้าวนี้ วิธีดั้งเดิมจะใช้การคั่วข้าวทั้งเปลือก แต่ในปัจจุบันมีการประยุกต์ให้ง่ายขึ้นโดยใช้ข้าวที่ผ่านการกะเทาะเปลือกมาก่อนแล้วก็ได้ และเมื่อนำมาคั่วและทำการต้มให้อยู่ในรูปของชา ก็พบว่ามีรสชาติใกล้เคียงกับการใช้ข้าวคั่วทั้งเปลือก มีรายงานว่า เมล็ดธัญพืชที่ผ่านการคั่วมาแล้วนั้น สามารถเก็บรักษาได้นานและมีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณมาก โดยเฉพาะเมล็ดธัญพืชที่มีปริมาณกรดไขมันอยู่สูง (Gelmez et al., 2009, Krings and Berger, 2001, Krings et al., 2006)

ดังนั้น การศึกษาวิจัยเพื่อแปรรูปข้าวพื้นเมืองของไทยให้อยู่ในรูปข้าวกล้องงอก ข้าวฮางและข้าวคั่ว และเพื่อวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สาร γ -aminobutyric acid (GABA) สาร Glutathione และสารยับยั้งจุลินทรีย์ ที่อยู่ในข้าวที่ผ่านการแปรรูปดังกล่าวในแต่ละช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษา จะสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากข้าวพื้นเมืองไทย ซึ่งอาจจะใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่มีประโยชน์เชิงการแพทย์และบำบัดรักษา เช่น มีสารอาหารที่มีประโยชน์มากขึ้น สามารถลดอนุมูลอิสระ บำรุงระบบประสาทและสมอง ด้านการติดเชื้อ หรือสามารถใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่สามารถลดอนุมูลอิสระและด้านการติดเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งงานวิจัยในปัจจุบัน ส่วนใหญ่จะเน้นไปที่การศึกษาด้านประโยชน์ทางโภชนาการของข้าว

ที่ผ่านการแปรรูป แต่ยังไม่มีการวิจัยมากนักที่เน้นทางด้านสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ที่อาจจะมีความบอบบางเชิงการแพทย์และเครื่องสำอาง นอกจากนี้ ยังไม่มีการวิจัยมากนักที่ระบุว่า ข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ที่ผ่านการแปรรูปมาแล้วนั้น สามารถระดับปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้นานเท่าใด ดังนั้น ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้อาจใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์เชิงการแพทย์และเครื่องสำอาง และอาจเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบทางการเกษตรของประเทศไทย ทั้งยังสามารถช่วยส่งเสริมเอกลักษณ์ข้าวพื้นเมืองของไทย ให้เป็นที่รู้จักมากขึ้นในระดับสากล

ตาราง ก. คุณค่าทางโภชนาการของข้าวกล้องพื้นบ้านเปรียบเทียบกับข้าวกล้องทั่วไป

ชื่อพันธุ์	คุณค่าทางโภชนาการ (หน่วย :มิลลิกรัม/100 กรัม)				
	เหล็ก	ทองแดง	เบต้าแคโรทีน	ลูทีน	วิตามินอี
ค่าเฉลี่ยข้าวทั่วไป	0.42	0.1	ไม่พบ	ไม่พบ	0.03
หน่วยเชื้อ - นครศรีธรรมราช	1.22	0.5	0.0052	0.0144	0.7873
กำแพงเพชร - ยโสธร	0.95	0.08	0.0118	0.2401	0.1946
หอมมะลิแดง - ยโสธร	1.2	0.43	0.003	0.0091	0.3366
หอมมะลิ - ทุ่งกุลาร้องไห้	1.02	ไม่พบ	0.0031	0.0095	0.3766
เล่าแตก - กาฬสินธุ์	0.91	0.06	0.0049	0.0085	0.3092
หอมทุ่ง* - อุบลราชธานี	0.26	0.38	ไม่พบ	ไม่พบ	0.0118
ป้อมแก้ว* - มหาสารคาม	0.24	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	0.0089
ช่อชิง - สงขลา	0.8	ไม่พบ	0.0041	0.0103	0.1788
มันเป็ด* - อุบล	0.2	ไม่พบ	ไม่พบ	0.0045	0.026
ปากอำปิล* - สุรินทร์	0.46	ไม่พบ	ไม่พบ	0.0036	0.0226

หมายเหตุ: *ข้าวขัดขาว; วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการโดยสถาบันวิจัยโภชนาการ ม.มหิดล

ที่มา: แผนงานฐานทรัพยากรอาหาร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ (สสส.) (2551)

4. การออกแบบการวิจัย

การออกแบบการวิจัย

ตัวแปรต้น

- ข้าวพื้นเมืองที่ใช้ในงานวิจัย เป็นข้าวที่ได้มาจากเพาะปลูกในภูมิภาคแถบตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย
- การแปรรูปข้าวพื้นเมืองในรูปข้าวกล้องงอก ข้าวฮาง และข้าวคั่ว
- การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 วัน

ตัวแปรตาม

- ปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในผลิตภัณฑ์ข้าวพื้นเมือง สารต้านอนุมูลอิสระ, สารประกอบฟีนอลิก, GABA และ Glutathione)
- กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์

ตัวแปรควบคุม

- พันธุ์ข้าว ได้แก่ ข้าวดอกมะลิ กข.105 ข้าวเหนียว กข.6 ข้าวหอมแดง (หอมมะลิแดง) และข้าวเก่า (ข้าวเหนียวดำ)
- วิธีการแปรรูปข้าวพื้นเมือง
- เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus pyogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* และ *Enterococcus faecalis* (มีอีกชื่อว่า *Streptococcus faecalis*)
- สารมาตรฐานเพื่อการทดสอบกิจกรรมและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ, สารประกอบฟีนอลิก, GABA และ Glutathione

การออกแบบการทดลอง

การวิจัยนี้ถูกออกแบบในรูปแบบ Complete random design (CRD) โดยทำซ้ำไม่ต่ำกว่า 3 ครั้ง และข้อมูลที่ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี One Way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$ เพื่อเปรียบเทียบระหว่างข้าวแต่ละพันธุ์

5. ขอบเขตของการวิจัย

ข้าวพื้นเมืองที่ใช้ในงานวิจัยเป็นข้าวที่ได้มาจากเพาะปลูกโดยเกษตรกรในภูมิภาคแถบตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งจะนำมาแปรรูปเป็นข้าวกล้องงอก ข้าวฮางและข้าวคั่วภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ และทำการทดสอบโดยใช้สารเคมี อุปกรณ์ เครื่องมือ ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการของคณะเทคโนโลยีและศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ยกเว้น การทดสอบหาปริมาณสาร GABA ซึ่งตัวอย่างจะถูกส่งไปที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. ระเบียบวิธีวิจัย

กรอบแนวคิด ทฤษฎี ที่เกี่ยวข้องและนำมาใช้สนับสนุนการวิจัย

- 1) ข้าวไทยเป็นอาหารที่อุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย โดยเฉพาะสารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ (เช่น oryzanols, phenolic compounds, tocotrienols, tocopherols, ascorbic acids)

- และเมล็ดข้าวที่ไม่ได้รับการขัดสีมากเกินไป ซึ่งยังมีส่วนเยื่อหุ้มเมล็ด (รำข้าว) คงอยู่ จะมีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่าเมล็ดข้าวที่ผ่านการขัดสีจนขาว (Butsat and Siriamornpun, 2010)
- 2) สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ที่อยู่ในเมล็ดธัญพืชโดยเฉพาะในส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Viswanath et al., 2009)
 - 3) เมล็ดข้าวที่มีเม็ดสี มักจะถูกพบว่ามีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเมล็ดข้าวที่ไม่มีสี เพราะเม็ดสีในเมล็ดข้าวได้แก่ flavonoids, anthocyanins และ proanthocyanidins มีทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญในเมล็ดข้าว (Choi et al., 2007, Sharma and Gujral, 2010)
 - 4) สาร GABA และ Glutathione เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบได้ทั้งในเมล็ดข้าวและเมล็ดข้าวที่ผ่านการงอก แต่ข้าวแต่ละชนิดจะมีปริมาณสารเหล่านี้แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับคุณลักษณะของเมล็ดและการสภาวะในการเพาะปลูก (Tian et al., 2004, Sharma and Gujral, 2010, Kayahara et al., 2000, Lima et al., 2006)
 - 5) การแปรรูปเมล็ดข้าวโดยการกระตุ้นให้เกิดการงอกให้อยู่ในรูปข้าวกล้องงอกและข้าวฮาง เป็นการส่งเสริมการผลิตสาร γ -aminobutyric acid (GABA), ferulic acid, magnesium, potassium, zinc, prolylendopeptidase inhibitor และ γ -oryzanol เป็นต้น (Kayahara et al., 2000) โดยมีรายงานว่าเมล็ดข้าวฮางมีคุณค่าทางอาหารสูงกว่าเมล็ดข้าวกล้องงอก พบว่า ข้าวฮางมีวิตามินบี (thiamine, niacin, pyridoxine) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (total phenolic compounds, phytic acid, α -tocopherol และ γ -oryzanol) และกรดอะมิโนสูงกว่า โดยเฉพาะ leucine, lysine, GABA และ glycine (Moongngarm and Saetung, 2010)
 - 6) การแปรรูปเมล็ดธัญพืชโดยการคั่ว ส่งผลให้ธัญพืช โดยเฉพาะเมล็ดธัญพืชที่มีปริมาณกรดไขมันอยู่สูง มีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณมาก (Krings et al., 2006, Krings and Berger, 2001, Gelmez et al., 2009)

แผนการวิจัย

ตารางที่แสดงแผนงานวิจัย (โปรดทำเครื่องหมาย \longleftrightarrow เพื่อแสดงระยะเวลา)

วัตถุประสงค์	แผนงานวิจัย	ระยะเวลา			ระยะเวลา		
		เดือน ที่	เดือน ที่	เดือน ที่	เดือน ที่	เดือน ที่	เดือน ที่
		1	3	5	7	9	11
		2	4	6	8	10	12
1) เพื่อพัฒนาแปรรูปข้าว พื้นเมืองให้อยู่ในรูปข้าวกล้อง งอก ข้าวฮาง และข้าวคั่ว	แปรรูปข้าวพื้นเมืองให้อยู่ใน รูปข้าวกล้องงอก ข้าวฮาง และข้าวคั่ว	\longleftrightarrow					
2) เพื่อศึกษาสารออกฤทธิ์ทาง ชีวภาพ (สารต้านอนุมูลอิสระ, สารประกอบฟีนอลิก, GABA, Glutathione) และคุณสมบัติ การยับยั้งจุลินทรีย์ ที่มีอยู่ใน สารสกัดจากเมล็ดข้าว พื้นเมืองแปรรูป	สกัดเมล็ดข้าวแปรรูป และ เมล็ดข้าวที่ไม่ได้รับการแปร รูปด้วย น้ำกลั่น เอทานอล 100% และ เอทานอล 80% วิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทาง ชีวภาพที่อยู่ในสารสกัด	\longleftrightarrow					
3) เพื่อศึกษาสภาวะที่ เหมาะสมในการเก็บรักษา เมล็ดข้าวพื้นเมืองแปรรูป เพื่อให้คงปริมาณสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพและคุณสมบัติการ ยับยั้งจุลินทรีย์	เก็บรักษาเมล็ดข้าวแปรรูป และเมล็ดข้าวที่ไม่ได้รับการ แปรรูป ที่อุณหภูมิห้อง เป็น ระยะเวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 จากนั้น นำมา วิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทาง ชีวภาพอีกครั้ง			\longleftrightarrow			

วิธีดำเนินการวิจัย

1) วิธีการเตรียมข้าวกล้องงอก ข้าวฮางและข้าวคั่ว

การเตรียมข้าวกล้องงอก (germinated brown rice, GBR) ทำได้โดยแช่เมล็ดข้าวกล้องสดในน้ำกลั่น ปลอดภัย ที่ความหนา 1 เซนติเมตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) น้ำที่ใช้แช่จะถูกเปลี่ยนทุก 4 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดข้าวกล้องที่ได้เข้าสู่กระบวนการบ่มในถังหมักโดยกระจายเมล็ดข้าวบนผ้าขาวบางชุ่มน้ำและปิดทับด้วยผ้าขาวบางอีกชั้น จากนั้น นำไปวางในภาชนะพลาสติกเพื่อการบ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 90-95% ระหว่างกระบวนการบ่มจะทำการสเปรย์น้ำเพื่อล้างข้าวกล้องทุก 4-6 ชั่วโมง และเปลี่ยนน้ำเป็นระยะ เมล็ดข้าวกล้องงอกที่ได้จะถูกนำมาทำให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส จนมีความชื้นเหลืออยู่ประมาณ 10% (Moongngarm and Saetung, 2010)

การเตรียมข้าวฮาง (germinated rough rice, GRR) ทำได้โดยนำเมล็ดข้าวเปลือกที่คัดเลือกแล้วไปแช่ในน้ำกลั่นปลอดภัย เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการเปลี่ยนน้ำทุก 8 ชั่วโมง เพื่อให้ข้าวเปียกและอมน้ำ จากนั้นนำเมล็ดข้าวไปใส่ในภาชนะพลาสติกเพื่อการบ่มเช่นเดียวกับข้าวกล้องงอก แต่ให้การบ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำเมล็ดข้าวฮางที่ได้จะถูกนำมาทำให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส จนมีความชื้นเหลืออยู่ประมาณ 10% นำข้าวที่แห้งไปขัดสีเพื่อกำจัดเปลือกด้วยเครื่องสีข้าว (Moongngarm and Saetung, 2010)

การเตรียมข้าวคั่ว (roasted rice, RR) ทำได้โดยนำข้าวเปลือกมาทำการขัดสีเพื่อให้ได้ข้าวกล้อง จากนั้นคั่วในกระทะแบนด้วยไฟอ่อนๆ เป็นเวลาประมาณ 10-15 นาที จนข้าวมีสีคล้ำ จากนั้นปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (ดัดแปลงจาก Gelmez et al. (2009) และ Vadivel et al. (2011))

เมล็ดข้าวที่ได้รับการแปรรูปทั้งสามวิธีและเมล็ดข้าวที่ไม่ได้ผ่านการแปรรูป จะถูกเก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 วัน จากนั้น จะถูกนำมาบดและร่อนผ่านตะแกรง เพื่อนำมาผ่านการสกัดและการวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ต่อไป

2) วิธีการเตรียมสารสกัดหยาบจากข้าว (crude extract) (ดัดแปลงจาก Massaretto et al. (2011))

นำผงของเมล็ดข้าวกล้องงอก เมล็ดข้าวฮาง เมล็ดข้าวคั่ว หรือเมล็ดข้าวที่ไม่ได้ผ่านการแปรรูป มาแช่ในตัวทำละลาย (น้ำกลั่นปลอดภัย เอทานอล 100% และ เอทานอล 80% (ละลายในน้ำกลั่น v/v)) ในอัตราส่วน 1:4 (w/v) และเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman หมายเลข 1 แล้วนำมาทำให้แห้งภายใต้สภาวะสูญญากาศด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่ 45 องศาเซลเซียส แล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

3) วิธีการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus pyogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* และ *Enterococcus faecalis* (มีอีกชื่อว่า *Streptococcus faecalis*) ทำได้โดยการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงในอาหารเหลว Muller Hinton broth (MBH) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำการเพาะเลี้ยงจนได้ปริมาณความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบประมาณ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายเปปโตเนที่ความเข้มข้น 0.1% แล้วนำสารแขวนลอยเซลล์ (cell suspension) มาทำการเจือจางอีก 10 เท่า โดยดูดสารละลายดังกล่าว 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายเปปโตเน 0.1% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้ความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ดัดแปลงจาก Peña et al. (2011))

4) วิธีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

4.1 วิธี Agar well diffusion method บนอาหารแข็ง

สำหรับการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย ทำได้โดยเตรียมอาหารแข็ง Muller Hinton agar (MHA) ในจานเพาะเลี้ยง ดูดสารแขวนลอยแบคทีเรีย (เข้มข้น 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทำการ spread ให้ทั่วอาหารแข็ง MHA จากนั้น ใช้ cork borer ที่ปลอดเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร มาทำการเจาะอาหารที่ผ่านการป้ายเชื้อ จากนั้น นำสารสกัดที่ความเข้มข้น 50,000 ppm ปริมาตร 30 ไมโครลิตร มาหยดลงในหลุมแต่ละหลุมและนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงวัดขนาดของวงใส (clear zone) รอบหลุม โดยการทดสอบจะทำ 4 ซ้ำ (ดัดแปลงจาก Peña et al. (2011))

4.2 วิธี Broth dilution assay ในอาหารเหลว

สำหรับการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย ทำได้โดยเตรียมอาหารเหลว Muller Hinton broth (MHB) ใส่ลงในหลอดทดลอง 9 มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อเข้มข้น 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงไป 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารสกัดหยาดจากข้าวที่ความเข้มข้น 50,000 ppm ปริมาตร 0.18 มิลลิลิตร ลงไป แล้วเติม tween 80 จำนวน 1 หยด นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าความดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เทียบระหว่างชั่วโมงที่ 0 และชั่วโมงที่ 24 โดยการทดสอบจะทำ 4 ซ้ำ (ดัดแปลงจาก Adwan et al. (2010) และ Peña et al. (2011))

5) การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compounds, TPC) โดยวิธี Folin-Ciocalteu method (Butsat and Siriamornpun, 2010)

การหาปริมาณ TPC ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method ทำได้โดยนำสารสกัดหยาดจากข้าวที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent (เจือจาง 1:10 ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการเขย่าส่วนผสมเป็นเวลา 1 นาที แล้วทำการเติมสารละลาย

10% Na_2CO_3 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร จากนั้นจึงทำการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพื่อปรับปริมาตรทั้งหมดให้เป็น 5 มิลลิลิตร ปล่อยให้ส่วนผสมทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ใช้เทียบผลการทดลองคือ สารละลาย Gallic acid ที่ความเข้มข้น 0.5-0.0009765625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ได้จะแสดงในหน่วย $\mu\text{g gallic acid equivalents} / \text{g rice}$ โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

6) การวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay (Butsat and Siriamornpun, 2010)

วิธี DPPH เป็นการทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH[•] โดยนำสารสกัดหยาบจากข้าว มาทำการเจือจางในเมทานอลให้มีความเข้มข้นที่ 50,000 ppm (100 ไมโครลิตร) เพื่อมาผสมกับ สารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ (1.9 มิลลิลิตร) ส่วนผสมที่ได้จะถูกบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยมีกลุ่มควบคุม ได้แก่ (1) สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0.5-0.0009765625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ (2) เมทานอล นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหากิจกรรมการดักจับอนุมูลอิสระเทียบเท่า Ascorbic acid ซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ได้จะแสดงในหน่วย $\mu\text{g Ascorbic acid equivalents} / \text{g rice}$ โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

7) การวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay (Butsat and Siriamornpun, 2010)

วิธี FRAP เป็นการทดสอบความสามารถในการเปลี่ยนประจุ Fe^{3+} ให้เป็น Fe^{2+} โดยปฏิกิริยาจะเกิดเป็นสีน้ำ-เงินเข้มที่ค่าความดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร เนื่องจากการจับกลุ่มกันของ Fe^{2+} -TPTZ complex (Fe^{2+} tripyridyltriazine) การวิเคราะห์นี้ทำได้โดยเตรียม FRAP stock solution ซึ่งประกอบไปด้วย (1) สารละลาย acetate buffer เข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 3.6, (2) สารละลาย TPTZ solution เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ใน HCl เข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และ (3) สารละลาย $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำ stock solution ดังกล่าว มาบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้เพื่อการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดหยาบจากข้าว (300 ไมโครลิตร) จะถูกนำมาเติมลงใน FRAP solution ปริมาตร 1.7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ใช้เทียบผลการทดลองคือ สารละลาย FeSO_4 ที่ความเข้มข้น 0.5-0.0009765625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ได้จะแสดงในหน่วย $\mu\text{g FeSO}_4 \text{ equivalents} / \text{g rice}$ โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

8) วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร GABA

ข้าวที่ไม่ได้รับการแปรรูป ข้าวกล้องงอก ข้าวฮางและข้าวคั่ว จะถูกส่งไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร GABA ด้วยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) ตามวิธีของ Heems et al. (1998) ที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

9) วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร Glutathione

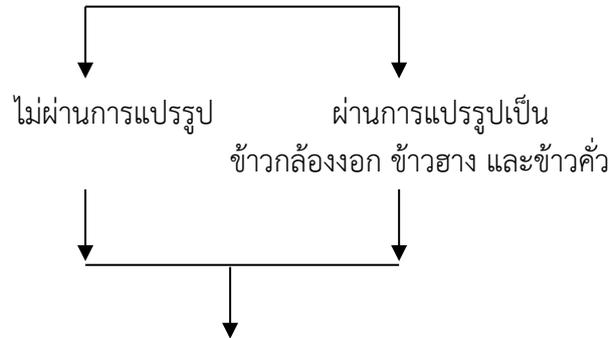
ปริมาณสาร Glutathione สามารถวิเคราะห์ในรูปของ Reduced glutathione ด้วยวิธี Colorimetric assay ตามแบบของ Yan et al. (2012) โดยการทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ของ glutathione GSH โดยสาร sulfhydryl reagent 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) เพื่อให้เกิดเป็นสีเหลืองของ 5'-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) ที่สามารถวัดความยาวคลื่นได้ที่ 412 นาโนเมตร ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ นำสารสกัดหยาบ (100 ไมโครลิตร) มาผสมกับสารละลาย sodium phosphate buffer เข้มข้น 200 mmolL^{-1} , pH 7.7 (1 มิลลิลิตร) และสารละลาย DNTB ที่ความเข้มข้น 6.33 mmolL^{-1} ที่ละลายด้วย sodium phosphate buffer เข้มข้น 100 mmolL^{-1} , pH 6.8 (0.6 มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และวัดความยาวคลื่นที่ 412 นาโนเมตร สารมาตรฐานคือ Standard reduced glutathione ที่ความเข้มข้น 0.5-0.0009765625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ได้จะแสดงในหน่วย $\mu\text{g reduced glutathione equivalents / g rice}$ โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

10) การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองซ้ำไม่ต่ำกว่า 3 ครั้ง (ยกเว้นการวิเคราะห์ปริมาณสาร GABA ด้วยวิธี HPLC ที่ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง) จะถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี One Way ANOVA และ Duncan's multiple range test ($p < 0.05$) เพื่อเปรียบเทียบค่าในแต่ละรูปแบบของการแปรรูป

แผนภาพการทำการทดลอง

ข้าวดอกมะลิ กข.105 ข้าวเหนียว กข.6 ข้าวหอมแดง (หอมมะลิแดง) ข้าวเหนียวดำ (กำ)



บดให้ละเอียดและสกัดด้วยตัวทำละลาย (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ เอทานอล 100% และ เอทานอล 80%)

- ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*, *E. coli*, *Enterobacter sp.*,
- *K. pneumoniae*, *P. acnes*, *P. vulagris*, *Ps. fluorescens*, *S. aureus*,
- *S. faecalis*, *S. pyogenes* (Agar well diffusion method และ Broth dilution assay)
- วิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging assay และ FRAP assay)
- วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (วิธี Folin–Ciocalteu method)
- วิเคราะห์หาปริมาณสาร GABA (วิธี HPLC)
- วิเคราะห์หาปริมาณสาร Glutathione

เก็บไว้ในถุงพลาสติกและที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 วัน
นำมาผ่านการสกัดและการวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอีกครั้ง

วิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี One Way ANOVA และ Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)
เพื่อเปรียบเทียบข้าวในแต่ละรูปแบบการแปรรูป

เทคโนโลยีที่จะนำมาใช้ในการวิจัย

- การทดสอบฤทธิ์การต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี Agar well diffusion method บนอาหารแข็ง และวิธี Broth dilution assay ในอาหารเหลว
- การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay และ วิธี Ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay
- การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compounds, TPC) โดยวิธี Folin–Ciocalteu method
- การวิเคราะห์หาปริมาณสาร GABA ด้วยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC)
- การวิเคราะห์หาปริมาณสาร Glutathione ด้วยวิธี DTNB–GSSG reductase recycling assay

ความพร้อมด้านอุปกรณ์และสถานที่ทำวิจัย

เครื่องมือปฏิบัติการที่ใช้เพื่อการวิจัย ได้แก่ Incubator, Laminar flow, Hot air oven, Rotary evaporator, Spectrophotometer และ Micro-plate reader ที่มีอยู่ในคณะเทคโนโลยีและที่ศูนย์เครื่องมือกลางของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม ส่วนเครื่อง HPLC นั้น เป็นของห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย