

ฤทธิ์ทางชีวภาพ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณแอนโทไซยานิน  
วิตามินบี 1 และ บี 2 ของคีเฟอร์ข้าวไรซ์เบอร์รี่กล้องงอก  
BIOLOGICAL ACTIVITIES AND PHENOLIC, ANTHOCYANIN,  
AND VITAMIN B1 AND B2 CONTENTS OF GERMINATED  
RICEBERRY RICE KEFIR

มนตรา ศรีชะแยม<sup>1\*</sup> อนงค์ ศรีโสภา<sup>1</sup> นนทพร รัตนจักร<sup>1</sup> และสริตา สังข์ทอง<sup>2</sup>  
Montra Srisayam<sup>1\*</sup>, Anong Srisopa<sup>1</sup>, Nontaporn Rattanachak<sup>1</sup> and Sarita Songtong<sup>2</sup>

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ยับยั้งไกลโคเซชัน ด้านอนุมูลอิสระ และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณแอนโทไซยานิน และวิตามินบี 1 และ บี 2 ของคีเฟอร์ข้าวไรซ์เบอร์รี่กล้องงอก ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion ทำการศึกษาความสามารถต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ยับยั้งไกลโคเซชัน ด้วยเทคนิค Albumin glycation วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ตรวจหาปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยวิธี pH Differential และวิเคราะห์วิตามินบี 1 และ บี 2 ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูง (HPLC) ผลที่ได้พบว่า คีเฟอร์ข้าวไรซ์เบอร์รี่กล้องงอกสามารถยับยั้งและฆ่าแบคทีเรีย ทดสอบได้ ทั้งหมด (*Salmonella* Typhimurium DMST 562, *Staphylococcus aureus* DMST 8013, *Bacillus cereus* DMST 5040 และ *Escherichia coli* DMST 4212) คีเฟอร์ข้าวไรซ์เบอร์รี่กล้องงอก ที่ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้งไกลโคเซชันได้เท่ากับร้อยละ  $36.78 \pm 2.24$  ยับยั้งอนุมูลอิสระ ให้ค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ  $101.68 \pm 0.52$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนอกจากนี้ คีเฟอร์ข้าวไรซ์เบอร์รี่กล้องงอก

<sup>1</sup>คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

<sup>1</sup>Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Muang District, Phitsanulok Province 65000

<sup>2</sup>สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย 57100

<sup>2</sup>School of Cosmetic Science, Mae Fah Luang University, Muang District, Chiang Rai Province 57100

\*corresponding author e-mail: srisayam\_ssy@psru.ac.th

Received: 5 July 2022; Revised: 8 November 2022; Accepted: 10 November 2022

DOI: <https://doi.org/10.14456/lsej.2023.3>

มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณแอนโทไซยานินและวิตามินบี 1 และ บี 2 เท่ากับ  $16.55 \pm 0.81$  มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง  $155.86 \pm 1.93$  มิลลิกรัมสมมูลของ Cyanidin-3-glucoside ต่อกรัมตัวอย่าง 10.25 ไมโครกรัม และ 11.42 ไมโครกรัม ตามลำดับ งานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าคีเฟอร์ข้าวไรซ์เบอร์รี่กล้องงอกมีฤทธิ์ทางชีวภาพ สามารถใช้ประโยชน์ด้านอาหารเพื่อสุขภาพ หรือใช้เป็นส่วนประกอบทางเภสัชภัณฑ์ได้

**คำสำคัญ:** คีเฟอร์ ยับยั้งแบคทีเรีย ยับยั้งอนุมูลอิสระ ไกลโคเซชัน ข้าวไรซ์เบอร์รี่

### Abstract

This research aimed to study the anti-bacterial, anti-glycation, and antioxidant activities of germinated Riceberry rice kefir. Moreover, total phenolic, anthocyanin, and vitamin B1 and B2 contents were analysed. Anti-bacterial activity was examined by the agar well diffusion method. Anti-glycation and antioxidant activities were determined by albumin glycation and DPPH radical scavenging assay, respectively. Total phenolic, anthocyanin and vitamin B1 and B2 contents were analysed by the Folin-Ciocalteu, pH differential, and high-performance liquid chromatography (HPLC) techniques, respectively. The results showed that germinated Riceberry rice kefir inhibited all tested bacteria (*Salmonella Typhimurium* DMST 562, *Staphylococcus aureus* DMST 8013, *Bacillus cereus* DMST 5040 and *Escherichia coli* DMST 4212). Germinated Riceberry rice kefir exhibited anti-glycation activity of  $36.78 \pm 2.24\%$  at 25 mg/ml. Besides, antioxidant activity was found with  $IC_{50}$  to  $101.68 \pm 0.52$   $\mu$ g/ml. Total phenolic, anthocyanin, and vitamin B1 and B2 of germinated Riceberry rice kefir were  $16.55 \pm 0.81$  mg GAE/g,  $155.86 \pm 1.93$  mg CGE/g, 10.25  $\mu$ g and 11.42  $\mu$ g, respectively. In conclusion, germinated Riceberry rice kefir displayed biological activities and bioactive compounds that can be useful in functional foods, cosmetics, and pharmaceutical products.

**Keywords:** Kefir, Anti-bacterial, Anti-oxidant, Glycation, Riceberry rice

## บทนำ

ข้าวในประเทศไทยมีหลายชนิดและหลากหลายสายพันธุ์ ข้าวที่นิยมนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพส่วนใหญ่มาจากข้าวสี เนื่องจากข้าวสีมีความโดดเด่นด้านสารที่เป็นประโยชน์เหนือกว่าข้าวขาว เช่น มีคุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidation) จากการศึกษาค้นคว้าวิจัยพบว่าข้าวหอมนิลพบว่ามีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงประมาณ 293 ไมโครโมลต่อกรัม ประกอบไปด้วย Anthocyanin, Pro-anthocyanidin และ Pro-cyanidin ซึ่งเป็นสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Tirasart & Thanomwong, 2015) ในข้าวกล้องงอกยังมีสารกาบาช่วยป้องกันมะเร็งในลำไส้ ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ป้องกันโรคหัวใจ ลดความดันโลหิต อีกทั้งยังป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์อีกด้วย (Vangpikul, 2013) นอกจากนี้มีรายงานการนำข้าวไรซ์เบอร์รี่มาเป็นเครื่องดื่มและศึกษาผลในการลดระดับน้ำตาลในเลือด พบว่า เครื่องดื่มข้าวไรซ์เบอร์รี่สูตรที่ผ่านการพัฒนาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์สามารถใช้เป็นเครื่องดื่มสุขภาพสำหรับผู้สูงอายุโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ควบคู่กับการรับประทานยาทางการแพทย์ (Arunrungsawad et al., 2018)

คีเฟอร์เป็นผลิตภัณฑ์นมหมักที่เกิดจากการหมักนมกับหัวเชื้อคีเฟอร์ (Kefir grain) ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) แบคทีเรียกรดอะซิติก (Acetic acid bacteria) และยีสต์ (Yeast) ที่มีประโยชน์ ทำให้ผลิตภัณฑ์นมหมักที่ได้เกิดองค์ประกอบสารทางชีวภาพ เช่น กรดอินทรีย์ (กรดแลคติกและกรดอะซิติก) แอลกอฮอล์ คีเฟอร์ราน (Kefiran) และแบคทีเรียโอซิน (Bacteriocin) ซึ่งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (Cleveland et al., 2001; Da Silva Malheiros et al., 2010) งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าคีเฟอร์สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมลบและแกรมบวก ตัวอย่างเช่นสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* แต่จะสามารถฆ่าแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยแบคทีเรียในคีเฟอร์ที่ให้ผลยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ เช่น *Lentilactobacillus kefirii*, *Lactobacillus kefirifaciens*, *Lactococcus lactis* และ *Lactocaseibacillus paracasei* ในส่วนที่ไม่ใช่ตัวเซลล์ พบว่ากรดอินทรีย์แลคเตดมีผลต่อการแทรกผ่านเยื่อบุลำไส้ของแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกยับยั้งจุลินทรีย์ได้ทั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus thuringiensis*, *Salmonella enterica* และ *Shigella dysenteriae* และรา *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus nigricans* และ *Penicillium glaucum* ในส่วนของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (Exopolysaccharide, EPS) พบว่า EPS\_DN1 สามารถยับยั้ง *Salmonella enteritidis* และ *Listeria monocytogenes* นอกจากนี้เปปไทด์ Caseicin B และ Caseicin 17 ที่ได้จากคีเฟอร์มีความสามารถในการยับยั้ง *Escherichia coli* การต่อต้านอนุมูลอิสระมีรายงานว่าคีเฟอร์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงจากการทดสอบภายในหลอดทดลอง ภายในเซลล์และสัตว์ทดลอง และจุลินทรีย์ในคีเฟอร์ช่วยเพิ่มฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระให้กับนมหมักทั้งที่มาจากสัตว์และจากพืชได้ เช่น คีเฟอร์ช่วยส่งเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำแอปเปิ้ลนมถั่วเหลืองและนมวัว (Wang et al., 2006; Rekha & Vijayalakshmi, 2008) องค์ประกอบในคีเฟอร์ เช่น

คีเฟอร์ราน มีผลต่อต้านอนุมูลอิสระทั้งในส่วนของอนุมูลออกซิเจน (Reactive oxygen species) และอนุมูลไนโตรเจน (Reactive nitrogen species) จากการทดสอบของ Sirirat & Jelena (2010) พบว่าฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของข้าวหอมมะลิ จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging, Hydroxyl radical scavenging และ Lipid peroxidation สูงกว่านมวัว (Azizi et al., 2021) นอกจากนี้มีการศึกษาการนำข้าวหอมมะลิแดงมาทำการหมักกับคีเฟอร์และศึกษาฤทธิ์ต่าง ๆ พบว่า มีผลต้านการกลายพันธุ์ (Antimutagens) ด้านการอักเสบ ซึ่งสามารถป้องกันโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือด และโรคมะเร็ง (John & Deesenthum, 2014) ขณะที่ล่าสุดพบการต่อต้าน Severe acute respiratory syndrome coronavirus 20 (SARS-CoV-2) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคโควิด-19 (COVID-19) (Azizi et al., 2021)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจนำข้าวไรซ์เบอร์รี่ซึ่งหาง่ายเป็นที่นิยมในการรับประทานมาหมักกับหัวเชื้อคีเฟอร์และทำตัวอย่างให้อยู่ในรูปแบบผง พร้อมทั้งศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย ยับยั้งไกลโคเจนต้านอนุมูลอิสระ ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก แอนโทไซยานิน วิตามิน บี 1 และบี 2 ที่ได้จากคีเฟอร์ข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ล่องงอกในรูปแบบผง เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพต่อไป

## วิธีดำเนินการวิจัย

### เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบได้มาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มี 4 ชนิด ดังนี้ คือ *Salmonella* Typhimurium DMST 562, *Staphylococcus aureus* DMST 8013, *Bacillus cereus* DMST 5040 และ *Escherichia coli* DMST 4212

คีเฟอร์ (Kefir cultures DC 1000 l (Danisco, Poland))

ข้าวไรซ์เบอร์รี่ล่องงอก ยี่ห้อ บ้านไร่ต้นฝั้น (หมู่บ้านนาไผ่ ตำบลห้วยอ้อ อำเภอลอง จังหวัดแพร่)

### การเตรียมตัวอย่างคีเฟอร์

ชั่งข้าวไรซ์เบอร์รี่ล่องงอก 250 กรัม เติมน้ำลงไป 1,000 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1: 4) นำไปต้มเป็นเวลา 20 นาที พักให้เย็น หลังจากนั้นกรองเอาแต่ส่วนน้ำ (น้ำนมข้าว) นำนมข้าวใส่ในโหลแก้วเพื่อทำการหมัก โหลละ 200 มิลลิลิตร ชนิดละ 3 โหล แล้วนำหัวเชื้อคีเฟอร์ร้อยละ 5 มวลต่อปริมาตร (w/v) เติมน้ำลงในโหลแต่ละโหล ผสมให้เข้ากัน ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองแยกหัวเชื้อคีเฟอร์ออก และนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ความดัน 0.05 มิลลิบาร์ เมื่อแห้งนำคีเฟอร์ที่ผ่านการทำให้แห้งมาบดให้ละเอียดเป็นผง เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

### การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของคีเฟอร์โดยวิธี Agar well diffusion

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. Typhimurium* DMST 562, *S. aureus* DMST 8013, *B. cereus* DMST 5040 และ *E. coli* DMST 4212 ในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อทดสอบให้ได้เท่ากับมาตรฐาน McFarland

No.0.5 ( $1.5 \times 10^8$  cfu ต่อมิลลิลิตร) ทำการเกลี่ย (Swab) เชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร Nutrient agar (NA) เจาะหลุมโดยใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จากนั้นละลายตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น ที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้มีระดับความเข้มข้นเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุม ใช้ยาปฏิชีวนะ Ampicillin ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เป็น Positive control และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็น Negative control นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลการทดสอบโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Srisayam & Chantawannakul, 2010)

#### **การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Broth dilution**

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบและใช้เชื้อที่มีจำนวนเซลล์เท่ากับ  $1.5 \times 10^8$  cfu ต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางตัวอย่างซีเฟอรินในระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB แบบเจือจางสองเท่าลำดับส่วนและทำการเจือจางจนถึงหลอดที่ 9 ต่อมาดูดเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ลงในหลอดทุกหลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) จากหลอดที่เริ่มสังเกตเห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดไม่ขุ่น เมื่อเทียบกับหลอดที่ 10 ที่มีเฉพาะแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบบันทึกผล ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

#### **การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าทำลายแบคทีเรียด้วยวิธี Agar dilution**

นำปิเปตดูดของเหลวในหลอดที่ไม่มีความขุ่นที่ได้จากการหาค่า MIC ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่และทำการเกลี่ย (Spread plate) ลงบนอาหาร NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกค่า Minimum bactericidal concentration (MBC) จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่พบการเจริญของโคโลนีแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

#### **การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชัน**

ทดสอบปฏิกิริยาไกลเคชันโดยอาศัยเทคนิค Albumin glycation (Matsuura, 2002) การทดสอบเริ่มจากเตรียมตัวอย่างละลายในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide, DMSO) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำตาลฟรุกโตส ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มีโซเดียมเอไซด์ (Sodium azide) ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นตั้งปฏิกิริยาเป็นระยะเวลา 21 วัน วัดค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ความยาวคลื่น Excitation wavelength เท่ากับ 355 นาโนเมตร และ Emission wavelength เท่ากับ 460 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งการเกิดไกลเคชัน

#### **การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ**

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอ้างอิงจากวิธีของ Srisayam & Chantawannakul (2010) นำตัวอย่างซีเฟอรินมาทำเป็นสารละลายโดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ เจือจางตัวอย่างซีเฟอรินให้ได้ความเข้มข้น 10, 50, 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-

hydrazy) โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายให้อยู่ในรูปของอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบโดยการดูดตัวอย่างคีเฟอร์เวย์ แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลาย DPPH ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex ทิ้งไว้ 15 นาที ในที่มืด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมี Ascorbic acid เป็น Positive control นำค่าที่ได้มาคำนวณหาร้อยละการยับยั้ง และรายงานเป็นค่า IC<sub>50</sub> คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ได้จากการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ ร้อยละการยับยั้งกับความเข้มข้นของตัวอย่างคีเฟอร์ที่ใช้

#### การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดหาจากการเติมตัวอย่าง 0.25 มิลลิลิตร ในน้ำ 2.5 มิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย Folin-Ciocalteu หลังจากนั้น 5 นาที เติมร้อยละ 20 ของ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยมีกรดแกลลิก (Gallic acid) 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นสารมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

#### การตรวจหาปริมาณแอนโทไซยานิน

การวิเคราะห์เริ่มจากเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1 (KCl-HCl buffer) และ pH 4.5 (CH<sub>3</sub>COONa-HCl) จากนั้นเปิดตัวอย่าง 300 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย pH บัฟเฟอร์ ปริมาตร 2.7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงสารละลาย pH 1 และ pH 4.5 ที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มา คำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (TA) ด้วยวิธี pH Differential method ตามวิธีของ (Lee et al., 2005) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยคำนวณจากสมการที่ (1)

$$TA \text{ (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = (A \times MW \times DF \times 1000) / (\epsilon \times l) \quad (1)$$

โดยที่ค่าดูดกลืนแสง (A) = (A<sub>510</sub> - A<sub>700</sub>) pH 1.0 - (A<sub>510</sub> - A<sub>700</sub>) pH 4.5

MW = มวลโมเลกุลของแอนโทไซยานิน

DF = ระดับความเจือจาง

l = ระยะทางที่แสงผ่านตัววัด

ε = โมลาร์แอบซอร์ปติวิตี (Molar absorptivity)

โดยทั่วไปมักใช้ค่าของ Cyanidin-3-glucoside ซึ่งมีค่าเท่ากับ 26,900 โมลาร์แอบซอร์ปติวิตี

#### การวิเคราะห์วิตามิน บี 1 และ บี 2

เตรียมสารละลายมาตรฐานไทเอมีนและสารละลายมาตรฐานไรโบฟลาวินความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารตัวอย่างความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยเอทานอล จากนั้นทำการกรองสารมาตรฐานและตัวอย่างด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน

ก่อนนำไปวิเคราะห์วิตามิน บี 1 และ บี 2 ด้วยเครื่อง Liquid chromatography - Mass spectrometry (LC-MS) (Shimadzu UHPLC binary pump nexera X2 / 8060 LC-MS) ปริมาตรของสารที่ฉีดเท่ากับ 1 ไมโครลิตร ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Column oven) ใช้อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ใช้คอลัมน์ Shimpack C18 GIS 2.1×100 มิลลิเมตร, 3 ไมโครเมตร อัตราการไหลของสาร 0.2 มิลลิตรต่อนาที มีระยะเวลาและร้อยละตัวทำละลายที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ดังตารางที่ 1 (Table 1)

**Table 1** Gradient times and percentage of solvent used as mobile phase

Time (Minute)	A (%)	B (%)
0	90	10
1	90	10
6	85	15
8	80	20
8.5	80	20
12	5	95
13	5	95
15	90	10
21	90	10

**Remark** A = 0.2 % Formic acid และ B = Acetonitrile

ในส่วนของ Mass spectrometer ดำเนินการโดยใช้โหมด ESI Source : Nebulizing gas flow : 3 ลิตรต่อนาที, Heating gas flow: 10 ลิตรต่อนาที, Interface temperature: 300 องศาเซลเซียส, DL Temperature : 250 องศาเซลเซียส, Heat block temperature : 400 องศาเซลเซียส, Drying gas flow: 10 ลิตรต่อนาที

#### การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Tukey's test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ( $P < 0.05$ ) จากการทำการทดลอง 3 ซ้ำ

#### ผลการวิจัย

##### ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของคีเฟอร์โดยวิธี Agar well diffusion

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของคีเฟอร์ข้าวไรซ์เบอร์รี่กล่องงอก โดยวิธี Agar well diffusion โดยใช้ตัวอย่างความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร พบว่า มีความสามารถยับยั้งเชื้อทั้ง 4 ชนิด แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก โดยสามารถยับยั้ง *B. cereus* ได้สูงกว่า Positive control ที่ใช้ คือ Ampicillin ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ดังตารางที่ 2 (Table 2) ขณะที่นมข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ไม่ผ่านการหมักไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบได้

**Table 2** The average inhibition zones of germinated Riceberry rice kefir against tested bacteria (n=3)

Bacteria	Inhibition Zones (mm)	
	Germinated Riceberry rice kefir (100 mg/ml)	Ampicillin (50 µg/ml)
<i>S. aureus</i>	17.00±1.73 <sup>a</sup>	27.33±0.58 <sup>b</sup>
<i>B. cereus</i>	19.33±1.15 <sup>b</sup>	13.67±0.58 <sup>a</sup>
<i>S. Typhimurium</i>	18.67±2.89 <sup>a</sup>	15.67±0.58 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>	16.67±0.58 <sup>a</sup>	22.00±1.00 <sup>b</sup>

**Remark** Lower caseletters (<sup>a,b</sup>) in the same row indicate significant difference (p<0.05) of a mean values of inhibition zones.

ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง (MIC) และฆ่า (MBC) เชื้อแบคทีเรีย ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย พบว่า คีเฟอร์ข้าวไรซ์เบอร์รี่ กล้องงอก ยับยั้ง *B. cereus*, *S. Typhimurium* และ *E. coli* ได้ไม่แตกต่างกัน พบค่า MIC เท่ากับ 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ *S. aureus* มีความต้านทานต่อตัวอย่างสูงกว่าเชื้อทดสอบอื่น มีค่า MIC เท่ากับ 25.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในส่วนของฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย พบว่าคีเฟอร์ข้าวไรซ์เบอร์รี่กล้องงอกสามารถ ฆ่าแบคทีเรียแกรมลบที่นำมาทดสอบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยฆ่า *S. Typhimurium* และ *E. coli* ได้ดีกว่า *S. aureus* และ *B. cereus* ดังตารางที่ 3 (Table 3)

**Table 3** Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of germinated Riceberry rice kefir (n=3)

Bacteria	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>S. aureus</i>	25.00±0.00 <sup>b</sup>	100.00±0.00 <sup>b</sup>
<i>B. cereus</i>	12.50±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>b</sup>
<i>S. Typhimurium</i>	12.50±0.00 <sup>a</sup>	25.00±0.00 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>	12.50±0.00 <sup>a</sup>	25.00±0.00 <sup>a</sup>

**Remark** Lower caseletters (<sup>a,b</sup>) in the same column indicate significant difference (p<0.05) of a mean values of % inhibition.

### ผลการทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งไกลเคชัน

การทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งไกลเคชัน พบว่า คีเฟอร์จากข้าวไรซ์เบอร์รี่กลัองงอกมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแสดงด้วยค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $101.68 \pm 0.52$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี Ascorbic acid เป็น positive control มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $3.05 \pm 0.21$  และยับยั้งไกลเคชันได้เท่ากับร้อยละ  $36.78 \pm 2.24$  ที่ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น ดังตารางที่ 4 (Table 4)

**Table 4** Anti-glycation activity of germinated Riceberry rice kefir (n=3)

Examination	Concentration (mg/ml)	Percentage of inhibition (%)
Anti-glycation activity	6.25	$3.52 \pm 0.69^a$
	25	$36.78 \pm 2.24^b$

**Remark** Lower caseletters (<sup>a,b</sup>) in the same column indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) of a mean values of % inhibition.

### ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก แอนโทไซยานิน และวิตามิน บี 1 และ บี 2

การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของคีเฟอร์ข้าวไรซ์เบอร์รี่กลัองงอกพบว่า คีเฟอร์ข้าวไรซ์เบอร์รี่กลัองงอกมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ  $16.55 \pm 0.81$  มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง ขณะที่คีเฟอร์ข้าวไรซ์เบอร์รี่กลัองงอกมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ  $155.86 \pm 1.93$  มิลลิกรัมสมมูลของ cyanidin-3-glucoside ต่อกรัมตัวอย่าง และมีปริมาณวิตามิน บี 1 และ บี 2 ใกล้เคียงกัน แสดงดังตารางที่ 5 (Table 5)

**Table 5** Phenolic, anthocyanin, vitamin B1 and B2 contents contained in germinated Riceberry rice kefir (n=3)

Chemical compounds	Quantity
Phenolic content (mgGAE/g Sample)	$16.55 \pm 0.81$
Anthocyanin content (mgCGE/g Sample)	$155.86 \pm 1.93$
B1 ( $\mu$ g)	10.25
B2 ( $\mu$ g)	11.42

## อภิปรายผล

ในการยับยั้งแบคทีเรียของคีเฟอร์ข้าวไรซ์เบอร์รี่กล้องงอกเกิดจากจุลินทรีย์ในคีเฟอร์สามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อะซีตัลดีไฮด์ คาร์บอนไดออกไซด์ คีเฟอร์แรน (Kefiran) และแบคทีริโอซิน (Bacteriocins) (Powell, 2006) Organic acid และ Fatty acid รวมทั้งโปรตีนไฮโดรไลเซท (Joo et al., 2004) ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Srisayam et al. (2018) ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและงาดำ พบว่าคีเฟอร์จากนมถั่วเหลืองและงาดำสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Deeseenthum & Pejovic (2017) ที่ได้ศึกษาองค์ประกอบต่าง ๆ ของคีเฟอร์นมวัว และนมแพะ เช่น กรดอินทรีย์ คีเฟอร์ราน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่า มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดี Sriraksa et al. (2013) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียของแบคทีริโอซินที่ผลิตจากคีเฟอร์เปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน พบว่าทั้งยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและแบคทีริโอซินมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* และ *P. fluorescens* ได้ เมื่อพิจารณาความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรียพบว่า แบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* และ *B. cereus* ทนต่อตัวอย่างได้สูงกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยใช้ตัวอย่างความเข้มข้นที่ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงสามารถฆ่าแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 2 ชนิดได้ ผลดังกล่าวอาจเนื่องมาจากชนิดสารและองค์ประกอบในคีเฟอร์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งและทำลายแบคทีเรียที่จำเพาะต่อแกรมลบและแกรมบวกได้แตกต่างกัน

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของคีเฟอร์จากข้าวไรซ์เบอร์รี่กล้องงอก ( $IC_{50}=101.68\pm 0.52$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Semsang et al. (2015) ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าวไทย โดยข้าวไรซ์เบอร์รี่กล้องงอกมีองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกและแอนโทไซยานินที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ในข้าวกล้องงอกยังมีสารแกมมาโอไรซานอล ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Ruen-ngam et al., 2018) และ Sueaman et al. (2019) พบว่าข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่มีสีม่วงแดงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่มีสีขาว รายงานที่ผ่านมาพบว่ากรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์พบในข้าวกล้องสีน้ำตาลที่สูงสุด รองลงมาคือข้าวกล้องสีแดงและน้ำตาลตามลำดับ (Irakli et al., 2012) แสดงให้เห็นว่าสีของเมล็ดข้าวมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเช่นเดียวกับปริมาณแอนโทไซยานิน ซึ่งพบว่าแอนโทไซยานินได้มาจากสีม่วงดำในส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดของข้าว และมีรายงานว่าปริมาณแอนโทไซยานินพบในเยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีม่วงดำเข้มข้นสูงกว่าเยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีม่วงปานกลาง สีน้ำตาล และสีขาว (Rahman et al., 2013) งานวิจัยของ Vongsudin et al. (2012) ทำการศึกษาประสิทธิภาพการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดธัญพืชออกหมัก 4 ชนิด คือ ข้าวหอมนิล ข้าวโพด ถั่วเหลืองและงาดำที่ผ่านกระบวนการงอกแล้วนำมาหมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae* และ *Rhizopus oryzae* พบว่า กระบวนการงอกระยะเวลาหมักและเชื้อจุลินทรีย์ มีอิทธิพลร่วมกันต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารพฤกษเคมี

ในฉัฏพีซงอกหมักทั้ง 4 ชนิด โดยกระบวนการหมักทำให้ปริมาณสารฟีนอลิก GABA,  $\gamma$ -oryzanol, วิตามิน E, Daidzein และ Genistein เพิ่มขึ้น 1-4 เท่า โดยอาศัยเอนไซม์ที่ถูกสังเคราะห์จากจุลินทรีย์ ทำปฏิกิริยากับสารพฤกษเคมีในฉัฏพีซและเกิดกระบวนการทางชีวเคมี

นอกจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คีเฟอร์ข้าวไรซ์เบอร์รี่กลัองงอกมีฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชัน ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ช่วยต่อต้านการเสื่อมสภาพของเซลล์ โดยไกลเคชันเป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์สุดท้ายอยู่ในรูปของสาร Advanced Glycation Endproducts (AGEs) ซึ่งถือว่าเป็นสารพิษที่เรียกว่าไกลโคท็อกซิน (Glycotoxins) ทำให้เซลล์เสื่อมสภาพ โดยมีผลกระทบต่ออย่างมากในโรคเบาหวาน ซึ่งมักทำให้เกิดโรคแทรกซ้อน เช่น โรคหลอดเลือดแข็งตัว ต้อกระจก โรคไต เนื่องจากไกลเคชันมีความสัมพันธ์กับระดับน้ำตาลในเลือด กรณียกระดับน้ำตาลในเลือดสูงในผู้ป่วยเบาหวานส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาไกลเคชันได้สูงตามมา และการเกิดอนุมูลอิสระในระหว่างปฏิกิริยาไกลเคชันในขั้นตอนการเกิดสารประกอบแอมาดอริ (Amadori product) อนุมูลอิสระดังกล่าวทำให้เกิดภาวะเครียดของเซลล์และการอักเสบของเนื้อเยื่อ ทำให้เซลล์เสื่อมสภาพ (Glycooxidation) จากการทำลายเนื้อเยื่อโปรตีน ไขมัน กรดนิวคลีอิก (Singhan & Suttajit, 2017)

การตรวจวิเคราะห์หาวิตามิน บี 1 และ บี 2 พบว่า ตัวอย่างคีเฟอร์ข้าวไรซ์เบอร์รี่กลัองงอก มีปริมาณวิตามิน บี 1 และ บี 2 ใกล้เคียงกัน โดยมีปริมาณวิตามิน บี 2 สูงกว่าวิตามิน บี 1 เล็กน้อย ซึ่งวิตามิน บี 1 และ บี 2 เป็นสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย โดยทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบของ โคเอนไซม์ ในการใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงาน นอกจากนี้การขาดวิตามิน บี 1 สามารถทำให้เกิดโรคเหน็บชา และการขาดวิตามิน บี 2 ทำให้เกิดความผิดปกติของร่างกาย เติบโตช้า ซึ่งมีผลต่อสุขภาพ

### สรุปผลการวิจัย

จากการทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้านแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ *Salmonella* Typhimurium DMST 562, *Staphylococcus aureus* DMST 8013, *Bacillus cereus* DMST 5040 และ *Escherichia coli* DMST 4212 พบว่าคีเฟอร์ข้าวไรซ์เบอร์รี่กลัองงอกสามารถยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียทดสอบได้ทั้ง 4 ชนิด สามารถยับยั้งไกลเคชันได้เท่ากับร้อยละ 36.78 $\pm$ 2.24 ยับยั้งอนุมูลอิสระให้ค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 101.68 $\pm$ 0.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คีเฟอร์ข้าวไรซ์เบอร์รี่กลัองงอกมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณแอนโทไซยานินและวิตามินบี 1 และ บี 2 เท่ากับ 16.55 $\pm$ 0.81 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง 155.86 $\pm$ 1.93 มิลลิกรัมสมมูลของ cyanidin-3-glucoside ต่อกรัมตัวอย่าง 10.25 ไมโครกรัม และ 11.42 ไมโครกรัม ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าคีเฟอร์ข้าวไรซ์เบอร์รี่กลัองงอกมีฤทธิ์และมืองค์ประกอบของกลุ่มสารที่มีความสำคัญทางชีวภาพ รวมทั้งมีวิตามินที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ดังนั้นการนำข้าวสี เช่น ข้าวไรซ์เบอร์รี่ มาหมักกับหัวเชื้อคีเฟอร์และผลิตในรูปแบบผงสามารถพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพหรือ ส่วนประกอบทางเภสัชภัณฑ์ได้ แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาต่อในเรื่องของความปลอดภัย หรือฤทธิ์ทางชีวภาพในสัตว์ทดลองในอนาคต

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนพัฒนาการวิจัยและบริหารจัดการงานวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 เลขที่ RDI-2-63-39 ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์และสาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม สำหรับสถานที่และเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

- Arunrungsawad S, Chomsri N, Inklub L. The effect of Riceberry rice drink consumption on glycated hemoglobin (HbA1c) in elderly with type 2 diabetes. *Christian University Journal* 2018;24(3):355-364.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 2001;71:1-20.
- Da Silva Malheiros P, Daroit DJ, Brandelli A. Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trends in Food Science & Technology* 2010;21:284-292.
- Deeseenthum S, Pejovic J. Bacterial inhibition and antioxidant activity of kefir produced from Thai Jasmine rice milk. *Biotechnol* 2010;9(3):332-337.
- Irakli MN, Samanidou VF, Biliaderis CG, Papadoyannis IN. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in rice using solid-phase extraction and RP-HPLC with photodiode array detection. *Journal of Separation Science* 2012;35(13):1603-1611.
- John SM, Deeseenthum S. Antioxidant activities of color rice-milk kefir, in *Proceeding of 10<sup>th</sup> Science Research Conference*, Mahasarakham University, Thailand; 2014: 479-491.
- Joo JH, Yi SD, Lee GH, Lee KT, Oh MJ. Antimicrobial activity of soy protein hydrolysate with *Asp. saitoi* pretense. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 2004;33:229-235.
- Lee J, Durst R, Wrolstad R. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method. collaborative study. *Journal of AOAC International* 2005;88(50):1269-1278.
- Matsuura N, Aradate T, Sasaki C, Kojima H, Ohara M, Hasegawa J, Ubukata M. Screening system for the Maillard reaction inhibitor from natural product extracts. *Journal of Health Science* 2002;48(6):520-526.
- Powell JE. Bacteriocins and bacteriocin producers present in kefir and kefir grains. Master of Science in food science (Department of Food Science), Faculty of Agriscience. Stellenbosch University, 2006.
- Rahman MM, Lee KE, Lee ES, Matin MN, Lee DS, Yun JS et al. The genetic constitutions of complementary genes Pp and Pb determine the purple color variation in pericarps with cyanidin-3-O-glucoside depositions in black rice. *Journal of Plant Biology* 2013;56:24-31.
- Rekha C, Vijayalakshmi G. Biomolecules and nutritional quality of soymilk fermented with probiotic yeast and bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2008;151:452-463.

- Ruen-ngam D, Tawai C, Sukonthamut C, Nokkoul R. Alternative extraction and purification methods of oryzanol from rice bran and its antioxidant scavenging activity. *Journal of Food Technology*, Siam University 2018;13(1):84-97.
- Semsang N, lungka N, Juntachai W. Flavonoid and phenolic contents and antioxidant activities of Thai rice extracts. ChiangMai Rajabhat University; 2015.
- Singhan C, Suttajit M. Inhibition of oxidation and glycation in diabetes by Thai indigenous vegetables. *Naresuan University Journal: Science and Technology* 2017;25(3):1-11.
- Sriraksa R, Deeseenthum S, Moongngam A, Sakwivatkul K. Antibacterial activity and heat resistant property of bacteriocin produced from kefir. in *Proceeding of Natural Beauty and Health through Aesthetic Sciences (1<sup>st</sup> Decade of Aesthetic Sciences and Health And 50<sup>th</sup> Anniversary of KKU)*, Khon Kaen University, Thailand 2013: 231-235.
- Srisayam V, Chantawannakul P. Antimicrobial and antioxidant properties of Thai honeys produced by *Apis mellifera* in Thailand. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 2010;2(2):77-83.
- Srisayam M, Klinrat J, Chodnakarin A. Biological properties of kefir whey samples produced from soy and black sesame milks. *Burapha Science Journal* 2018;23(2):872-886.
- Sueaman V, Paksee S, Arpsuwan A, Chalongsuppanyoo R, Sam-ang P, Jannoey P, Pinwattana K. Determination of antioxidant capacity of Riceberry and Khao Dok Mali 105 cultivars. *PSRU Journal of Science and Technology* 2019;4(3):95-108.
- Tirasarot J, Thanomwong C. Production of healthy beverage from “Homnil” rice. *KKU Science Journal* 2015;43(3):395-402.
- Vangpikul S. Effect of germinated brown rice on the growth and acid production of probiotic bacteria. *Research and Development Institute, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi*; 2013.
- Vongsudin W, Laohakunjit N, Kerdchoechuen O. The Biological activities of fermented germinated cereals extracts. *Agricultural Science Journal* 2012;43(2):461-464.
- Wang Y, Yu R, Chou C. Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacterial. *Food Microbiology* 2006;23:128-135.
- Azizi NF, Kumar MR, Yeap SK, Abdullah JO, Khalid M, Omar AR, et al. Kefir and its biological activities. *Foods* 2021;10:1-26.