ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของน้ำหมักไหมข้าวโพดหวาน *Zea mays* L. ด้วยวิธีการหมักแบบเหลว

Antioxidant activity and total phenolic content of fermented juice from sweet corn silk *Zea mays* L. obtained by submerged fermentation

กมลวรรณ ผลพิกุล[1], สิริลักษณ์ ชัยจำรัส[1], ติยะภรณ์ เหลืองพิพัฒน์[2] และ ทะเนตร อุฤทธิ์[2]
Kamonwan Pholphikul[1], Sirilux Chaijamrus[1], Tiyaporn Luangpipat[2] and Thanet Urit[2]

Received: 4 February 2023; **Revised**: 27 March 2023; **Accepted**: 11 April 2023

บทคัดย่อ

ไหมข้าวโพดจัดเป็นส่วนที่เหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งไหมข้าวโพดมีฤทธิ์ขับร้อน ขับปัสสาวะ แก้ไตอักเสบ รักษาดีซ่าน บำรุงตับ แก้เบาหวาน และรักษาโพรงจมูกอักเสบ (Hasanudin *et al*., 2012) นอกจากนี้ พบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและกิจกรรมต้านอนุมูลมีประโยชน์ต่อสุขภาพมากมาย (Sarepoua *et al*., 2013; Eman 2011; Ebrahimzadeh *et al*., 2008) โดยเลือกใช้วิธีการหมักเพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากไหมข้าวโพด การหมักสามารถเพิ่มคุณค่าให้กับผลิตภัณฑ์อาหาร โดยเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ โดยการหมักไหมข้าวโพดหวานแบบเหลว (Submerged fermentation) และศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของน้ำหมัก วิธีการทดลองใช้ไหมข้าวโพดหวานสดพันธุ์ Hy-brix 10 หมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* TISTR 1463 และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 1464 ทั้งเชื้อเดี่ยวและผสม โดยใช้สภาวะหมักแบบนิ่ง เป็นเวลา 14 วัน ผลการทดลองพบว่าไหมข้าวโพดหวานที่หมักนาน 14 วัน โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1463 มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด (0.27 มิลลิกรัมกรดแกลลิก /มิลลิลิตร) อีกทั้งยังมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุด (31.4 มิลลิกรัมเคอร์ซิตินต่อกรัมของสารสกัด) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงถึง 63.89 %

คำสำคัญ: ไหมข้าวโพดหวาน, สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

Corn silk is classified as agricultural waste. Corn silk is a heat insulator, diuretic, useful for treating nephritis and jaundice, nourishing the liver, curing diabetes and treating sinusitis (Hasanudin *et al*., 2012). Numerous health advantages of bioactive substances and antioxidant activity have also been discovered in corn silk (Sarepoua *et al*., 2013; Eman 2011; Ebrahimzadeh *et al*., 2008). The objective of this study was to to extract bioactive substances from corn silk prepared by submerged fermentation. Fermentation can add value to food products by increasing amount of bioactive substances.

This study aimed to examine the conditions of submerged fermentation as well as the functional properties of water in the fermenter, specifically its antioxidant activity (including all phenolic substances). Fresh sweet corn silk of Hy-brix 10 was fermented by the microorganisms *Lactobacillus casei* TISTR 1463 and *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 1464. in both individual and co-culture using stationary fermented in the still state, close with an air lock. The

[1] คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000
[2] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ อำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์ 60000
* ติดต่อผู้นิพนธ์ กมลวรรณ ผลพิกุล คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000
อีเมล์: pholphikul.k@gmail.com
[1] Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000
[2] Faculty of Science and Technology, Nakhonsawan Rajabhat University, Nakhonsawan, Thailand 60000
* Corresponding author: Kamonwan Pholphikul Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000
Email: pholphikul.k@gmail.com

results showed that for 14 days the sweet corn silk fermented by *Lactobacillus casei* TISTR 1463 had the highest of total phenolic compound content (0.27 mg GAE/mL). Additionally, it had the highest total flavonoids content (31.4 mg CE/g of Extract) and antioxidant activity 63.89 %.

Keywords: Sweet corn silk, total phenolic compounds, antioxidant activity

บทนำ

ไหมข้าวโพด (*Zea mays* hair, corn silk, maize silk) คือเส้นใยที่เกาะอยู่บนฝักข้าวโพด เป็นเกสรตัวเมียของดอกข้าวโพด ถือว่าเป็นส่วนเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิต โดยทั่วไปจะนำไปทิ้งหรือนำไปเป็นอาหารสัตว์ (อมร บุญสมบัติ, 2559) หรือนำไปต้มน้ำเพื่อดื่ม เนื่องจากไหมข้าวโพดมีสรรพคุณในด้านสุขภาพมากมาย เช่น มีฤทธิ์ขับร้อน ขับปัสสาวะ ขับน้ำดี นิ่วในถุงน้ำดี แก้ไตอักเสบ รักษาดีซ่าน บำรุงตับ แก้เบาหวาน โพรงจมูกอักเสบ ซึ่งอาจจะเกิดจากฤทธิ์ของสารพฤกษเคมี (Hasanudin *et al*., 2012) และมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (Sarepoua *et al*., 2013; Eman 2011; Ebrahimzadeh *et al*., 2008) นอกจากนี้ ยังพบสารพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพอีกหลายชนิด เช่น ฟีนอล โพลีฟีนอล กรดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ฟลาโวนไกลโคไซด์ แอนโธไซยานิน แคโรทีนอยด์ เทอร์พีนอยด์ อัลคาลอยด์ สเตียรอยด์ ลูทีน แทนนิน ซาโปนิน น้ำมันระเหย วิตามิน น้ำตาลบางชนิด และโพลีแซ็กคาไรด์ (Haq *et al*., 2018) ซึ่งสารเหล่านี้ล้วนได้มาจากวิธีการสกัดทางเคมี อย่างไรก็ตาม งานวิจัยจำนวนหนึ่งพบว่า การหมักพืชร่วมกับจุลินทรีย์สามารถเพิ่มสารพฤกษเคมีได้ เช่น เพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ (Amadou *et al*., 2009; Adetuyi & Ibrahim, 2014; Kwak *et al*., 2018)

การหมักเป็นกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์ เพื่อสร้างพลังงานจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ หรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์ด้วยเอนไซม์ โดยมีสารอินทรีย์เป็นทั้งตัวให้และตัวรับอิเล็กตรอน โดยผลิตภัณฑ์อาหารหมักจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมีและกายภาพของอาหารนั้นด้วยกิจกรรมของจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถเพิ่มคุณค่าให้กับผลิตภัณฑ์อาหาร และส่งผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bamforth & Ward, 2014; Chisti, 2010)

ดังนั้นเพื่อไม่ให้ไหมข้าวโพดกลายเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูป งานวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณฟลาโวนอยด์ และการออกฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระของไหมข้าวโพดโดยการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ยา เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หรือส่วนผสมของอาหารที่มีประสิทธิภาพสูงต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Completely Random Design (CRD) ทรีตเม้นท์ประกอบด้วยน้ำไหมข้าวโพดหมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก ยีสต์ และแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกผสมยีสต์ แต่ละทรีตเมนท์มี 3 ซ้ำ วัดการเจริญเติบโตโดยนับจำนวนเซลล์ และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเปรียบเทียบกับตัวควบคุม ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ตลอดจนการออกฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ

การเตรียมไหมข้าวโพด

ไหมข้าวโพดหวาน (sweet corn) สายพันธุ์ Hy-brix 10 เก็บมาจากตำบลทับกฤชใต้ อำเภอชุมแสง จังหวัดนครสวรรค์ ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง และผึ่งเพื่อสะเด็ดน้ำให้แห้ง จากนั้นหั่นไหมข้าวโพดให้มีขนาดประมาณ 2-3 เซนติเมตร ก่อนบรรจุในถุงพลาสติกพอลิเอทธิลีนซีลสุญญากาศ ถุงละ 70 กรัม และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการทดลอง

การเตรียมน้ำไหมข้าวโพด

นำไหมข้าวโพดที่ผ่านขั้นตอนการเตรียม ปริมาณ 140กรัม เติมน้ำกลั่น 630 มิลลิลิตร นำไปต้มเดือดนาน 15 นาที กรองแยกไหมข้าวโพดออกด้วยตะแกรงละเอียด จากนั้นเติมกลูโคส 21 กรัม (30 กรัม/ลิตร) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำไหมข้าวโพดให้มีค่าเท่ากับ 6.0 โดยปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 630 มิลลิลิตร จากนั้นเทใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 1000 มิลลิลิตร

การเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์

การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย

นำ stock culture เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* TISTR 1463 ที่ซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่เพาะเลี้ยงไว้มาเขี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง De Man Rogosa and Sharpe (MRS) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ที่ขึ้นบนอาหารแข็ง 2-3 ลูป ใส่ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 16-18 ชั่วโมง

จากนั้นทำการเตรียมกล้าเชื้อไว้สำหรับการหมัก โดยทำการเจือจางเชื้อให้มีปริมาณ 10^6 cell/mL ซึ่งใช้ Hemocytometer ในการนับเซลล์ (อุทัยทิพย์ ทนเถื่อน และคณะ, 2555)

การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

นำ stock culture เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TIohe9k]STR 1464 ซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่เพาะเลี้ยงไว้มาเขี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ที่ขึ้นบนอาหารแข็ง 2-3 ลูป ใส่ลงในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเตรียมกล้าเชื้อไว้สำหรับการหมัก โดยเจือจางเชื้อให้มีปริมาณ 10^5 cell/mL ซึ่งใช้ Hemocytometer ในการนับเซลล์

การเตรียมกล้าเชื้อผสมแบคทีเรียและยีสต์

นำกล้าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์ผสมกัน โดยการเจือจางเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อยีสต์ให้มีปริมาณ 10^6 และ 10^5 cell/mL ตามลำดับ

การหมักแบบเหลว (Submerge fermentation)

นำน้ำไหมข้าวโพดที่เตรียมไว้ จากนั้นเติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ทั้งแบบเดี่ยวและผสม ลงในแต่ละฟลาสก์ ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุก Air lock บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30-37 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 14 วัน ในสภาวะนิ่งไม่ให้อากาศ ในระหว่างการหมักจะทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกวัน โดยการดูดน้ำหมักด้วยสายยางผ่านทางท่อที่ใส่ไว้ เพื่อติดตามการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ค่าของแข็งที่ละลายได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากนั้นตัวอย่างที่เก็บนั้นจะถูกแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบชีวภาพ และการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำหมักต่อเวลาของการหมัก โดยจะทำการหมัก 3 ซ้ำทุกการทดลอง

การวิเคราะห์ทางเคมี

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) โดยวิธี DNS Method (Miller, 1959)

ปิเปตตัวอย่างน้ำหมักจากไหมข้าวโพด 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นปิเปตสารละลาย DNS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากันแล้วต้มน้ำเดือดทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำหลอดทดลองไปแช่ในอ่างน้ำเย็น 10 นาที ทำการเติมน้ำกลั่นใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 2.5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยหาได้จากสมการที่ (1)

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร) = [ค่า OD540 x อัตราการเจือจาง] / ค่าความชันของกราฟมาตรฐานกลูโคส (1)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Singleton & Rossi, 1965) ปิเปตตัวอย่างน้ำหมักจากไหมข้าวโพด 0.3 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Merck, Germany) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Na_2CO_3 (7.5% w/v) ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร และทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร จากนั้นนำผลที่ได้จากการทดสอบน้ำหมักตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) (Fluka, United States) เพื่อคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ในน้ำหมักตัวอย่าง

วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์โดยวิธี Aluminum chloride colorimetric method (ดัดแปลงจาก Prommuak *et al.*, 2008) ปิเปตตัวอย่างน้ำหมักจากไหมข้าวโพด 0.5 มิลลิลิตร ตามด้วยเอทานอล ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ตามด้วย 10% aluminium chloride ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตามด้วย 1 M potassium acetate 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 2.8 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร จากนั้นนำผลที่ได้จากการทดสอบน้ำหมักตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเควอซิทิน (Quercetin) (Sigma-aldrich, USA) เพื่อคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในน้ำหมักตัวอย่าง

การทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

การออกฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH: 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (Brand *et al.*, 1995) ปิเปตตัวอย่างน้ำหมักจากไหมข้าวโพด 0.3 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 40 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยเครื่อง UV-1201 spectrophotometer (UV-1201, Shimadzu Corporation, Japan) นำค่าที่ได้ไปคำนวณ % inhibition โดยหาได้จากสมการที่ (2)

$$\% \text{ inhibition} = [A_0 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100 \quad (2)$$

A_0 = ethanol 0.3 ml + DPPH 1.5 ml

A_1 = sample 0.3 ml + DPPH 1.5 ml

A_2 = sample 0.3 ml + ethanol 1.5 ml

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน โดยวิธี One-way Analysis of Variance (ANOVA) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างทรีตเม้นท์ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยกำหนดความเชื่อมั่นทางสถิติที่ระดับ $p<0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS 15.0

ผลการทดลองและอภิปรายผล

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

จากการศึกษาการหมักไหมข้าวโพดหวานด้วยจุลินทรีย์ 3 ชนิด ผลการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักสามารถแสดงได้ดัง Figure 1-3 พบว่าปริมาณเชื้อมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 1-4 วันแรก เนื่องจากมีการใช้ออกซิเจนและน้ำตาลที่มีอยู่ในน้ำไหมข้าวโพด เมื่อออกซิเจนเริ่มหมดเชื้อจุลินทรีย์จะหยุดเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนน้ำตาลที่เหลือให้อยู่ในรูปของแอลกอฮอล์ โดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 1464 เมื่อหมักน้ำไหมข้าวโพดจนครบ 14 วันแล้ว จะเห็นได้ว่าจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ ค่าพีเอช และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มคงที่สามารถหยุดกระบวนการหมักได้ สำหรับการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชพบว่ามีค่าลดลงจาก 4.48 เป็น 2.80 ในเชื้อ *L. casei* TISTR 1463; 4.28 เป็น 3.58 ในเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 1464 และ 4.56 เป็น 3.05 ในการหมัก 2 เชื้อข้างต้นผสมกัน นอกจากนี้ในการหมักโดยใช้เชื้อผสมพบว่า ในด้านของจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ พบว่ามีการไต่ระดับจนเริ่มจะคงที่ในช่วงท้ายของการหมัก ซึ่งมีความแตกต่างจากการหมักแบบเชื้อเดี่ยว โดยในระหว่างการหมักเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีหลายอย่าง มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางสารอาหารของพืช ซึ่งจะส่งผลต่อคุณสมบัติต่างๆ เช่น การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bamforth & Ward, 2014; Chisti, 2010)

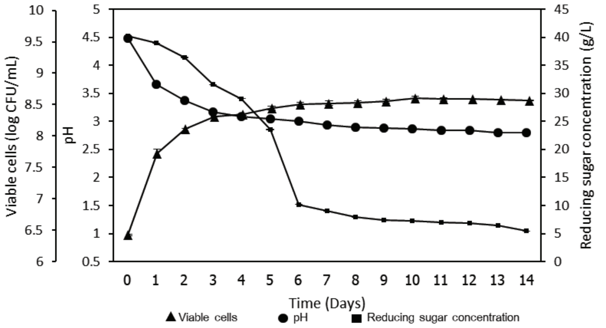

Figure 1 Fermentation profiles of corn silk with *L. casei* TISTR 1463.

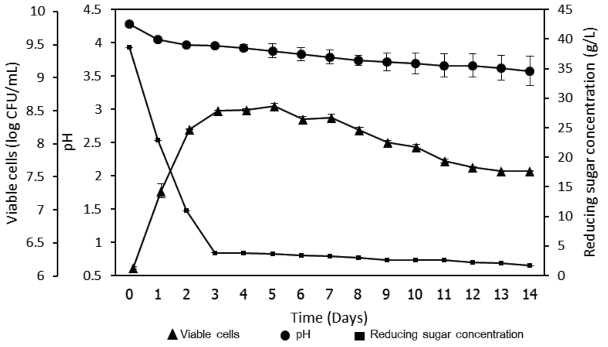

Figure 2 Fermentation profiles of corn silk with *S. cerevisiae* TISTR 1464.

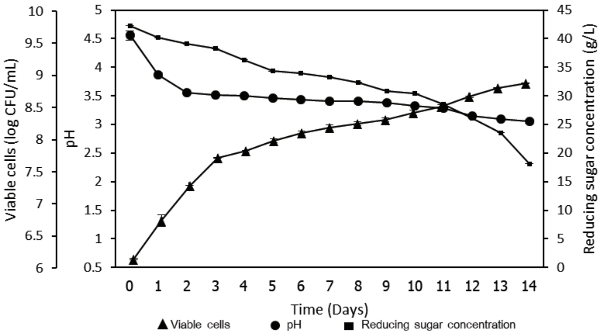

Figure 3 Fermentation profiles of corn silk with mixed culture between *L. casei* TISTR 1463 and *S. cerevisiae* TISTR 1464.

ความสัมพันธ์ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ต่อการออกฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระในระหว่างการหมัก

ไหมข้าวโพดหวานที่หมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *L. casei* TISTR 1463 ในวันสุดท้ายมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวันแรกของการหมัก ไหมข้าวโพดหวานมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่เพิ่มขึ้น 4.5 เท่า (Figure 4-6) ส่วนปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่ามีปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาในการหมัก จากรายงานของ Casarotti *et al.* (2018) และ Bhat *et al.* (2015) พบสารฟีนอลิกและสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อหมักแบคทีเรียผลิตเชื้อแล็กติกซึ่งระยะเวลาในการหมักมีผลต่อปริมาณของสารฟีนอลิกและสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย เนื่องจากสารฟีนอลิกและสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความเป็นขั้ว จึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วใกล้เคียงกัน (Walter & Purcell, 1979) ซึ่งน้ำ มีสภาพขั้วสูง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Solihah *et al.* (2012) ที่รายงานปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดน้ำของไหมข้าวโพดสูงกว่าในสารสกัดเมทานอลสูงถึง 1.06 เท่า นอกจากนี้ จากรายงานของ Kwak *et al.* (2018) ยังพบข้อมูล

เกี่ยวกับการหมักด้วยยีสต์ว่าช่วยเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเมล็ดกาแฟสีเขียว และเพิ่มกลิ่นหอมของกาแฟอีกด้วย

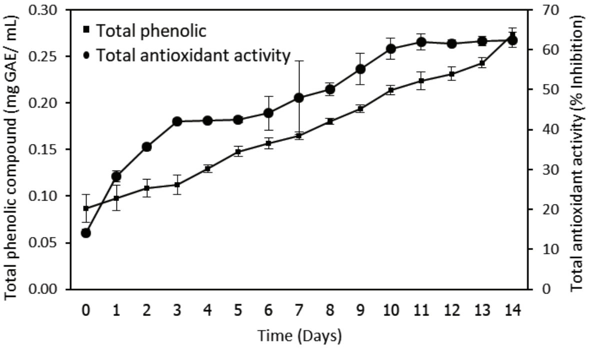

Figure 4 Total antioxidant activity and Total phenolic in fermented corn silks with *L. casei* TISTR 1463.

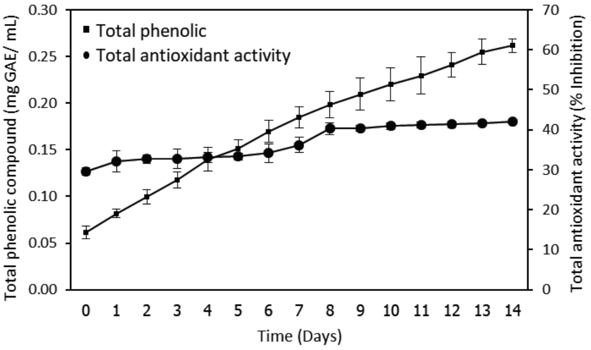

Figure 5 Total antioxidant activity and Total phenolic in fermented corn silks with *S. cerevisiae* TISTR 1464.

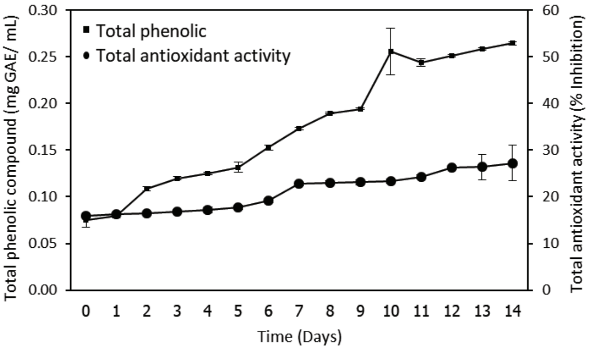

Figure 6 Total antioxidant activity and Total phenolic in fermented corn silks with mixed between *L. casei* TISTR 1463 and *S. cerevisiae* TISTR 1464.

ไหมข้าวโพดอุดมไปด้วยองค์ประกอบทางพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่อย่างไรก็ดี สารพวกนี้ถูกห่อหุ้มด้วยผนังเซลล์พืชและโปรตีน (Sanjukta & Rai, 2015) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการศึกษาสารประกอบทางชีวภาพจากไหมข้าวโพดจะทำการสกัดออกมาด้วยวิธีทางเคมี ดังนั้นจึงอาจจะมีสารประกอบทางชีวภาพบางส่วนที่ยังหลงเหลืออยู่ในเซลล์ของพืชอีกด้วย จากรายงานของ Salar *et al.* (2016) พบว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์และโปรตีนออกได้ สามารถปลดปล่อยสารประกอบทางพฤกษเคมีในพืชและช่วยเพิ่มปริมาณได้อีกด้วย ซึ่งจากรายงานของ Huynh *et al.* (2014) พบว่า ในเชื้อ *L. casei* TISTR 1463 และ *S. cerevisiae* TISTR 1464 มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์พืชเพื่อปลดปล่อยสารประกอบทางพฤกษเคมีเช่นกัน ได้แก่ β-Glucosidase, Cellulase และ β-Glucosidase, Feruoyl esterase ตามลำดับ นอกจากนี้ ในรายงานของ Martins *et al.* (2011) กล่าวว่า การหมักถือเป็นกระบวนการที่ดีที่สุดวิธีหนึ่งของการได้มาซึ่งสารสกัดที่มีคุณภาพและมีปริมาณที่ค่อนข้างสูง โดยใช้เทคนิคที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการหมักไหมข้าวโพดสามารถเพิ่มปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดได้สูงถึง 0.27 mg GAE/mL และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 63.89% ในการหมักด้วยเชื้อ *L. casei* TISTR 1463 (Table 1)

Table 1 Total antioxidant activity and Total phenolic in fermented corn silks 14 days.

Bioactive compounds	Before fermentation	Type of Microorganism		
		L	S	+
TAO (% inhibition)	15[a]	63.89[b]	61.03[c]	52.85[d]
TPC (mgGAE/mL)	0.06[a]	0.27[b]	0.18[c]	0.14[d]
TFC mgCE/g of Extract)	9.6[a]	31.4[b]	20[c]	24.2[d]

L: *Lactobacillus casei* TISTR 1463
S: *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 1464
+: *L. casei* TISTR 1463 + *S. cerevisiae* TISTR 1464
TAO: Total antioxidant activity
TPC: Total phenolic compound
TFC: Total flavonoids content
Note: a-d Different small letters in the same row indicate significant difference at $P < 0.05$.

จากการศึกษาพบว่าการหมักด้วยเชื้อ *L. casei* TISTR 1463 มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงที่สุด รองลงมาคือการหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 1464 และการหมัก 2 เชื้อข้างต้นผสมกัน มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ต่ำที่สุด (31.4, 24.2 และ 20 mg CE/g of Extract ตามลำดับ) (Table 1) โดยสารฟลาโวนอยด์เป็นสารที่มีขั้ว ดังนั้นเมื่อใช้น้ำเป็นตัวสกัดจึงได้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่สูง เนื่องจากน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงและมีไฮโดรเจนที่สามารถแตกตัวได้สูง (Loudon & Mark, 2002) นอกจากนี้ ยังพบว่าไหมข้าวโพดเมื่อหมักนานขึ้นจะมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงขึ้นซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ

ฟีนอลิกทั้งหมดเนื่องจากสารฟลาโวนอยด์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก

จากผลการทดลองยังชี้ให้เห็นว่าการหมักไหมข้าวโพดหวานด้วยเชื้อเดี่ยว *L. casei* TISTR 1463 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ต่อการออกฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระในระหว่างการหมักสูงกว่าการหมักไหมข้าวโพดหวานด้วยเชื้อเดี่ยว *S. cerevisiae* TISTR 1464 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Casarotti *et al.* (2018) พบว่าการหมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus casei* Lc-1 สามารถเพิ่มปริมาณเส้นใย ระดับฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเครื่องดื่ม นอกจากนี้จากรายงานของ Bhat *et al.* (2015) พบว่าการหมักด้วยเชื้อกลุ่ม *Lactobacillus* สามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำผลไม้ได้เช่นเดียวกัน อีกทั้งจากรายงานของ Amadou *et al.* (2009); Adetuyi, & Ibrahim (2014); Kwak *et al.* (2018) พบว่าการหมักด้วยยีสต์ช่วยเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ในถั่วเหลือง เมล็ดกระเจี๊ยบ พืชตระกูลถั่ว และกาแฟอีกด้วย อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ต่อการออกฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระในระหว่างการหมัก 2 เชื้อข้างต้นผสมกันมีปริมาณที่น้อยกว่าการหมักด้วยเชื้อเดี่ยวทั้ง 2 เชื้อ ซึ่งจากการศึกษาของ Dan *et al.* (2019) พบว่าการใช้เชื้อแลคโตบาซิลลัสและยีสต์มาเป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับการทำขนมปังซาวโดว์ทำให้ขนมปังมีลักษณะที่ซับซ้อนของสารระเหย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของเอสเทอร์ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับขนมปังซาวโดว์โดยใช้ยีสต์เป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับการทำพบว่า ขนมปังมีรสชาติและเนื้อสัมผัสที่ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าระหว่างแลคโตบาซิลลัสและยีสต์มีปฏิสัมพันธ์เป็นแบบแข่งขันเพื่อสารอาหารชนิดเดียวกัน (Nakamura & Hartman, 1961; Viljoen, 2006) อีกทั้งในแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัสบางชนิดก็เป็นปฏิปักษ์ต่อยีสต์ (Fleet, 2007) จึงอาจจะมีผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพข้างต้น

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่า น้ำหมักจากการหมักไหมข้าวโพดหวานด้วยเชื้อ *L. casei* TISTR 1463 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ซึ่งถือเป็นอีกหนึ่งตัวเลือกสำคัญในการสกัดสารพฤกษเคมีออกมาใช้ประโยชน์ และสามารถเพิ่มปริมาณสารพฤกษเคมี รวมทั้งเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ที่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยบัณฑิตศึกษาด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ประจำปีงบประมาณ 2564 ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

อุทัยทิพย์ ทนเถื่อน, สุดารัตน์ สุวรรณชัย, วีรานันท์ พงศาภักดี และวิโรจน์ กนกศิลปธรรม. (2555). การวิเคราะห์จำนวนนับเซลล์แบคทีเรียจาก Hemacytometer ด้วยวิธีการเชิงสถิติ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 20*(2), 117-126.

อมร บุญสมบัติ. (2559). *ผลของวิธีการคั่วต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในไหมข้าวโพดแห้งเพื่อการผลิตชา* [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยขอนแก่น]. บัณฑิต วิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Adetuyi, F. O., & Ibrahim, T. A. (2014). Effect of fermentation time on the phenolic, flavonoid and vitamin C contents and antioxidant activities of okra (*Abelmoschus esculentus*) seeds. *Niger Food Journal, 32*, 128-137.

Amadou, I., Yong-Hui, S., Sun, J., & Guo-Wei, L. (2009). Fermented soybean products: Some methods, antioxidants compound extraction and their scavenging activity. *Asian Journal of Biochemistry, 4*, 68-76.

Bamforth, C. W., & Ward, R. E. (2014). *The Oxford handbook of food fermentations*. Oxford University Press.

Brand, W.W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Tech, 28*, 25-30.

Bhat, R., Suryanarayana, L. C., Chandrashekara, K. A., Krishnan, P., Kush, A., & Ravikumar, P. (2015). *Lactobacillus plantarum* mediated fermentation of *Psidium guajava* L. fruit extract. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 119*, 430-432.

Casarotti, S. N., Borgonovi, T. F., Batista, C. L. F. M., & Penna, A. L. B. (2018). Guava, orange and passion fruit by-products: Characterization and its impacts on kinetics of acidification and properties of probiotic fermented products. *Lwt—food Science and Technology, 98*, 69-76. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.010

Chisti, Y. (2010). Solid substrate fermentations, enzyme production, food enrichment. In M. C. Flickinger (Ed.), *Encyclopedia of industrial biotechnology, bioprocess, bioseparation, and cell technology* (pp. 4516-4534). Wiley.

Ebrahimzadeh, M. A., F. Pourmorad, & S. Hafezi. (2008). Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turk. Journal of Biological, 32*, 43-49.

Eman, A. A. (2011). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of Egyptian Maydis stigma *Zea mays* hairs) rich of bioactive constituents. *Journal of American Science, 7*, 726-729.

Fleet, G.H. (2007). Yeasts in foods and beverages: Impact on product quality and safety. *Current Opinion Biotechnol., 18*, 170-175.

Hasanudin, K., P. Hashim, & S. Mustafa. (2012). Corn silk (*Stigma Maydis*) in healthcare: A phytochemical and pharmacological review. *Molecules,17*, 9697-9715.

Haq, N., Saima, M., Momna, A., & Shakeel A. (2018). Phytochemical Composition: Antioxidant Potential and Biological Activities of Corn. In Amanullah & S. Fahad (eds). *Corn - Production and Human Health in Changing Climate.* IntechOpen. http://dx.doi.org/ 10.5772/ intechopen.79648

Huynh, N., Van C., John; Smagghe, G., & Raes, K. (2014). Improved release and metabolism of flavonoids by steered fermentation processes: A review. *International Journal of Molecular Sciences, 15*(11), 19369-19388. doi:10.3390/ijms151119369

Kwak, H. S., Jeong, Y., & Kim, M. (2018). Effect of yeast fermentation of green coffee beans on antioxidant activity and consumer acceptability. *Journal of Food Quality, 2018*, 5967130. Loudon, G., & Mark. (2002). *Organic chemistry*. Oxford University Press.

Martins, S., Mussatto, S.I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C.N., & Teixeira, J.A. (2011). *Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation: A review*. *Biotechnol. Adv., 29*, 365-373.

Miller, G., (1959). Use of dinitrisalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry, 31*, 426-429.

Nakamura, L.K. & Hartman, P.A. (1961): Lactobacillus: yeast interrelationships. *Journal of Bacteriology, 81*, 519-523

Prommuak, C, De-Eknamkul, W, & Shotipruk, A. (2008). Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extracts. *Sep. Puri. Tech., 62*, 444-448.

Salar, R. J., Purewal, S. S., & Bhatti, M.S. (2016). Optimization of extraction conditions and enhancement of phenolic content and antioxidant activity of pearl millet fermented with *Aspergillus awamori* MTCC-54. *Resour. Effic. Technol., 2*, 148-157.

Sanjukta, S., Rai, A. K., Muhammed, A., Jeyaram, K. & Talukdar, N. C., (2015), Enhancement of antioxidant properties of two soybean varieties of Sikkim Himalayan region by proteolytic *Bacillus subtilis* fermentation. *Journal of Functional Foods, 14*, 650-658.

Sarepoua, E., Tangwongchai, R., Suriharn, B., & Lertrat, K. (2013). Relationships between photochemical and antioxidant activity in corn silk. *Int. Food Research Journal, 20*, 2073-2079.

Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phos-phomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture, 16*,144-158.

Solihah, M. A., Wan Rosil, W. I., & Nurhanan, A.R. (2012). Phytochemicals screening and total phenolic content of Malaysian *Zea mays* hair extracts. *International Food Research Journal, 19*, 1533-1538.

Viljoen, B.C. (2006). Yeast ecological interactions. Yeast-yeast, yeast-bacteria, yeast-fungi interactions and yeasts as biocontrol agents. In Querol, A. & Fleet, G. (Eds), *The yeast handbook* (pp. 83-110). Springer Verlag.

Walter, W., & Purcell, A. E. (1979). Evaluation of several methods for analysis of sweet potato phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 27*, 942-964.