



รายงานการวิจัย

**Resveratrol และ Phenolic Compounds ขององุ่นและไวน์ผลิตใน
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี: การศึกษาเชิงคุณภาพและสุขภาพ**

**Resveratrol and Other Phenolic Compounds of Grapes and
Wines Produced at Suranaree University of Technology:
Studies on Qualities and Health Aspects**

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.กนกอร อินทราพิเชฐ

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมงานวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. กรรข อินทราพิเชฐ

สาขาวิชาชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2546 - 2547

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2553

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ เพื่อ ศึกษาปริมาณสารประกอบ *trans-resveratrol* และ phenolic compounds อื่น ๆ ขององุ่นและไวน์ที่ปลูกและผลิตในประเทศไทย โดยเฉพาะไวน์ที่ผลิตจากองุ่นปลูกได้ในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยศึกษาติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบ phenolic compounds ระหว่างกระบวนการผลิตไวน์ และศึกษาการดูดซึม การออกฤทธิ์ต้าน oxidation และ การต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งขององุ่นแดงบางสายพันธุ์ปลูกในฟาร์มมหาวิทยาลัยฯ ในรูปสารสกัดองุ่น (grape pomace extract-GPE) ไวน์ (grape wine-GWI) และสารบริสุทธิ์ *trans-resveratrol* (RES) เพื่อแสดงให้เห็นถึงประโยชน์เชิงอาหารสุขภาพของผลิตผลองุ่นแดง การทดลองประกอบด้วย

- 1) การวิเคราะห์ปริมาณ total phenolic compounds, *trans-resveratrol* และ antioxidant property ของไวน์องุ่นพันธุ์ต่าง ๆ ที่ปลูกได้ในฟาร์มของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- 2) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ phenolic compounds ระหว่างการหมักและบ่มไวน์แดงด้วยยีสต์ต่างสายพันธุ์ 3 สายพันธุ์
- 3) ศึกษาการดูดซึมและอิทธิพลของ เรสเวอราทรอล และผลิตผลองุ่นแดงต่อ โครงสร้างจุลภาคเซลล์ตับหนู
- 4) ศึกษาอิทธิพลผลิตผลองุ่นแดงต่อความเป็นพิษและการเพิ่มจำนวนของเซลล์
- 5) ศึกษาอิทธิพลของผลิตผลจากองุ่นแดงต่อโปรแกรมการตายของเซลล์ไมโทโสม

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของไวน์ผลิตจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ทำการวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณสาร phenolic และคุณภาพการเป็นสาร antioxidant ของไวน์บางชนิดผลิตในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยเฉพาะใช้ไวน์ผลิตจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีเป็นกรณีศึกษา จากไวน์ตัวอย่างทั้งไวน์แดงและไวน์ขาว 9 สายพันธุ์ วิเคราะห์ปริมาณ total phenolic compounds (TPC) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ประสิทธิภาพการจับอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และประสิทธิภาพการลดประจุของธาตุเหล็กด้วยวิธี ferric reducing-antioxidant power (FRAP) พบว่าไวน์แดงมีปริมาณ TPC, flavonoids และความเป็นสาร antioxidant มากกว่าไวน์ขาวอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ผลการใช้ capillary electrophoresis (CE) ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงวิเคราะห์สาร phenolic ในไวน์ พบ *trans-resveratrol* ในไวน์สายพันธุ์ Shiraz, Zinfandel และ ไวน์ผสมหลายสายพันธุ์ของดงพญาเย็นเท่านั้น พบ (+)-catechin ในไวน์ทุกชนิดยกเว้นสายพันธุ์ Chasselar Dore

และปริมาณ (+)-catechin มีมากกว่า (-)-epicatechin และ phenolic acid ที่พบมากในไวน์แดง คือ gallic acid

การเปลี่ยนแปลงของ Phenolic Compounds ระหว่างการหมักไวน์แดงด้วยยีสต์ต่างสายพันธุ์

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิกระหว่างการหมักแอลกอฮอล์ (alcoholic fermentation- ALF) การหมัก malolactic fermentation (MLF) และการบ่ม (aging- AGE) ใช้ตัวอย่างองุ่น (*Vitis vinifera*) สายพันธุ์ Exotic และ Shiraz ที่ปลูกในฟาร์ม มทส. หมักด้วยยีสต์ 3 สายพันธุ์ (*Saccharomyces cerevisiae* K1V1116, *S. cerevisiae* CY3079 และ *S. bayanus* EC1118) ร่วมกับการเติม *trans-resveratrol* (ความเข้มข้น 0, 5 และ 10 ppm) ส่วนการหมัก malolactic ใช้แบคทีเรียใช้กรดแลคติก *Oenococcus oeni* MBR.B1 บ่มไวน์ด้วยขึ้นไม้โอ๊ค และเก็บที่อุณหภูมิ 15 °C วิเคราะห์ปริมาณ *trans-resveratrol* และ phenolic compounds ใช้วิธี capillary electrophoresis และทำการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไวน์ที่หมักโดยไม่เติม *trans-resveratrol* และเติม 10 ppm ด้วยยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ด้วยวิธี quantitative descriptive analysis (QDA) ใช้ผู้ประเมินที่คุ้นเคยและดื่มไวน์เป็นประจำ 7 คน คุณลักษณะที่ประเมินประกอบด้วย สี (color) กลิ่น (aroma) รสชาติ (taste) ความเข้มข้น (body) และการยอมรับโดยรวม (overall acceptance)

ระหว่าง ALF ไวน์ทั้ง 2 ชนิด พบว่า ความเข้มข้นของปริมาณ *trans-resveratrol* เพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 3 และลดลงหลังจากวันที่ 5 ของการหมัก การเติม *trans-resveratrol* ก่อนกระบวนการหมักทำให้มีปริมาณของ *t-resveratrol* สูงกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้เติม เมื่อ ALF สิ้นสุดลง พบว่า ความเข้มข้นของฟีนอลิกที่ได้จากยีสต์ต่างสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ส่วนการเติม *trans-resveratrol* บริสุทธิ์ไม่มีผลต่อความเข้มข้นของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอื่นๆ หลังจาก MLF พบว่า *trans-resveratrol* เพิ่มขึ้นในทุกสภาวะ โดยเฉพาะในสภาวะที่มีการเติม *trans-resveratrol* นอกจากนี้ยังพบว่า phenolic acid บางชนิด เช่น gentisic, *p*-hydroxybenzoic, salicylic, caffeic และ protocatechuic acid เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก malolactic ด้วย ระหว่าง AGE พบว่า มีการลดลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด *trans-resveratrol* และ monomeric flavonoids รวมถึง phenolic acid บางชนิด

สายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้หมักในการทดลองนี้ พบว่ามีอิทธิพลต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไวน์ โดยพบว่ายีสต์ใน 3 สายพันธุ์ที่ใช้ทดลอง สายพันธุ์ EC1118 ให้คุณลักษณะที่ดีกว่าสายพันธุ์ K1V1116 และ CY3079 ขณะที่การเติมหรือไม่เติมสารบริสุทธิ์ของ *trans-resveratrol* ในการผลิตไวน์ มีอิทธิพลน้อยหรืออาจไม่มีผลต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไวน์

ผลการดูดซึมและอิทธิพลของ เรสเวอราทรอล และผลิตภัณฑ์องุ่นแดงต่อโครงสร้างจุลภาคเซลล์ตับหนู

การดูดซึมของผลิตภัณฑ์ขององุ่นแดงสายพันธุ์ Zinfandel จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในหนูเมาส์ ICR ที่ได้รับสารทางปากทุกวันนานถึง 6 เดือน โดยการตรวจหาสารในน้ำเลือด (plasma) ด้วย capillary electrophoresis (CE) และสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของเซลล์ด้วย transmission electron microscope (TEM) พบว่า ใน plasma ของหนู ตรวจพบ total phenolic compound จากน้ำองุ่นละกาท้องสกัดได้ 23% ใน 24 ชั่วโมง ตรวจไม่พบ resveratrol ใน plasma ของหนูที่ได้รับโดยตรงหรือ 20 mg/ml resveratrol ผสมในไวน์ อาจเนื่องความจำกัดในการตรวจของ CE แต่ตรวจพบ resveratrol ได้จาก plasma ที่นำออกจากหนูก่อนแล้วผสม 16 mg/ml resveratrol หนูที่ได้รับ 12% ethanol ทั้งระยะสั้นและระยะยาว มีโครงสร้างเซลล์เปลี่ยนแปลง พบมีการเปลี่ยนการจัดตัวของเยื่อ endoplasmic reticulum และ mitochondria เปลี่ยนแปลง chromatin ความแน่นขึ้น และสะสมเม็ดไขมัน น้ำองุ่นไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ แต่ 10% Dimethylsulfoxide (DMSO), resveratrol (ละลายใน 12% ethanol) และกากองุ่นสกัด (ละลายใน 10% DMSO) เปลี่ยนแปลงโครงสร้างเซลล์เล็กน้อยหลังได้รับสาร 6 เดือน เยื่อ endoplasmic reticulum ขยายขนาด mitochondria ใหญ่ขึ้น และปรากฏมีถุง vesicles ดังนั้นผลิตภัณฑ์องุ่นแดงที่หนูทดลองได้รับทางปากถูกดูดซึมได้และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์เพียงน้อยซึ่งอาจไม่ทำให้เซลล์เปลี่ยนหน้าที่

อิทธิพลผลิตภัณฑ์องุ่นแดงต่อความเป็นพิษและการเพิ่มจำนวนของเซลล์

ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดกากองุ่นและไวน์จากองุ่นแดงสายพันธุ์ซึราซที่ปลูกในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีด้านความเป็นพิษเซลล์โดยวิธี brine shrimp lethality assay (BSLA) และด้านการต้านต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ไมโอโลมา (P3X63Ag8.653) ของหนูเมาส์ BALB/c ด้วยวิธี MTT ความเป็นพิษและฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของผลิตภัณฑ์องุ่นโดยเปรียบเทียบฤทธิ์ที่ 50% (LC_{50} และ IC_{50}) ใช้ resveratrol เป็นสารมาตรฐานเทียบฤทธิ์ ความเป็นพิษและการยับยั้งการเจริญของเซลล์ขึ้นกับความเข้มข้นและเวลาที่ได้รับสารอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) LC_{50} ของสารสกัดกากองุ่นที่ 6 ชม. เท่ากับ 512.86 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 12 ชม. เท่ากับ 371.53 $\mu\text{g/ml}$ และ ที่ 24 ชม. เท่ากับ 28 $\mu\text{g/ml}$ ค่า LC_{50} ของไวน์องุ่นที่ 6 ชม. เท่ากับ 158.49 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 12 ชม. เท่ากับ 12.30 $\mu\text{g/ml}$ และ ที่ 24 ชม. เท่ากับ 10.23 $\mu\text{g/ml}$ resveratrol มีค่า LC_{50} ที่ 6 ชม. เท่ากับ 2.40 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 12 ชม. เท่ากับ 1.41 $\mu\text{g/ml}$ และวิเคราะห์หาไม่ได้ ที่ 24 ชม. ส่วนฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งสายพันธุ์เม็ดเลือดขาว (myeloma cell) ของผลิตภัณฑ์องุ่นที่ IC_{50} ของสารสกัดกากองุ่นที่ 6 ชม. เท่ากับ 371.54 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 12 ชม. เท่ากับ 131.83 $\mu\text{g/ml}$ และ ที่ 24 ชม. เท่ากับ 75.86 $\mu\text{g/ml}$ ที่ IC_{50} ของไวน์องุ่น

ที่ 6 ชม. เท่ากับ 199.53 ug/ml ที่ 12 ชม. เท่ากับ 81.28 ug/ml และ ที่ 24 ชม. เท่ากับ 43.65 ug/ml ที่ IC_{50} ของ resveratrol ที่ 6 ชม. เท่ากับ 63.10 ug/ml ที่ 12 ชม. เท่ากับ 21.38 ug/ml และ ที่ 24 ชม. เท่ากับ 6.03 ug/ml แสดงให้เห็นว่าผลผลิตของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมีพิษและฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูเมาส์ ซึ่งอาจสามารถนำไปใช้ในการป้องกันมะเร็งได้

อิทธิพลของผลผลิตจากองุ่นแดงต่อโปรแกรมการตายของเซลล์ไมอีโดมา

อิทธิพลชักนำโปรแกรมการตาย (apoptosis) ของเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาวไมอีโดมาของหนูเมาส์ (mouse myeloma cells) จากผลผลิตขององุ่นแดง Shiraz โดยศึกษาจากการเปลี่ยนรูปร่างลักษณะตายของเซลล์ การแตกหักเป็นชิ้นของสาย DNA และการปรากฏมีของโปรตีนที่เกี่ยวข้องด้วยเทคนิค Western blotting พบว่าผลผลิตขององุ่นชักนำเซลล์ให้ตายหลังได้รับสาร 6 ชั่วโมงและประมาณ 4-7 เท่า น้อยกว่าสาร resveratrol การแตกหักของสาย DNA มากหลังได้รับสาร 12 ชั่วโมง โปรตีน p53 และ caspase-8 ถูกชักนำมากที่ความเข้มข้นของสารต่ำ (10 -100 ug/ml) และที่ 3 ชั่วโมง ตรงกันข้ามกับ Bcl-2 ที่ความเข้มข้นสูงปรากฏมากในช่วงต้นและลดลงเมื่อเวลานานขึ้นถึง 24 ชั่วโมง ในขณะที่ p53, caspase-8 และ caspase-3 เพิ่มขึ้นตามเวลา และเมื่อได้รับสารมาก (1000 ug/ml) ผลผลิตขององุ่นนี้อาจชักนำการตายผ่านวิถีภายนอกโดย caspase-8 และ caspase-3 ในช่วงต้นที่ได้รับสาร และผ่านวิถีภายในโดย Bcl-2 และ caspase-3 เมื่อได้รับเป็นเวลานาน การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าผลผลิตขององุ่น Shiraz ชักนำให้เซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูตายแบบ apoptosis ได้ และผลผลิตขององุ่นเหล่านี้สามารถประยุกต์ใช้เป็นสารธรรมชาติในการป้องกันการเกิดมะเร็งหรืออาจใช้รักษามะเร็งได้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	จ
สารบัญ	ณ
สารบัญตาราง	๗
สารบัญภาพ	ณ
 บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ	4
1.5 ประโยชน์ของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ	4
เอกสารอ้างอิง	5
2 ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
2.1 คำนำ	7
2.2 องค์ประกอบเคมีขององุ่นและไวน์	9
2.2.1 Acids	9
2.2.2 Sugars	9
2.2.3 Phenolic compounds and related polyphenols	9
2.3 ไวน์และประโยชน์ต่อสุขภาพ	14
เอกสารอ้างอิง	16
3 สารประกอบฟีนอลิกและคุณสมบัติด้านออกซิเดชันของ ไวน์ผลิตจากฟาร์มทส.	21
4 การเปลี่ยนแปลงของ Phenolic Compounds ระหว่าง การหมักไวน์แดงด้วยยีสต์ต่างสายพันธุ์	29

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4.1. คำนำ	29
4.2. วัตถุประสงค์	30
4.3. อุปกรณ์และวิธีการ	30
4.3.1. แหล่งของอุณหภูมิและยีสต์	30
4.3.2. น้ำอุณหภูมิและการสกัดเปลือกอุณหภูมิ	30
4.3.3. กระบวนการทำไวน์	31
4.3.4. การเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์	31
4.3.5. การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์	31
4.3.6. การวิเคราะห์ total phenolic content โดยเครื่อง	31
Spectrophotometer	
4.3.7. การวิเคราะห์ปริมาณ phenolic compounds โดยเครื่อง	31
capillary electrophoresis	
4.3.8. การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส	33
4.3.9. การวิเคราะห์ทางสถิติ	33
4.4. ผลการทดลองและวิจารณ์	33
4.4.1. สาร phenolic compounds ในอุณหภูมิ	33
4.4.2. การเปลี่ยนแปลงระหว่างหมักแอลกอฮอล์	34
การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์	34
การเปลี่ยนแปลงปริมาณ <i>trans-resveratrol</i>	35
การเปลี่ยนแปลงปริมาณ total phenolic contents	37
และสาร phenolic อื่นๆ	
4.4.3. การเปลี่ยนแปลงระหว่างหมักมาโลแลคติก	47
การเปลี่ยนแปลงปริมาณ <i>trans-resveratrol</i>	47
การเปลี่ยนแปลงปริมาณ total phenolic content	48
และสารกลุ่ม flavonoids	
การเปลี่ยนแปลงปริมาณ phenolic acids โมเลกุลขนาดเล็ก	52
4.4.4. การเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการบ่มไวน์	52

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
	การเปลี่ยนแปลง total phenolic content, 52
	<i>trans-resveratrol</i> และ flavonoids
	การเปลี่ยนแปลงปริมาณ phenolic acids โมเลกุลขนาดเล็ก 57
4.4.5	คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไวน์ 57
	คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไวน์ Exotic 57
	คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไวน์ Shiraz 59
4.5	สรุปผลการทดลอง 60
	เอกสารอ้างอิง 61
5	การดูดซึมและอิทธิพลของ เรสเวอราทรอลและผลิตภัณฑ์ 65
	องุ่นแดงต่อโครงสร้างจุลภาคเซลล์ตับหนู 65
5.1.	คำนำ 65
5.2	วัตถุประสงค์ 66
5.3	อุปกรณ์และวิธีการ 67
5.3.1	สารเคมีและเครื่องมือ 67
5.3.2	องุ่น น้ำองุ่น ไวน์แดง และ สารสกัดจากองุ่นแดง 67
5.3.3	หนูเมาส์ 67
5.3.4	การวัดปริมาณ Total phenolic compounds (TPCs) <i>in vitro</i> 68
5.3.5	Absorption ของ Total phenolic compounds และ 68
	<i>trans-resveratrol in vivo</i>
5.3.6	Effect ของ resveratrol และ grape products ต่อ 68
	ultrastructure ของ liver cells
5.3.7	การวิเคราะห์ทางสถิติ 69
5.4	ผลการทดลองและวิจารณ์ 69
5.4.1	Absorption ของ Total phenolic compounds 69
5.4.2	Absorption ของ <i>trans-resveratrol in vivo</i> 71
5.4.3	Effect ของ resveratrol และ grape products ต่อ 74
	ultrastructure ของเซลล์ตับ
5.5	สรุปผลการทดลอง 79

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
เอกสารอ้างอิง	81
6 อิทธิพลผลิตผลอุณหภูมิสูงต่อความเป็นพิษและการเพิ่มจำนวนของเซลล์	89
6.1 คำนำ	89
6.2 วัตถุประสงค์	89
6.3 อุปกรณ์และวิธีการ	90
6.3.1 สารเคมีและเครื่องมือ	90
6.3.2 การเตรียมสารสกัดหยาบจากอุณหภูมิสูงและไวน์	90
6.3.3 การเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์	90
6.3.4 ความเป็นพิษ (cytotoxicity) โดย Brine shrimp lethal assay (BSLA)	90
6.3.5 การวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell proliferation)	91
โดย MTT assay	
6.3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ	92
6.4 ผลการทดลองและวิจารณ์	92
6.4.1 Cytotoxic effect	92
6.4.2 Cell proliferation effect	94
6.5 สรุปผลการทดลอง	99
เอกสารอ้างอิง	100
7 อิทธิพลของผลิตผลจากอุณหภูมิสูงต่อโปรแกรมการตายของเซลล์ไมโทโกลมา	103
7.1 คำนำ	103
7.2 วัตถุประสงค์	105
7.3 อุปกรณ์และวิธีการ	105
7.3.1 สารเคมีและเครื่องมือ	105
7.3.2 การเลี้ยงเซลล์	105
7.3.3 Apoptotic cell morphology	105
7.3.4 DNA fragmentation	106
7.3.5 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ Western blotting	106
7.3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ	107
7.4 ผลการทดลองและวิจารณ์	107

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
7.4.1 Apoptotic cell morphology	107
7.4.2 DNA fragmentation	114
7.4.3 Expression ของ apoptotic proteins: p53, Bcl-2, caspase-8, และ Caspase-3	115
7.5 สรุปผลการทดลอง	121
เอกสารอ้างอิง	123
8 สรุปผลการทดลอง	129
8.1 สารประกอบฟีนอลิกและคุณสมบัติด้านออกซิเดชันของ ไวน์จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี	129
8.2 การเปลี่ยนแปลงของ Phenolic Compounds ระหว่าง การหมักไวน์แดงด้วยยีสต์ต่างสายพันธุ์	129
8.3 การดูดซึมและอิทธิพลของ เรสเวอราทรอล และผลิตภัณฑ์งุ่นแดง ต่อโครงสร้างจุลภาคเซลล์ตับหนู	130
8.4 อิทธิพลผลิตภัณฑ์งุ่นแดงต่อความเป็นพิษและการเพิ่มจำนวนของเซลล์	132
8.5 อิทธิพลของผลิตภัณฑ์งุ่นแดงต่อ โปรแกรมการตายของเซลล์ไมโทโลมา	132
ประวัติผู้วิจัย	135

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 Principal phenolic compounds in grapes and wines	11
4.1 Phenolic composition of juice and skin in grape berries	35
4.2 The TPC and monomeric flavonoid content (mg/l) of wine without	49
added <i>trans</i> - resveratrol before and after MLF	
4.3 The TPC and monomeric flavonoid content (mg/l) of wine with	50
added 5 ppm <i>trans</i> -resveratrol before and after MLF	
4.4 The TPC and monomeric flavonoid content (mg/l) of wine with	51
added 10 ppm <i>trans</i> -resveratrol before and after MLF	
4.5 Phenolic acid content (mg/l) of wine without added	53
<i>trans</i> -resveratrol before and after MLF	
4.6 Phenolic acid content (mg/l) of wine with added	54
5 ppm <i>trans</i> -resveratrol before and after MLF	
4.7 Phenolic acid content (mg/l) of wine with added	55
10 ppm <i>trans</i> -resveratrol before and after MLF	
4.8 The concentration of <i>t</i> -resveratrol before and after	56
MLF of wine with and without added <i>trans</i> -resveratrol	
4.9 The phenolic acid (mg/l) of wine during ageing	58
4.10 Sensory characteristics of Exotic and Shiraz wines evaluated by QDA method	59
5.1 The results of <i>in vivo</i> resveratrol absorption in plasma from	74
the mice after oral administration of 20 mg/l resveratrol and	
resveratrol-spiced wine as the designated time of treatments	
5.2 Ultrastructural changes in mouse liver cells after administration	77
of grape products, resveratrol and vehicles of ethanol and	
DMSO (dimethyl sulphonyloxide) during 2, 4, and 6 months	
6.1 The cytotoxic effects of grape pomace extract, grape wine and	93
resveratrol. The mortality (%) of <i>Atremia salina</i> was abotained by BSLA	

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
6.2 The comparison of LC_{50} values of cytotoxicity of among grape pomace extract, grape wine and resveratrol on brine shrimp at 6, 12 and 24 hours ($p < 0.05$)	94
6.3 The toxic effects of grape pomace extract, grape wine, and resveratrol on cell proliferation activities of a mouse myeloma cell line by MTT assay	95
6.4 The efficacy of grape pomace extract, grape wine, and resveratrol on antiproliferation of myeloma cells was compared at the concentration at 100 ug/ml and 200 ug/ml	97
6.5 The comparison of IC_{50} values of anti-proliferation of myeloma cells by grape pomace extract, grape wine and resveratrol at 6, 12 and 24 hours ($p < 0.05$)	97
7.1 The induction of myeloma cell apoptosis by grape pomace extract, grape wine and resveratrol at various concentration and duration of incubation. The numbers of apoptotic cells were detected and quantified by Hoechst 33258 staining after treatments	111
7.2 The LC_{50} values at different periods of treatments of the apoptotic effects of grape pomace extract, grape wine and resveratrol on mouse myeloma cells at designated duration	113

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 Structure of resveratrol and its glucoside.	8
2.2 Shikimic pathway.	12
2.3 Flavan-3-ols and flavonols synthesis.	12
2.4 Structure of viniferin.	12
2.5 Schematic representation of the effects of alcohol and phenolic compound on risk factors for CHD.	15
4.1 Alcoholic content of Exotic (a) and Shiraz (b) wine during Alcoholic fermentation.	36
4.2 Changes of <i>t</i> -resveratrol during alcoholic fermentation of Exotic wine.	37
4.3 Changes of TPC during alcoholic fermentation of Exotic wine.	38
4.4 Changes of epicatechin during alcoholic fermentation of Exotic wine.	40
4.5 Changes of catechin during alcoholic fermentation of Exotic wine.	41
4.6 Changes of quercetin during alcoholic fermentation of Exotic wine.	4.3
4.7 Changes of syringic acid during alcoholic fermentation of Exotic wine.	44
4.8 Changes of gallic acid during alcoholic fermentation of Exotic wine.	45
4.9 Changes of cinnamic acid during alcoholic fermentation of Exotic wine.	46
4.10 Changes of <i>p</i> -coumaric acid during alcoholic fermentation of Exotic wine.	47
5.1 Total phenolic content (TPC) in <i>V. vinifera</i> products, juice, pomace extract and wine, expressed as mg/l GAE. Each sample was measured in triplicates. All values are mean $\pm$ S.D. Values with differing in small alphabets are significantly different ($p \leq 0.01$).	69
5.2 Total phenolic compounds absorbed in the mouse plasma after oral administration of grape juice and pomace extract at different times. DMSO was use as the vehicle. Data represents the mean $\pm$ S.D. (n=3) and $p \leq 0.01$.	70
5.3 Electrophoregram of standard trans-resveratrol (200 mg/l) showing the retention time of resveratrol (<i>in vitro</i>) at 12 minutes analyzed by capillary electrophoresis, detection wavelength at 220 nm.	72

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
5.4 CE electrophoregram of 16 mg/l resveratrol-spiked plasma (<i>ex vivo</i>) showing the separation of resveratrol at the retention time, 12 minutes, detection wavelength at 220 nm.	72
5.5 CE electrophoregram showing the separation of resveratrol detection of plasma samples. A, plasma sample as a control. B, resveratrol-spiked plasma (<i>ex vivo</i>). C, 20 mg/l-resveratrol spiked wine plasma (<i>in vivo</i>). Detection at 220 nm.	73
5.6 Transmission electron micrographs of liver cells of ICR mouse normal control at 2 and 6 months (A, B) and 6-month oral administration of 10% DMSO (C) and 12% ethanol (D). Lys = lysosome, M = mitochondrion, N = nucleus, GER = granular endoplasmic reticulum, AER = agranular endoplasmic reticulum, Gly = glycogen granule, V = vesicle.	75
5.7 Transmission electron micrographs of liver cells of ICR mouse at 6-month administration of 0.5 ml/day grape juice (A), 0.15 g/kg grape pomace extract (B), 0.5 ml/day wine (C), and 20 mg/kg resveratrol (D). M = mitochondrion, GER = rough endoplasmic reticulum, AER = agranular endoplasmic reticulum, Gol = Golgi complex, Gra = granule, Gly = glycogen granule, V = vesicle.	76
6.1 The two-chamber container with a perforate divider. The smaller compartment was for brine shrimp egg hatching. The larger compartment was for the nauplii, migrated toward the light.	92
6.2 Antiproliferation effects of grape pomace extract, grape wine, and resveratrol (0-1,000 μ g/ml) on mouse myeloma cell line at 6, 12, and 24 hours. Control cells were maintained in the vehicle for the indicated time periods. Data represent mean $\pm$ SD ($p < 0.05$) of three independent experiments.	96

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
7.1 Apoptotic morphology of myeloma cells induced by grape pomace extracts (GPE) and stained with Heochst 33258: 10 µg/ml-treated cells at 6 h (A, D and G); 100 µg/ml-treated cells at 12 h (B, E and H); and 1000 µg/ml-treated cells at 24 h (C, F, and I). The arrows indicated the apoptotic cells. Bar = 100 µm.	108
7.2 Apoptotic morphology of myeloma cell induced by grape wine (GWI) and stained with Heochst 33258: 10 µg/ml-treated cells at 6 h (A, D and G); 100 µg/ml-treated cells at 12 h (B, E and H); and 1000 µg/ml-treated cells at 24 h (C, F, and I). The arrows indicated the apoptotic cells. Bar = 100 µm.	109
7.3 Apoptotic morphology of myeloma cell induced by 100 ug/ml resveratrol (RES) as positive control, stained with Heochst 33258 for 6 hr, (B), 12 hr (C) and 24 hr (D). Panel A was untreated myeloma cells as control. The arrows indicated the apoptotic cells. Bar = 100 µm.	110
7.4 Comparision of mouse myeloma apoptosis induced by grape pomace extract (dash bars), grape wine (opened bars) and resveratrol (filled bars) at 10-1000 ug/ml and 6, 12 and 24 hours. (mean ± SD, n = 3, p < 0.05).	112
7.5 DNA fragmentation of myeloma cell line (P3X63, Ag8.653) induced by grape pomace extract (GPE) at various concentrations and incubation times on 1.5% agarose gel. Panels: A, 6 h; B, 12 h and C, 24 h. Lane 1, marker; lane 2, untreated cells; lane 3, resveratrol; lane 4, 10 ug/ml; lane 5, 50 ug/ml; lane 6, 100 ug/ml; lane 7, 200 ug/ml GPE; lane 8, 500 ug/ml; and lane 9, 1000 ug/ml.	116
7.6 DNA fragmentation of myeloma cell line (P3X63, Ag8.653) induced by grape wine (GWI) at various concentrations and incubation times on 1.5% agarose gel. Panels: A, 6 h; B, 12 h and C, 24 h. Lane 1, marker; lane 2, untreated cells; lane 3, resveratrol; lane 4, 10 ug/ml; lane 5, 50 ug/ml;	117

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
lane 6, 100 ug/ml; lane 7, 200 ug/ml GWI; lane 8, 500 ug/ml; and lane 9, 1000 ug/ml.	
7.7 Western blot analysis for apoptotic proteins in myeloma cells induced by 10 ug/ml resveratrol (RES), grape wine (GWE) and grape pomace extract (GPE) at 0-24 h of incubations. The protein lysates were separated on 12% SDS-PAGE and the electrotransferred blots were detected by specific antibody probes and developed by HRP- TMB (Tetramethylbenzidine).	118
7.8 Western blot analysis for apoptotic proteins in myeloma cells induced by 100 ug/ml resveratrol (RES), grape wine (GWE) and grape pomace extract (GPE) at 0-24 h of incubations. The protein lysates were eparated on 12% SDS-PAGE and the electrotransferred blots were detected by specific antibody probes and developed by HRP- TMB (Tetramethylbenzidine).	119
7.9 Western blot analysis for apoptotic proteins in myeloma cells induced by 1000 ug/ml resveratrol (RES), grape wine (GWE) and grape pomace extract (GPE) at 0-24 h of incubations. The protein lysates were separated on 12% SDS-PAGE and the electrotransferred blots were detected by specific antibody probes and developed by HRP- TMB (Tetramethylbenzidine).	120

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

บทบาทของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ นอกจากจะใช้ในการดื่มเพื่อสังคม และช่วยเพื่อเจริญอาหาร แล้ว จัดได้ว่าแอลกอฮอล์มี 2 บทบาท คือ ทำให้เสพติด และมีผลเป็นพิษต่อตับ (regularly-imbibed hepato-toxin) สำหรับผู้ที่ดื่มอย่างหนัก ในมุมที่ดีถ้ามีการดื่มอย่างระวังและพอประมาณ แอลกอฮอล์ จะช่วยลดโอกาสเป็นโรคเส้นโลหิตตีบตัน (atherosclerosis) และโรคหัวใจ (coronary heart disease, CHD) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการตายของคนวัยกลางคน และผู้สูงอายุทั้ง 2 เพศ จากผลการศึกษา ของ Klatsky et al. (1992) ได้แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างการดื่มแอลกอฮอล์และโอกาสเป็นโรค CHD โดยผู้ที่ไม่ดื่มเลยและผู้ที่ดื่มอย่างหนักมีโอกาสตายด้วย CHD สูงที่สุด ผู้ที่ดื่ม 6 แก้วต่อวัน หรือมากกว่า มีโอกาสตาย 60% ขณะที่ผู้ที่ดื่มเพียง 1-2 แก้วต่อวันมีโอกาสตายเพียง 70% ของผู้ที่ไม่ดื่มเลย ทั้งนี้เป็นที่เชื่อกันว่าเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มี cardioprotective effects โดยการเพิ่มปริมาณ high-density lipoprotein (HDL) และแอลกอฮอล์สามารถป้องกันการรวมกันเป็นตะกอนของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) และเพิ่ม fibrinolysis และ Karlsen et al. (2007) รายงานว่าการดื่มเหล้าไวน์วันแก้ว (150 ml, 15 g alcohol) ไม่ทำให้มีผลต่อ biomarker ของ antioxidant status, oxidative stress และ inflammation ในร่างกายของคนที่มีสุขภาพดีแต่อย่างใด

ในปี 1979 St. Leger และคณะ (St Leger et al. 1979) ได้รายงานผลการสำรวจผลการดื่มไวน์กับการเป็นโรค CHD ของประชากรในประเทศที่พัฒนาแล้ว 18 ประเทศ และพบว่า ประชากรประเทศฝรั่งเศสมีโอกาสเป็นโรค CHD ต่ำที่สุด ทำให้มีการกล่าวถึงคำว่า French Paradox ซึ่งหมายถึงชาวฝรั่งเศสมีการบริโภคอาหารไขมันสูงแต่มีโอกาสเสี่ยงการเป็น CHD เพียง 42% ของคนอเมริกัน ทั้งนี้ เพราะนอกจากแอลกอฮอล์แล้วไวน์ยังมีองค์ประกอบอื่น ๆ ที่มีประโยชน์ในเชิงสุขภาพ ซึ่งองค์ประกอบเหล่านั้น คือ สารประกอบ polyphenols โดยเฉพาะอย่างยิ่งในไวน์แดง ซึ่งได้แก่ phenolic acids (p-coumaric, cinnamic, caffeic, gentisic, ferulic และ vanillic acids), trihydroxysilbenes (resveratrol และ polydatin) และ flavonoids (catechin, epicatechin และ quercetin) เป็นต้น สารประกอบที่มีการวิจัยมากที่สุดได้แก่ resveratrol และ quercetin ที่มีคุณสมบัติเป็น antioxidant ที่มีประสิทธิภาพมากกว่า α -tocopherol หรือ vitamin E

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxysilbene) เป็นสารประเภท phytoalexin ซึ่งเป็นสาร antibiotic ที่พืชสังเคราะห์ขึ้นเมื่อเกิดโรคเนื่องจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* (Paul et al, 1998) โดยธรรมชาติจะ

พบ resveratrol และอนุพันธ์ ในรูปของ polymer เรียกว่า viniferin พบ Resveratrol มากในองุ่น ถั่วลิสง และผลมัลเบอร์รี่ และพบในรากของวัชพืช *Polygonum cuspidatum* ซึ่งชาวจีนและญี่ปุ่นได้สกัดใช้เป็นยาแผนโบราณ เรียกว่า Ko-jo-kon ในกระบวนการหมักไวน์ glucosides ของ resveratrol จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูป resveratrol (free isomer) ที่มีความเสถียรมากในแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ ไม่นานมานี้ Ragab et al. (2006) รายงานว่า พบ resveratrol ในผิวมะเขือเทศปริมาณสูงถึง 18.4 $\mu\text{g/g}$ dry weight ระหว่าง 4 สัปดาห์ของการแก่จัดเต็มที่ แต่ไม่พบในเนื้อมะเขือเทศเลย และ Counet et al. (2006) รายงานการพบ ทั้ง *trans*-resveratrol และ *trans*-piceid ในเครื่องดื่ม chocolate และ cocoa

ผลการทดลองโดยใช้ สารสังเคราะห์ พบว่า resveratrol มีประสิทธิภาพเป็น antioxidant โดยทำหน้าที่เป็น metal chelator (Fremont et al., 1999; Sánchez-Moreno et al., 1999) ป้องกัน lipid autoxidation และสามารถยับยั้ง oxidation ของ low-density lipoprotein (LDL) resveratrol สามารถลดโอกาสการเกิดโรคหัวใจและยับยั้งการรวมตัวตกตะกอนของเกล็ดเลือดได้ (Pace-Asciak et al., 1995; Pace-Asciak et al., 1996) และมีผลงานวิจัยที่แสดงว่า resveratrol สามารถป้องกันการเกิดโรคมะเร็งได้โดยลดการอักเสบและการเกิดเนื้องอกของเซลล์สัตว์ทดลอง (Jang et al., 1997; Carbo' et al., 1999) และสามารถป้องกันการเกิดโรคเนื่องจากการเสื่อมสภาพของเส้นประสาท อันได้แก่โรค Alzheimer's และ Parkinson's โดยการกระตุ้นการสร้างปลายของเซลล์ประสาทขึ้นใหม่ได้ (Salafia, 1999) นอกจากนี้ องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้รายงานว่า resveratrol ใน wine สามารถลดโอกาสเสี่ยงการเป็นโรคหัวใจถึง 40% ถ้ามีการใช้อย่างถูกต้อง (www.resveratrol.com)

ปริมาณของ resveratrol และ phenolic compounds อื่น ๆ ในองุ่นและไวน์ แต่ละชนิดแตกต่างกันเนื่องจากสายพันธุ์องุ่น สภาพาสังแวดล้อมและการจัดการในการปลูก อาทิ ภูมิประเทศและสภาพอากาศ และกล่าวว่าการจัดการ เช่นการใช้เชื้อยีสต์ต่างสายพันธุ์ สำหรับการผลิตไวน์จะทำให้มีปริมาณต่างกัน และปริมาณของสารประกอบเหล่านี้จะต่างกันในแต่ละขั้นตอนในการผลิตไวน์เช่นกัน ผลการวิจัยของโครงการนี้จะทำให้รู้ว่าสายพันธุ์องุ่นสายพันธุ์ใดที่ปลูกในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีมี resveratrol และ phenolic compounds มากและเหมาะสมในการผลิตไวน์ที่มีผลในเชิงเป็นอาหารสุขภาพ (health food) ในประเทศ และทำให้รู้ว่าสายพันธุ์ยีสต์มีผลต่อคุณภาพของไวน์ในเชิงของปริมาณ resveratrol และ phenolic compounds อย่างไร นอกจากนี้ ฤทธิ์ของสารประกอบที่มีประโยชน์ต่อร่างกายจะได้ผลดีก็ต่อเมื่อสารประกอบนั้น ๆ มีการดูดซึมได้ดีในร่างกาย ซึ่งจะต้องทำการศึกษาทดลองกับสัตว์ทดลองและกลุ่มผู้บริโภคที่เหมาะสม สารประกอบกลุ่ม resveratrol และ phenolic compounds ในองุ่นและไวน์ มีผลดีในเชิงโภชนาการ และสุขภาพต่อผู้บริโภค การทดลองนี้จะทำให้รู้ผลของสารประกอบเหล่านี้ในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคเส้นเลือดหัวใจตีบ และการยับยั้งการเกิดเนื้องอกของเซลล์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทดลองวิจัยคุณภาพเชิงการเป็น antioxidant และคุณภาพเชิงสุขภาพการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถต้านหรือยับยั้งการเกิดเนื้องอกและมะเร็งในระดับ cell และ molecule ของผลผลิตจากองุ่นและไวน์ โดยเฉพาะที่ผลิตได้ ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และศึกษาองค์ประกอบสารกลุ่ม polyphenols ในไวน์แดงจากองุ่นบางสายพันธุ์ที่ผลิตจากฟาร์มมหาวิทยาลัย และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศในช่วงเวลาที่กำลังศึกษาวิจัย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อให้ทราบคุณภาพและปริมาณสารประกอบ *trans-resveratrol* และ phenolic compounds อื่นๆ ขององุ่นและไวน์ที่ปลูกและผลิตในประเทศไทย โดยเน้นสายพันธุ์ที่ปลูกได้ในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- 1.2.2 เพื่อให้ทราบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารประกอบเหล่านี้ที่เกิดขึ้นเนื่องจากกระบวนการผลิตไวน์
- 1.2.3 เพื่อวิเคราะห์การดูดซึม การออกฤทธิ์และผลด้าน oxidation และด้านการเจริญของเซลล์มะเร็งของ total phenolics ของน้ำองุ่น (juice), กากหมักองุ่น (pomace) ไวน์ (wine) และ *trans-resveratrol* ที่มีต่อสุขภาพของเลือด ตับ และการป้องกันการเกิดเนื้องอก/มะเร็ง โดยใช้ผลิตผลองุ่นแดงบางสายพันธุ์จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้ครอบคลุมถึง

- 1.3.1 การสำรวจปริมาณ total phenolic compounds และ *trans-resveratrol* ขององุ่นสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีการปลูกในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี การศึกษาคุณภาพและปริมาณสาร *trans-resveratrol* ของไวน์ตลอดกระบวนการผลิตด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ และขณะการบ่มไวน์
- 1.3.2 ศึกษาการดูดซึม *trans-resveratrol* ของสัตว์ทดลองโดยใช้ commercial *trans-resveratrol* และศึกษาผลของ น้ำองุ่น สารสกัดจากกากองุ่น สายพันธุ์ที่ปลูกในฟาร์มของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ต่อ oxidative stress ในเซลล์สัตว์ และการเจริญหรือการตายของเซลล์ เพื่อตอบปัญหา bio-availability และยืนยันคุณสมบัติในระดับเซลล์และโมเลกุลเกี่ยวกับผลด้านการป้องกันการเกิดเนื้องอก/มะเร็งในผู้บริโภค

1.4. วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

งานวิจัยนี้จะดำเนินงานที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เนื่องจากที่นี่มีโครงการวิจัยองุ่นและไวน์ มหาวิทยาลัยฯ มีไร่องุ่นประมาณ 15 ไร่ มีองุ่นพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ทำน้ำองุ่น ไวน์แดงและไวน์ขาวมากกว่า 30 พันธุ์ มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการปลูก ปรับปรุงพันธุ์องุ่น และการผลิตไวน์จากองุ่นพันธุ์ต่าง ๆ อยู่แล้ว

ระเบียบวิธีวิจัยโดยย่อประกอบด้วย

- 1.4.1 ดำรงและวิเคราะห์ปริมาณ total phenolic compounds และ *trans-resveratrol* ของไวน์องุ่นพันธุ์ต่าง ๆ ที่ปลูกได้ในฟาร์มของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ด้วยวิธีทาง spectrophotometry และ chromatography
- 1.4.2 ผลิตไวน์จากองุ่นแดงสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับผลิตไวน์ โดยใช้เชื้อยีสต์ 2-3 สายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไวน์ และทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณ *trans-resveratrol* ในกระบวนการหมักไวน์
- 1.4.3 วิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณ *trans-resveratrol* และ total phenolic compounds ในไวน์แต่ละสายพันธุ์ที่ผลิตได้ และวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี กายภาพ และทางประสาทสัมผัสของไวน์ที่ได้จากแต่ละสายพันธุ์
- 1.4.4 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณ *trans-resveratrol* และ total phenolic compounds ของไวน์ระหว่างการบ่มนานประมาณ 3-6 เดือน
- 1.4.5 วิเคราะห์หาปริมาณการดูดซึมของ total phenolics และ resveratrol ในสัตว์ทดลองต้นแบบเมื่อเลี้ยงด้วยน้ำองุ่น (juice) และ สารสกัดจากกากองุ่น (grape pomace extract - GPE) เป็นเวลาประมาณ 1-2 เดือน
- 1.4.6 วิเคราะห์เปรียบเทียบอิทธิพลของ น้ำองุ่น และ สารสกัดจากกากองุ่น 1 สายพันธุ์ ที่มีต่อ oxidative stress ในเซลล์สัตว์ การเจริญ หรือการตายของเซลล์มะเร็ง วิเคราะห์โปรตีน และ ปัจจัยต่อการตายของเซลล์ (apoptotic factors)

1.5 ประโยชน์ของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 ได้ทราบถึงคุณภาพขององุ่นสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ปลูกในประเทศ โดยเน้นสายพันธุ์ที่ปลูกในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และคุณภาพของไวน์ในเชิง nutraceutical และ functional foods

- 1.5.2 ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เพื่อส่งเสริมให้ประชาชนไทยหันมาบริโภคไวน์ไทยอย่างแพร่หลาย เพื่อสุขภาพที่ดีของประชากรทั้งประเทศโดยรวมแทนการบริโภคสารแอลกอฮอล์ประเภทอื่น ซึ่งให้โทษต่อสุขภาพ แล้วยังเป็นการประหยัดและ/หรือลดงบประมาณค่าใช้จ่ายด้านสาธารณสุขของประเทศ
- 1.5.3 ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เพื่อสนับสนุนและส่งเสริมการเพาะปลูกองุ่นและอุตสาหกรรมผลิตไวน์ของประเทศเพื่อลดการนำเข้าไวน์ต่างประเทศเพื่อเศรษฐกิจของประเทศ และส่งเสริมการบริโภคของกลุ่มผู้สนใจดื่มไวน์องุ่นและไวน์ และใช้สารธรรมชาติอื่น ๆ เพื่อสุขภาพ
- 1.5.4 ผลิตภัณฑ์ระดับปริญญาโทหรือเอกได้ 3 คน ให้กับมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และได้ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติได้น้อย 2 เรื่อง

เอกสารอ้างอิง

- Carbó, N., Costelli, P., Baccino, F.M., López-Soriano, F.J., and Argilés, J.M. (1999). Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumour growth in a rat tumour model. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 254:739-743.
- Counet, C., Callemien, D., and Collin, S. (2006). Chocolate and cocoa: New sources of *trans*-resveratrol and *trans*-piceid. *Food Chem.* 98:649-657.
- Fremont, L., Belguendouz, L., and Delpal, S. (1999). Antioxidant activity of resveratrol and alcohol free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sci.* 64:2511-2521.
- Jang, M. Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.U., Thomas, C.F., Beecher, C.W.W., Fong, H.H.S., Farnsworth, N.R. Kinghorn, A.D., Mehta, R.G, Moon, R.C., and Pezzuto, J.M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.* 275:218-220.
- Karlsen, A., Retterstøl, L., Laake, P., Kjølrsrud-Bøhn, S., Sandvik, L., and Bomhoff, R. (2007). Effects of a daily intake of one glass of red wine on biomarkers of antioxidant status, oxidative stress and inflammation in healthy adults. *E-SPEN, European e-J of Clin. Nutr. Metabol.* 2:e127-e133.
- Klatsky, A.L., Armstrong, M.A., and Friedman, G.D. (1992). Alcohol and mortality. *Ann. Intern. Med.* 117:646-654.
- Pace-Asciak, C.R., Hahn, S. Diamandi, E.P., Soleas, G., and Goldberg. D. M. (1995). The red wine phenolics *trans*-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid

- synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta.* 235:207-219.
- Pace-Asciak, C.R., Rounova, O., Hahn, S.E., Diamandis, E.P., and Goldberg, D.M. (1996). Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects, *Clin. Chim. Acta.* 246:163-182.
- Paul, B., Chereyathmanjiyil, A., Masih, I., Chapuis, L., and Benoit, A. (1998). Biological control of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grapevine and elicitation of stilbene phytoalexin (resveratrol) by a soil bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* 165:65-70.
- Ragab, A.S., Van Fleet, J., Jankowski, B., Park, J.-H., and Bobzin, S.C. (2006). Detection and quantitation of resveratrol in tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J. Agri. Food Chem.* 54:7175-7179.
- Salafia, S.J. (1999). Why wine is good for your brain. *New Scientist Planet Sci.* [online]. Available: www.newscientist.com/ns/990109/newsstory8.html.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., and Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grapes and related polyphenolic constituents. *Food Res. Int.* 32:407-412.
- St. Leger, A.S., Cochrane, A.L., and Moore, F. (1979). Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet.* 1: 1017-1020.
- www.resveratrol.com Resveratrol may act as an anti-cancer agent. [online]. Available: www.resveratrol.com/resver.html.

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คำนำ

องุ่นเป็นผลไม้ที่มีสารประกอบ polyphenols ปริมาณสูงมาก ชนิดที่สำคัญได้แก่ phenolic acids, flavonoids, anthacyanins และ proanthocyanidins ปัจจุบันได้มีความสนใจต่อสารประกอบ phenolic compounds นี้เป็นอย่างมาก เนื่องจากสารประเภทนี้มีประโยชน์ต่อสุขภาพเป็นอย่างยิ่ง อันได้แก่มีประสิทธิภาพเป็น antioxidant ที่ทำปฏิกิริยาเป็น free radical scavengers และยับยั้งการเกิด oxidation ของ lipoprotein ได้ โดยเฉพาะยับยั้งการเกิด oxidation ของ low-density lipoprotein (LDL) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคหัวใจได้ Lu and Foo (1999) ได้ศึกษาจำแนกสารประกอบ polyphenols ในกากเศษเหลือจากการหมักขององุ่นสายพันธุ์ Chardonnay ด้วย NMR spectroscopy พบสาร polyphenols ทั้งหมด 17 ชนิด นอกจากกลุ่มของ phenolic compounds ที่กล่าวมาแล้ว ยังมีสาร phenolic ประเภท stilbene ในองุ่นและไวน์ (Siemann and Creasy, 1992; Romero-Pérez et al., 1999)

Stilbenes ที่มีการศึกษากันมากได้แก่ resveratrol ที่พบว่าองุ่นและไวน์ในแต่ละท้องถิ่นมีปริมาณสารประกอบนี้แตกต่างกันมาก Celotti et al. (1996) รายงานว่าปริมาณ resveratrol ใน Italian wines มีประมาณ 0.05 - 0.8 ppm แต่ในท้องที่ต่างกัน Barbanti et al. (1995) พบว่าไวน์มี resveratrol ปริมาณ 0.64 - 3.00 ppm. Goldberg et al. (1996) พบว่าไวน์ที่ผลิตจากองุ่นสายพันธุ์ Cabernet Sauvignon และ Merlot ในท้องถิ่นที่มีภูมิอากาศแปรปรวนและความชื้นสูง มีปริมาณ resveratrol ที่แตกต่างกันมากถึง 6 เท่า แต่สายพันธุ์ Pinot Noir และ Shiraz มีปริมาณแตกต่างกันต่ำกว่า (3.5 และ 2.5 เท่า ตามลำดับ) Dourtoglou et al. (1999) รายงานว่าไวน์ขาวมีปริมาณ resveratrol ต่ำกว่าไวน์แดง และ Romero-Pérez et al. (1996) ได้ใช้ปริมาณ resveratrol และ Piceid เป็น varietal markers สำหรับไวน์ขาวที่ผลิตในสเปน กระบวนการและวัสดุที่ใช้ในการผลิตไวน์เป็นปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณ resveratrol ในไวน์ได้เช่นกัน Soleas et al. (1995) พบว่าการบ่มไวน์ในถังไม้โอ๊คและการใช้ถ่าน charcoal ทำให้สูญเสีย resveratrol ไปครึ่งหนึ่ง และการใช้ 0.75 μ m filter pad ลดปริมาณ trans-resveratrol ไปครึ่งหนึ่ง แต่ไม่สูญเสียปริมาณ cis-resveratrol ส่วนการใช้ bentonite, gelatin, silica, egg white และ diatomaceous earth ไม่มีผลทำให้สูญเสียปริมาณ resveratrol

การพบ resveratrol เป็นครั้งแรกโดย Siemann and Creasey (1992) ในไวน์และแนะนำว่าสารนี้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีววิทยา และหลังจากนั้นจึงมีผู้ศึกษาวิจัยคุณสมบัติของ resveratrol เกิดขึ้นต่อ ๆ

มา resveratrol หรือ 3,5,4'-trihydroxystilbene เป็นสารปฏิชีวนะ phytoalexin ในองุ่น ที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อต่อต้านเชื้อราองุ่น *Botrytis cinerea* ที่เจริญบนองุ่น หรือเมื่อองุ่นเกิดเป็นแผล หรือโดยการกระตุ้นด้วย UV พบ resveratrol บนผิวเท่านั้น แต่ไม่พบในเนื้อองุ่น สารตั้งต้นของ resveratrol คือ viniferin ซึ่งเป็นสาร polymers ปกติ resveratrol มีในรูป *trans* (t)- และ *cis* (c)-isomer ดังแสดงในรูปที่ 2.1 ทั้งนี้ *cis*-form เป็นผลผลิตจากการหมักไวน์ และพบในองุ่นน้อยมาก ทั้ง 2 รูปนี้อาจเกิดในรูปของสารประกอบ glucosides (มี glucose molecule) เรียกว่า piceid

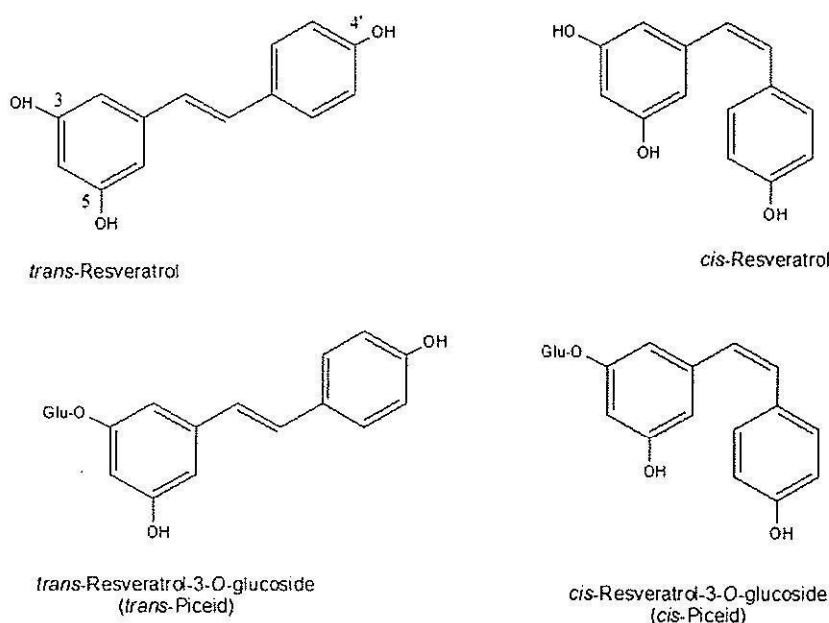


Figure 2.1 Structure of resveratrol and its glucoside

(Linus Pualing Institute's Micronutrient Information Center)

บทบาทของ phenolics, resveratrol และ quercetin ในการเป็นสาร antioxidants นั้นได้มีการศึกษาในระดับ organism แล้วจนเป็นที่ทราบดีว่าการดื่มไวน์แดงที่มีสารเหล่านี้ และการดื่มไวน์แดงในปริมาณที่เหมาะสมเป็นประจำช่วยป้องกันการเกิดโรคหัวใจล้มเหลวได้ดีกว่าไวน์ขาว แต่มีข้อมูลละเอียดและสถิติการวิจัยด้านชีวเคมี ชีวการแพทย์ และเซลล์วิทยาบางประการสนับสนุนอย่างจริงจังที่ยังได้แย้งกันอยู่ สำหรับคุณภาพและปริมาณสารประกอบ polyphenols ในองุ่นและไวน์ในประเทศไทยนั้น ไม่พบว่ามีผู้ทำการศึกษามาก่อน กลุ่มผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาประสิทธิภาพเชิงคุณภาพและเชิงชีววิทยาบางประการของผลผลิตองุ่นที่ผลิตได้ในฟาร์มของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับการสนับสนุนการผลิตของฟาร์มและการบริโภคของผู้บริโภค

2.2 องค์ประกอบเคมีขององุ่นและไวน์

ไวน์มีสารประกอบมากกว่า 500 ชนิดที่มาจากองุ่นและได้จาก metabolic by-products ระหว่างการหมัก (Soleas et al, 1997a) องค์ประกอบส่วนมากมีปริมาณน้อย แต่บางชนิดอาจมีสูงถึง 100 mg/l องค์ประกอบหลักของไวน์คือ ethanol alcohol ที่มีระหว่าง 10 – 14 % ซึ่งสำคัญต่อการเถียร การบ่ม และคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไวน์ นอกจากนี้ยังเป็นสารทำลายที่สกัด pigments และ tannins ในจากผิวและเมล็ดองุ่นระหว่างการหมัก (Van de Wiel, van de Golde, and Hart, 2001)

2.2.1 Acids

กรดอินทรีย์เป็นสารที่ให้รสเปรี้ยวกับองุ่นและไวน์ กรดอินทรีย์ประมาณครึ่งหนึ่งเป็น malic acid ที่ให้ความเป็นกรดในองุ่นและไวน์ ปริมาณกรดจะลดลงเมื่อองุ่นแก่เต็มที่ โดยเฉพาะในช่วงที่มีอากาศร้อน ภายใต้สภาวะอากาศเย็นปริมาณกรดนี้จะคงที่และทำให้ไวน์ที่ได้มีรสเปรี้ยวมาก จึงมีการใช้ malic acid เป็นดัชนีตัดสินเพื่อกำหนดวันเก็บเกี่ยว กรดชนิดรองลงมาคือ tartaric acid ซึ่งมีปริมาณคงที่ในองุ่น และมีปริมาณเพิ่มขึ้นในไวน์จากการผลิตของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด (Jackson, 2000) กรดอีกชนิดที่เป็นผลผลิตจากการทำงานของ แบคทีเรียระหว่างการหมักแบบ malolactic fermentation กรดที่พบปริมาณน้อยในไวน์อีกชนิดหนึ่งคือ acetic acid ที่เกิดระหว่าง yeast fermentation ปริมาณ < 300 mg/l และเป็นตัวเพิ่มกลิ่นและรสชาติซับซ้อนให้กับไวน์ แต่ในปริมาณมากจะทำให้คุณภาพไวน์เสียไปและมีกลิ่นรสที่ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (Jackson, 2000)

2.2.2 Sugars

น้ำตาล glucose และ fructose เป็นน้ำตาลหลักในองุ่นและไวน์ ปริมาณน้ำตาลมีมากขึ้นกับสายพันธุ์ พันธุ์ ความแก่อ่อน และสุขภาพขององุ่น เมื่อแก่จัดเต็มที่ องุ่น *Vitis vinifera* มีน้ำตาลสูงถึง 20% หรือมากกว่าในไวน์ที่มีปริมาณ alcohol สูง (dry wine) มีน้ำตาลที่ไม่ถูกหมักปริมาณเล็กน้อย ซึ่งส่วนมากเป็นน้ำตาล pentose อาทิ arabinose, hamnose, mannose และ xylose และมี น้ำตาล glucose และ fructose ประมาณ 1 - 2 g/l (Jackson, 2000)

2.2.3 Phenolic compounds and related polyphenols

Phenolic หรือ polyphenol หมายถึงสารประกอบเคมีที่มีโครงสร้างหลักเป็น aromatic ring และมีหมู่ hydroxyl (-OH) หนึ่งหมู่ หรือมากกว่า และรวมทั้งสารอนุพันธ์ที่เกี่ยวข้อง อาทิ esters, methyl esters, glycosides และอื่น ๆ (Harborne, 1989) ปริมาณ phenolic compound ทั้งหมด (total phenolic content, TPC) ในองุ่นแต่ละส่วน และในไวน์มีความแตกต่างกันไป Waterhouse and Teissedre (1997) รายงานปริมาณ TPC ในไวน์ผลิตที่ California มีประมาณ 1850 - 2200 mg/l สำหรับไวน์แดง และ 220

- 250 mg/l สำหรับไวน์ขาว การผลิตไวน์ขาวหมักจากน้ำองุ่น (free-run juices) ที่กรองกากออกทำให้มีปริมาณ resveratrol และ phenolic compound อื่น ๆ ต่ำกว่าไวน์แดง ประเภทของ phenolic compounds ในไวน์แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ flavonoids และ non-flavonoids ไวน์แดงมีสาร flavonoid ทั้งหมด 1 - 3 g/l และไวน์ขาวมีประมาณ 0.2 g/l เท่านั้น นอกจากนี้สารกลุ่ม non-flavonoid มีประมาณ 0.2 - 0.4 g/l (Waterhouse, 1995) โครงสร้างของสาร phenolic compounds ชนิดต่าง ๆ ดังแสดงใน Table 2.1

Flavonoids มีในผิวและเมล็ดขององุ่น พบบ้างเล็กน้อยในกิ่งและลำต้น (Jackson, 2000) ชนิดที่พบมากในไวน์ได้แก่ กลุ่ม flavan-3-ols (catechin, epicatechin, tannins), flavonols (quercetin, kaempferol, myricetin) และ anthocyanins (cyanin) ในรูปอิสระ หรือสารประกอบกับน้ำตาลในรูป glycosides การสังเคราะห์สาร phenolic เกิดขึ้นโดยผ่าน shikimic acid pathway (Figure 2.2) ได้ cinnamic acid และ coumaric acid และรวมกับ acetyl CoA ที่ได้จาก Krebs cycle เกิดเป็นโครงสร้างวงแหวน flavan-3-ols และ flavonols (Figure 2.3) ทั้งนี้ anthocyanins เป็นชนิดที่มากที่สุดองุ่น (Yi, Meyer and Frankel, 1997)

สารกลุ่ม flavan-3-ol ที่พบมากองุ่นและไวน์ คือ catechin และ epicatechin มีมากในเมล็ดและก้านและอาจพบบ้างในองุ่นอ่อน (ETS laboratories, 2006) ในไวน์ขาวมีประมาณ 10 – 50 mg/l และอาจมีสูงถึง 200 mg/l ในไวน์แดง (Singleton and Esau, 1969) ซึ่งอาจมีอยู่ในรูป dimeric หรือ polymeric forms (proanthocyanins) หรือรวมตัวกันเป็น condensed tannins (Fugelsang et al., 1995)

กลุ่ม flavonols มีในผิวขององุ่นในรูป glycosidic forms ซึ่งน้ำตาลเป็น glucose สารประกอบสำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ kaempferol, quercetin และ myricetin ทั้งนี้ quercetin ช่วยป้องกันการเสียหายจากแสง UV บนผิวองุ่น (Price et al., 1995) กลุ่ม anthocyanins เป็นกลุ่มที่ให้สีแดง ชนิดที่พบในองุ่นแดงได้แก่ malvidin-, delphinidin-, peonidin-, cyaniding- และ petunidin-3-D-glucoside โดยมี malvidin เป็นชนิดที่พบมากในองุ่นพันธุ์ *V. vinifera*

Non-flavonoids สารประกอบในไวน์กลุ่มนี้เป็น phenol ที่มีวงแหวน 1 วง เป็นอนุพันธ์จาก hydroxycinnamic acid และ hydroxybenzoic acid สารกลุ่มนี้อาจเกิดจากการ esterification กับน้ำตาล หรือ alcohol สารในกลุ่มนี้อีกประเภทหนึ่งที่พบในองุ่นคือ stilbenes และ stilbene glycosides

Stilbenes เป็นสารกลุ่มอนุพันธ์ ethylene มี 2 phenol rings วงแหวน A มีหมู่ hydroxyl 2 หมู่ที่ *m*-position ขณะที่วงแหวน B อาจมีหมู่ hydroxyl และ methoxy แทนที่ที่ *o*-, *m*- และ *p*-position โดยมี *trans*-resveratrol ที่เป็นตัวแทนที่รู้จักกันมาก (Zoecklein et al., 1995) อาจพบในรูป dimer, trimer และ polymeric stilbenes หรือ ที่เรียกว่า viniferin (polydatin) ดังรูปที่ 2.4 (Gorham, 1980)

Table 2.1 Principal phenolic compounds in grapes and wines^a

General type	General structure	Examples	Major source ^b
Flavonoids			
Flavan-3-ol		R=H,Y=Y1,R'=H: Epicatechin	G
		R=H,Y=Y2,R'=H: Catechin	G
Flavonols		R=OH,R'=H : Quercetin	G
		R=R'=H : Kaempferol	G
		R=R'=OH : Myricetin	G
Anthocyanins		R=R'=OCH ₃ : Malvidin	G
		R=R'=OH : Delphinidin	G
		R=OCH ₃ ,R'=H : Paeonidin	G
		R=OH,R'=H : Cyanidin	G
		R=OCH ₃ ,R'=OH : Petunidin	G
Non-flavonoids			
Hydroxybenzoic acid		R=R'=H : <i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	G, O
		R=OH,R'=H : Protocatechuic acid	G, O
		R=OCH ₃ ,R'=H : Vanillic acid	O
		R=R'=OH : Gallic acid	G, O
		R=R'=OCH ₃ : Syringic acid	G
Hydroxycinnamic acid		R=R'=OH : <i>p</i> -Coumaric acid	G, O
		R=OH,R'=H : Caffeic acid	G
		R=OCH ₃ ,R'=H : Ferulic acid	G, O
		R=R'=OCH ₃ : Sinapic acid	O
Stilbene		R=R'=OH : <i>trans</i> -Resveratrol	G
		R=O-Glc,R'=OH : <i>trans</i> -Piceid	G

^a Data adapted from Amarine and Ough (1980)^b G = Grape, O = Oak

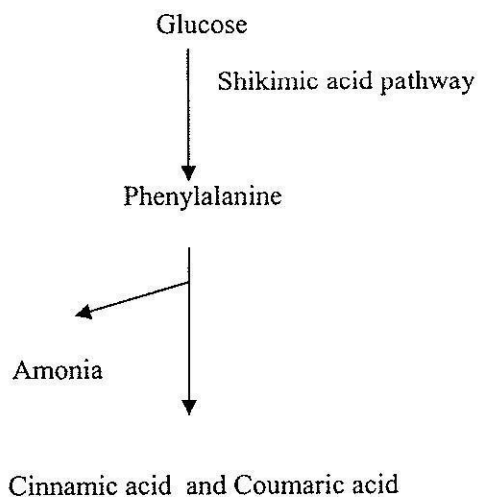


Figure 2.2 Shikimic pathway (Balentin, 1992)

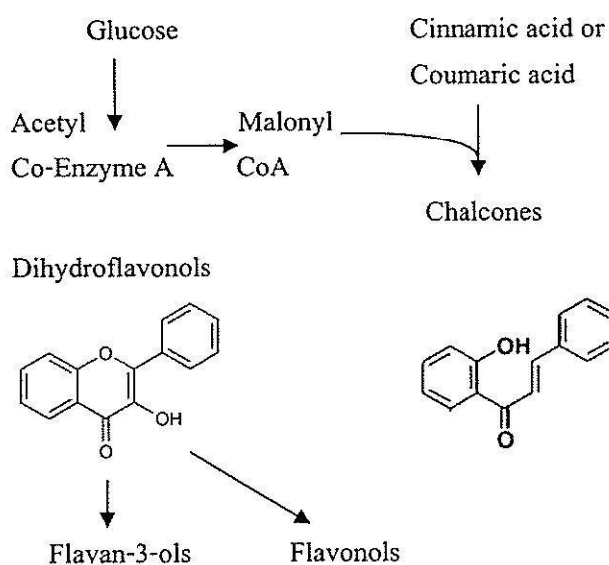


Figure 2.3 Flavan-3-ols and flavonols synthesis (Balentine, 1992)

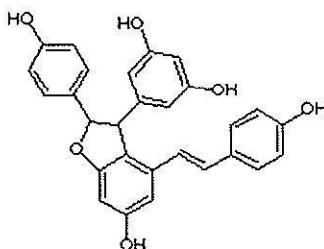


Figure 2.4 Structure of viniferin (Gorham, 1980)

ปริมาณ resveratrol ทั้งหมดในน้ำองุ่นมีความแตกต่างกันมากระหว่างองุ่นแดงและองุ่นขาว มีรายงานพบว่า น้ำองุ่นแดงมีระหว่าง 0.69 – 14.47 mg/l ซึ่งอาจไม่พบเลยในน้ำองุ่นขาว จนถึงปริมาณเพียง 1.44 mg/l (Romero-Perez et al., 1999) กระบวนการผลิต อาทิ ระหว่างการบีบและสกัดสี (pressing และ skin color extraction procedures) อาจมีผลทำให้มีปริมาณในผลิตภัณฑ์ต่างกันได้

ความเข้มข้นของ resveratrol ในไวน์มีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้องที่สำคัญ อาทิ สภาพที่องุ่นที่สายพันธุ์ขององุ่น และกระบวนการผลิตไวน์ Lamuela-Raventos and Waterhouse (1999) และ Goldberg et al. (1995) พบว่าไวน์สายพันธุ์ Pinot noir มีปริมาณสูงที่สุด เช่นเดียวกับรายงานของ McMurtrey (1997) ซึ่งมีมากกว่า 2 ½ เท่าในไวน์สายพันธุ์ Cabernet Sauvignon และ Merlot มากกว่า 4 เท่าในไวน์ Syrah มากกว่า 7 และ 18 เท่าในไวน์ Zinfandel และ Cabernet Franc องุ่นพันธุ์ Pinot noir มีความสามารถสังเคราะห์ resveratrol ได้มากเนื่องจากมีผิวที่มีความไวต่อการเข้าทำลายด้วยเชื้อ *Botritis* และ UV-light (Soles et al., 1997a)

ภูมิอากาศก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณ resveratrol ในสภาวะอากาศที่อุ่นร้อนและแห้ง การขึ้นของเชื้อรามีน้อย องุ่นจะมี resveratrol ต่ำ แต่ในที่ที่มีอากาศเย็นและชื้น เช่นที่ Bordeaux และ Canada ไวน์ผลิตในที่นี้จะมี resveratrol สูงกว่า (Soleas et al., 1997a) Jeandet et al. (1995a) กล่าวว่าถ้าองุ่นถูกคุกคามด้วยเชื้อรา 10% จะทำให้ช่วยเพิ่มการผลิต resveratrol ขององุ่น แต่ถ้ามีราคุกคามขึ้นมาก ๆ ก็ทำลายการชักนำการผลิตให้ลดลงได้เช่นกัน ซึ่งปรากฏการณ์นี้เกิดจาก laccase activity ของ *Botrytis cinerea* นอกจากนี้มีความเป็นไปได้ว่า การใช้เชื้อยีสต์มี laccase-like enzymes ในการหมักไวน์จะทำให้เกิดการแตกตัวของ resveratrol ได้เช่นกัน

ผิวองุ่นเป็นแหล่งของสาร polyphenols ที่สำคัญโดยเฉพาะ resveratrol ที่พบมากที่ผิวเท่านั้น ดังนั้นการหมักไวน์โดยใช้องุ่นทั้งผิว (skin contact fermentation หรือ maceration) จะทำให้ได้ไวน์ที่มี resveratrol มากด้วย Mattivi and Nicolini (1993) รายงานว่าไวน์อิตาลีผลิตในพื้นที่ Trentino region หมักด้วยองุ่นทั้งหมดมี resveratrol เพิ่มขึ้นมากใน 4 วัน และสูงที่สุดในวันที่ 14 หลังจากนั้นจะลดลงเล็กน้อย ปริมาณ resveratrol จะต่ำกว่าถ้ากรองเอากากออกระหว่างการหมักในวันที่ 8 การใช้ sulfite ปริมาณสูงสามารถช่วยป้องกันการสูญเสีย resveratrol เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของ pH และอุณหภูมิได้ Jeandet et al. (1995b) กล่าวสนับสนุนความสำคัญการทำ skin maceration ว่าสามารถเพิ่ม resveratrol ได้ถึง 10 เท่า ทั้งในไวน์แดงและไวน์ขาว Pezet and Cuenat (1996) พบว่าหลังจากกรองเอากากออกแล้วทำการหมักด้วย malolactic fermentation นาน 46 วัน ปริมาณ resveratrol เพิ่มขึ้น 4 เท่า เพราะมี resveratrol ในรูป glucosides หรือ oligomers เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาเอนไซม์ของ malolactic bacteria ปัจจัยการปฏิบัติในกรรมวิธีการหมัก อาทิ การใช้ pectolytic enzymes สามารถเพิ่ม resveratrol ได้ถึง 50% (Wightman et al., 1997) Goldberg et al., 1995) พบว่าการบ่มไวน์ด้วยไม้โอ๊ค หรือในถังไม้โอ๊คทำให้มีการสูญเสีย resveratrol เนื่องจากเกิดการตกตะกอน การออกซิเดชัน และการ

ดูดซึมของไม้โอ๊ค การใช้ clarifying agents อาทิ ไข่ขาว diatomaceous earth, bentonite และ gelatin ทำให้สูญเสีย resveratrol เพียงเล็กน้อย (Vrhovsek et al., 1997) แต่การใช้แผ่นกรองอาจทำให้สูญเสีย resveratrol ได้บ้าง แต่การใช้ ถ่าน charcoal จะทำให้สูญเสียมาก (Soleas et al., 1995)

2.3 ไวน์และประโยชน์ต่อสุขภาพ

ไวน์เป็นเครื่องดื่มประเภท alcoholic beverage ที่มีคุณประโยชน์ต่อสุขภาพ การศึกษาเป็นครั้งแรกโดย St Leger, Cochrane, and Moore (1979) พบว่าการดื่มไวน์ช่วยลดการตายเนื่องจากการเป็นโรคหลอดเลือดอุดตัน (coronary heart disease, CHD) จึงมีคำกล่าว “Franch Paradox” ซึ่งหมายถึงชาวฝรั่งเศสมีการตายเนื่องจาก CHD ต่ำมากแม้จะมีการบริโภคไขมันมากเพราะมีการดื่มไวน์เป็นประจำ และการดื่มไวน์ทำให้มีปริมาณ HDL สูงขึ้นได้เนื่องจากประสิทธิภาพของ phenolic compounds (Gronbaek et al., 1995) ทั้งนี้เพราะนอกจากแอลกอฮอล์แล้วไวน์ยังมีองค์ประกอบอื่น ๆ ที่มีประโยชน์ในเชิงสุขภาพ ซึ่งองค์ประกอบเหล่านั้น คือ สารประกอบ polyphenols โดยเฉพาะอย่างยิ่งในไวน์แดง ซึ่งได้แก่ phenolic acids (p-coumaric, cinnamic, caffeic, gentisic, ferulic และ vanillic acids), trihydroxylstilbenes (resveratrol และ polydatin) และ flavonoids (catechin, epicatechin และ quercetin) เป็นต้น สารประกอบที่มีการวิจัยมากที่สุดได้แก่ resveratrol และ quercetin ที่มีคุณสมบัติเป็น antioxidant ที่มีประสิทธิภาพมากกว่า α -tocopherol หรือ vitamin E

Resveratrol และ polydatin สามารถยับยั้งการสะสมของ cholesterol และ triglyceride ในตับของหนู (rats และ mice) และลดปริมาณของ triglyceride และ LDL (low-density lipoprotein) ในเลือด ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ป้องกันการเกิดความล้มเหลวในการทำงานของหัวใจ (Arichi et al., 1983) และในเซลล์ตับ HepG2 (human hepatocarcinoma) ที่เพาะเลี้ยง (Goldberg et al., 1995) หลักฐานการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งรวมตัวตกตะกอนของเกล็ดเลือดยังได้แย้งกันอยู่ Chung et al. (1992) และ Shan (1988) พบว่า resveratrol สามารถยับยั้งการรวมกันตกตะกอนของเกล็ดเลือด (platelet) จากกระด่ายได้ และ Soleas et al. (1997b) ก็พบว่า resveratrol และ quercetin ยับยั้งการรวมกันตกตะกอนของ platelet ของคนได้ 3 เท่าของ ethanol แต่ไม่พบฤทธิ์เช่นนี้จาก wine phenolics และ dietary antioxidants อื่น ๆ Gehm (1997) วิเคราะห์พบว่า resveratrol เป็น phytoestrogen หรือเป็น agonist ต่อ estrogen receptor ที่สามารถแทน estradiol ซึ่งเป็นฮอร์โมน estrogen จากธรรมชาติได้ และเป็นที่ทราบดีว่า estrogen สนับสนุนการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม แต่ estrogen อาจสามารถป้องกันการเกิดโรคหัวใจล้มเหลวได้ อย่างไรก็ตาม Lu and Serrero (1999) พบว่า resveratrol เป็น antagonist ต่อ estrogen โดยยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ในลักษณะ dose-dependent fashion

Phenolic compounds ไวน์มีประสิทธิภาพปกป้อง cells เพื่อต่อต้านการทำลายด้วยอนุมูลอิสระ (free radicals) นอกจาก resveratrol แล้วยังมี phenolic compounds ชนิดอื่น ๆ Goldberg et al. (1995) รายงานว่าสาร flavonoids อันได้แก่ quercetin, rutin, catechin, epicatechin แต่ละชนิดมีประสิทธิภาพป้องกันการเกิด oxidation ของ LDL ได้ 10 ถึง 20 เท่าของ vitamin E และ Frankel et al. (1993) รายงานว่าทั้ง resveratrol และ quercetin มีประสิทธิภาพการเป็น antioxidant มากกว่า vitamin E ในการป้องกันการเกิด oxidation ของ LDL ของมนุษย์ ที่มีการกระตุ้นด้วย copper (copper-catalyzed oxidation) Belguendouz et al. (1997) รายงานว่า resveratrol ทำหน้าที่โดยยึดรวมกับ copper ขณะที่ flavonoids อื่น (quercetin, epicatechin, catechin) จะจับรวมกับ free radicals แต่พบว่า resveratrol จะไม่ยึดรวมกับ ferrous ions ซึ่งทำให้ resveratrol เป็น antioxidant ที่เหมาะสมมากสำหรับการต้าน oxidation ของ LDL ในร่างกาย ซึ่งเกิด oxidation ได้ดีจากการกระตุ้นของ copper (Fremont et al. 1999) อย่างไรก็ตาม Belguendouz et al. (1998) มีรายงานว่า resveratrol ทั้ง 2 isomers สามารถจับ free radical ได้ดีพอ ๆ กัน Chanvitayapong et al. (1997) กล่าวว่า การเป็น antioxidant ใน cell membrane ของ resveratrol มีประสิทธิภาพดี เนื่องจากคุณสมบัติ amphiphatic character โครงสร้างมีทั้ง hydrophilic และ hydrophobic sites

สารกลุ่ม anthocyanins เป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่มีคุณสมบัติ scavengin antioxidant โดยเฉพาะในไวน์แดง (Sainst-Cricq de Gaulejac et al., 1999) anthocyanins ช่วยลดการเกิด atherogenesis และ oxidation ของ LDL มีรายงานที่ anthocyanins เป็น antioxidant ที่มีผลดีกว่า vitamin C หรือ BHT (Mazza and Miniati, 1993) ดังนั้นจะเป็นที่ค่อนข้างชัดเจนว่า เครื่องดื่ม alcohol มีผลต่อการควบคุมสภาวะของร่างกายและสารกลุ่ม phenolic compounds ในไวน์และน้ำองุ่นจะช่วยป้องกัน oxidation ของ LDL ดังรูป 2.5 (Wollin and Jones, 2001)

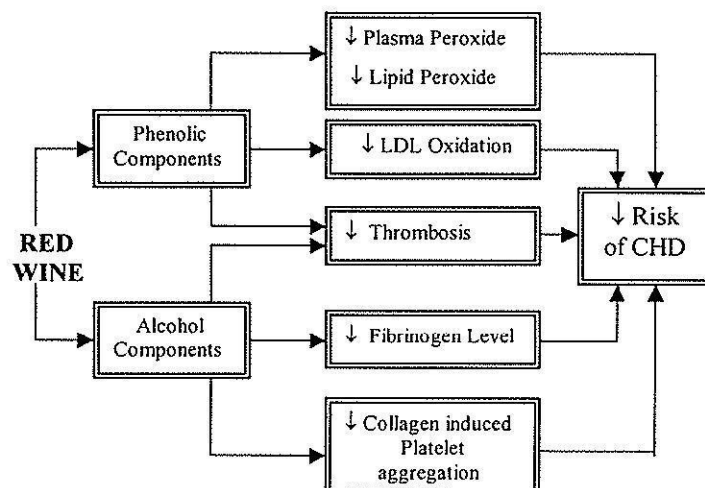


Figure 2.5 Schematic representation of the effects of alcohol and phenolic compound on risk factors for CHD (Wollin and Jones, 2001)

เอกสารอ้างอิง

- Arichi, H., Kimura, Y., Okuda, H., Baba, K., Kozawa, M., and Arichi, S. (1983). Effects of shilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. On lipid metabolism. *Chem. Pharm. Bull.* 30:1766-1770.
- Amerine, M.A., and Ough, C.S. (1980). *Methods for analysis of musts and wines*. New York, John Wiley and Sons.
- Balentine, D.A. (1992). Manufacturing and chemistry of tea. In C.-T. Ho, C.Y. Lee, and M.-T. Huang (eds). *Phenolic compounds in food and their effects on health I, analysis, occurrence, and chemistry ACS symposium 506* (pp 102-117). Amer. Chem. Soc., Washington, D.C.
- Barbanti, D., Galassi, S., Versari, A., and Burattini, R. (1996). Gas chromatography and high-pressure liquid chromatography determination of resveratrol in Italian red wines, *J. Wine Res.* 7:5-11.
- Belguendouz, L., Fremont, L., and Linard, A. (1997). Resveratrol inhibits metal ion-dependent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochem. Pharmacol.* 53:1347-1355.
- Belguendouz, L.L., Fremont, M., Gozzelino, T. 1998. Interaction of transresveratrol with plasma lipoproteins. *Biochem. Pharmacol.* 55:811-816.
- Celotti, E., Ferrarini, R., Zironi, R., and Conte, L.S. (1996). Resveratrol content of some wine obtained from dried Valpolicella grapes: Recioto and Amarone. *J. Chromatogr. A.* 730:47-52.
- Chanvitayapong, S., Draczynska-Lusiak, B., and Sun, A.Y. (1997). Amelioration of oxidative stress by antioxidants and resveratrol in PC 12 cells. *Neuro. Report.* 8:1499-1502.
- Chung, M-I., Ieng, C-M., Cheng, K-L., and Ko, F-B. (1992). An antiplatelet principle of *Verratrum formosanum*. *Planta. Med.* 58:274-276.
- Dourtoglou, V.G., Makris, D.P., Bois-Dounas, F., and Zonas, C. (1999). *trans*-Resveratrol concentration in wines produced in Greece. *J. Food Comp. Anal.* 12:227-233.
- ETS Laboratories. (2006). The ETS red wine phenolic report. Available: <http://www.etslab.com/pagetemplate/blank.asp?pageid=298>
- Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., and Kinsella, J.E. (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet.* 34:1103-1104.

- Fremont, L., Belguendouz, and Delpal, S. (1999). Antioxidant activity of resveratrol and alcohol free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sci.* 64:2511-2521.
- Gehm, B. (1997). Resveratrol is a phytoestrogen. Available: www.newseed.net/abstract/grapeestro.html.
- Goldberg, D.M. (1995). Does wine work?. *Clin. Chem.* 41:14-16.
- Goldberg, D.M., Hamm, S.E, and Parkes, J.G. (1995). Beyond alcohol: Beverage consumption and cardiovascular mortality. *Clin. Chim. Acta.* 237:155-187.
- Goldberg, D.M., Ng, E., Yan, J., Karumanchiri, A., Soleas, G.J. and Diamonds, E.P. (1996). Regional differences in resveratrol isomer concentrations of wines from various cultivars. *J. Wine Res.* 7:13-24.
- Gorham, J. 1980. The stilbenoids. *Prog. Phytochem.* 6:203-252.
- Gronbaek, M., Deis, A., Sorensen, T.I.A., Becker, U., Schnohr, P., and Jensen, G. (1995). Mortality associated with moderate intake of wine, beer, or spirits. *Br. Med. J.* 310:1165-1169.
- Harborne, J.B. (1989). Methods in plant biochemistry, vol.1. In J.B. Harborne (ed.). *Plant phenolics* (pp 1-28). London, Academic Press.
- Jackson, R. S. (2000). *Wine Science: Principle, Practice, Perception*. (2nd ed). California, Academic Press.
- Jeandet, P., Bessis, R., Maume, B.F., Meunier, P., Peyron, D., and Trollat, P. (1995b). Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine. *J. Agric. Food Chem.* 43:316-319.
- Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., Meunier, P., and Trollat, P. (1995a). Resveratrol content of wines at different ages: relationship with fungal disease pressure in the vineyard. *Am. J. Enol. Vitic.* 46:1-4.
- Lamuela-Raventos, R.M., and Waterhouse, A.L. (1999). Resveratrol and piceid in wine. *Methods Enzymol.* 299:184-190.
- Lu, R., and Serrero, G. (1999). Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells. Available: www.Sciencedirect.com/science?_ob
- Lu, Y., and Foo, L.Y. (1999). The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chem.* 65:1-8.

Linus Pualing Institute's Micronutrient Information Center. Resveratrol. Available:

<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/resveratrol/index.html>.

Mattivi, F., and Nicolini, G. (1993). Influenza della tecnica di vinificazione sul contenuto di resveratrolo dei vini L'Enotecnico. Quoted in G. J. Soleas. et al. (1997). Resveratrol: a molecule whose time has come? and gone?. Clin. Biochem. 30: 91-113.

McMurtrey, K.D. (1997). Resveratrol in wine. In T.R. Watkins (ed.). Wine nutritional and therapeutic benefits ACS symposium 661 (pp 44-55). Chem. Soc., Washington, D.C.

Mazza, G., and Miniati, E. (1993). Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. Florida: CRC Press.

Price, S.F., Breen, P.J., Valladao, M., and Watson, B.T. (1995). Cluster sun exposure and quercetin in Pinot Noir grapes and wine. Am. J. Enol. Vitic. 46:187-194.

Saint-Cricq de Gaulejac, N., Glories, Y., and Vivas, N. (1999). Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines. Food Res. Int. 32:327-333.

Singleton, V.L., and Esau, P. (1969). Phenolic substances in grapes and wines and their significant. New York, Academic Press.

Shan, C.W. (1988). Effects of polydatin on platelet aggregation of rabbits. Acta. Pharmacol. Sin. 23:394-396.

Soleas, G.J., Goldberg, D.M., Kuramanchiri, A., Diamandis, E.P., and Ng, E. (1995). Influences of viticultural and enological factors on changes in *cis*- and *trans*-resveratrol in commercial wine. J. Wine Res. 6:107-121.

Soleas, G.J., Diamandis, E.P., and Goldberg, D.M. (1997a). Wine as a biological fluid: History, production and role in disease prevention. J. Clin. Lab. Anal. 11:287-313.

Soleas, G.J., Diamandis, E.P., and Goldberg, D.M. (1997b). Resveratrol: A molecule whose time has come? and gone?. Clin. Biochem. 30:91-113.

Van de Wiel, A., van Golde, P.H.M., and Hart, H.C. (2001). Blessings of the grape. Euro. J. Inter Med. 12:484-489.

Vrhovsek, U., Wendelin, S., and Eder, R. (1997). Effects of various vinification techniques on the concentrations of *cis*- and *trans*-resveratrol and resveratrol glucosides isomers in wine. Amer. J. Enol. Vitic. 48:214-219.

Waterhouse, A.L. (1995). Wine and heart disease. Available:

<http://waterhouse.ucdavis.edu/chemind.htm>.

- Waterhouse, A.L., and Teissedre, P-L. (1997). Levels of phenolics in Californian varietal wines. In Wine: T.R. Watkins (ed.). Nutritional and Therapeutic Benefits (pp. 12-23). Amer. Chem. Soc., Washington, D.C.
- Wightman, J.D., Price, S.F., Watson, B.T., and Wrolstad, R.E. (1997). Some effects of processing enzymes on anthocyanins and phenolics in Pinot noir and Cabernet Sauvignon wines. Amer. J. Enol. Vitic. 48:39-48.
- Wollin, S.D., and Jones, P.J.H. (2001). Alcohol, red wine and cardiovascular disease. J. Nutr. 131:1401-1404.
- Yi, O.S., Meyer, A.S., and Frankel, E.N. (1997). Antioxidant activity of grape extracts in lecithin liposome system. J. Am. Oil Chem. Soc. 74:1301-1307.
- Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H., and Nury, F.S. (1995) Fremont et al., 1999. Wine analysis and production. New York, Chapman & Hall.

บทที่ 3

สารประกอบฟีนอลิกและคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของไวน์
จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

(Phenolic Compounds and Antioxidative Properties of
Selected Wines from Suranaree University of Technology)

รายงานวิจัยบทนี้เป็นผลงานส่วนหนึ่งของงานวิจัยที่ได้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ
Food Chemistry 104 (2007) 1485-1490.

จึงขอเสนอเป็นส่วนหนึ่งในรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัย



Phenolic compounds and antioxidative properties of selected wines from the northeast of Thailand

Jirayus Woraratphoka^a, Kanok-Orn Intarapichet^{a,*}, Korakod Indrapichate^b

^a School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

^b School of Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

Received 28 November 2006; received in revised form 19 February 2007; accepted 19 February 2007

Abstract

The phenolic contents and antioxidative properties of selected wines, produced in the northeast of Thailand, were evaluated and compared, particularly those produced at Suranaree University of Technology (SUT) Farm as a case study. Nine wine varieties were used to evaluate their total phenolic content (TPC) by Folin–Ciocalteu method, free radical scavenging efficacy by DPPH method and reducing power by ferric reducing-antioxidant power (FRAP) method. The red wines had significantly higher ($p < 0.05$) amounts of total phenolic compounds and antioxidant activities (AA) compared to white wines. Capillary electrophoresis (CE) was used as a powerful and performing tool for analysis of principal phenolic compounds in the wines. *t*-Resveratrol was found in Shiraz, Zinfandel and blend wine varieties. (+)-Catechin was found in all wine varieties, except in Chasselas Dore. (+)-Catechin was present in wines at a higher concentration than (–)-epicatechin. In red wine, gallic acid was the dominant phenolic acid found.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Wines; Antioxidant property; Capillary electrophoresis; Thailand

1. Introduction

The phenolic antioxidants in red wines have been proposed as an explanation for the lower death rate from coronary heart disease in France referred to as “The French Paradox” (despite high fat intake, mortality from coronary heart disease is lower in some regions of France than in the other developed countries due to regular wine consumption) (Kannel & Ellison, 1996; Renaud & de Lorgeril, 1992; Wollin & Jones, 2001). Phenolic compounds in wine play an antioxidant role in both biological and food systems. They have many favourable effects on human health, such as inhibition of oxidation of low-density lipoprotein cholesterol, and inhibition of platelet aggregation (Frankel, Waterhouse, & Kinsella, 1993; van de Wiel, van Golde, & Hart, 2001), thereby decreasing heart disease risks. Phenolic compounds can be classified into two groups: the flavo-

noids and non-flavonoids. The major flavonoids in wine include conjugates of the flavonols: quercetin and myricetin; the flavan-3-ols, (+)-catechin and (–)-epicatechin and anthocyanins. The non-flavonoids include the hydroxybenzoates: *p*-hydroxybenzoic acid and gallic acid; hydroxycinnamates: caffeic, cinnamic, and *p*-coumaric acid and the stilbenes: *trans* (*t*)-resveratrol, *cis* (*c*)-resveratrol and *t*-resveratrol glucoside.

The antioxidant activities of these phenolic compounds in wines as well as their individual pure chemicals have been investigated using many procedures such as the stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical method (Sanchez-Moreno, Larrauri, & Saura-Calixto, 1999), a ferric reducing-antioxidant power (FRAP) method (Kamal-El-Deen, Milos, Modum, Music, & Bodan, 2004).

Capillary electrophoresis (CE) is one of the useful techniques to evaluate phenolic constituents in wines. Its high efficiency and capacity to resolve a complex of natural compounds were the reasons for choosing this technique. The successful application of CE for wine and polyphenols

* Corresponding author. Tel.: +66 44 22 4265; fax: +66 44 22 4387.
E-mail address: ikanok-orn@sut.ac.th (K.-O. Intarapichet).

determination has been demonstrated (Frankel, Waterhouse, & Teissedre, 1995; Gu, Chu, O'Dwyer, & Zeece, 2000; Minussi et al., 2003; Sadecka & Polonsky, 2000).

The amounts of active polyphenols in wines are dependent on grape variety, geology, environment and wine processing technique (Frankel et al., 1995). Just more than 10 years ago, wine production in Thailand increased considerably; however, there is little knowledge of phenolic contents and antioxidative properties of wines produced in different regions of Thailand. Therefore, the purposes of this study were to evaluate the contents and antioxidant qualities of phenolic compounds in some selected wines produced from grapes grown in the northeast region of Thailand particularly those from Suranaree University of Technology (SUT) Farm and to obtain the phenolic profiles of such wines.

2. Materials and methods

2.1. Chemical

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Tripyridyl-s-triazine was obtained from Acros Organics (Morris Plain, NJ, USA). The polyphenol standards commonly found in wines were used for CE determination: resveratrol, (+)-catechin, (–)-epicatechin, rutin, syringic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, gallic acid, protocatechuic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), cinnamic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, quercetin, gentisic acid (Acros Organics, Morris Plain, NJ, USA) and salicylic acid (Asia Pacific Specialty Chemicals Ltd., Seven Hills, Australia). All other chemicals and solvents were reagent grade and purchased from Sigma and Fisher Scientific, Inc. (Pittsburgh, PA, USA).

2.2. Sample collection

Five red wines: Shiraz, Muscat Hamburg (China), Zinfandel, Barbera (vintage year 2003 and 2004), and Muscat Hamburg (vintage year 2004); three white wines: Italia, Chasselas Dore (year 2003), and Chenin Blanc (year 2004) obtained from SUT farm; and a commercial blended wine (red wine; Dong Pa Ya Yen) purchased from a local food store in Nakhon Ratchasima Province, were used for this experiment.

2.3. Determination of phenolic compounds

2.3.1. Total phenolic content

The total phenolic contents (TPC) were determined by Folin–Ciocalteu method (Matthaus, 2002). Sample solution of 0.1 ml was introduced into a test tube and then 2 ml of 2% of sodium carbonate were added. After incubation for 2 min, 0.1 ml of Folin–Ciocalteu's reagent (Folin–Ciocalteu:methanol, 1:1, v/v) was added. The absorbance was measured at 750 nm after incubation for 30 min. Gallic acid was used as chemical standard for calibration. The TPC content of the sample was expressed as mg of gallic acid equivalents per litre of sample (mgGAE/l).

2.3.2. Flavonoid content

The possible use of formaldehyde to precipitate the flavonoid phenolic compounds has been proposed for wine (Ough & Amerinc, 1988). To 10 ml of wine sample, 5 ml of HCl:H₂O (1:4, v/v) solution and 5 ml of 37% formaldehyde were added, left for 24 h and filtered through 0.45 µm polyethersulphon membrane (Supor®Acrodisc®, Pall Life Sciences, Gelman Sciences Inc, Ann Arbor, MI, USA). The amount of flavonoid was calculated as the differences between total phenols and non-flavonoids in wine. The flavonoid content was expressed in mgGAE/l.

2.4. Determination of antioxidant activity

2.4.1. Free radical scavenging activity

The DPPH method (Sanchez-Moreno et al., 1999) was used to determine free radical scavenging property. For each solution, different concentrations were tested using gallic acid as a standard for calibration, and expressed as mg gallic acid equivalents per litre of sample (mgGAE/l). Sample solution of 0.1 ml was added to 3.9 ml of a 2.5×10^{-2} g/l methanolic DPPH solution. The tube was kept for 45 min in the dark, then the absorbance was measured at 515 nm. Antioxidant activity of the sample was defined as the amount of antioxidant necessary to reduce the initial DPPH concentration by 50% (Efficient concentration = EC50 mgGAE/l).

2.4.2. Ferric reducing-antioxidant power (FRAP)

Measurement of reducing ability of the antioxidative property was performed using the FRAP method (Katalinic et al., 2004). The working FRAP reagent was prepared by mixing 10 volumes of 1.0 mol/l acetate buffer, pH 3.6 with 1 volume of 10 mmol/l TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) in 40 mmol/l hydrochloric acid and with 1 volume of 20 mmol/l ferric chloride.

In a reaction tube, sample solution of 50 µl and 150 µl of deionized water were added into 1.5 ml of the FRAP reagent. Absorbance was measured after 8 min. A standard curve was prepared using different concentrations (100–1000 µmol/l) of FeSO₄ · 7H₂O. The antioxidant efficiency of the sample solution was calculated with reference to the standard curve given by a Fe²⁺ solution of known concentration. Ferric reducing power of the sample was expressed in mmol Fe²⁺/l.

2.5. Analysis of phenolic component

2.5.1. Sample preparation

For liquid/liquid extraction, 1 ml of wine was extracted twice with 1 ml of diethyl ether. The organic phase was completely dried under nitrogen gas and re-suspended with 1 ml of ethanol (50%). Wine sample was filtered through 0.45 µm polyethersulphon membrane.

2.5.2. Capillary electrophoresis procedure

Capillary electrophoresis analyses were performed using an Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) model

GI600AX, equipped with a diode-array detector. An extended light path capillary tube of 50 μm i.d. (Agilent) with effective and total lengths of 56 and 64.5 cm, respectively, was used. Electrophoretic analyses were performed at an applied voltage of 15 kV at 25 °C.

The sample was hydrodynamically injected at 5.10^3 Pa pressure for 7 s. Between analysis, the column was flushed with 0.1 M sodium hydroxide for 1 min (1.75 μl), deionized water for 2 min (3.5 μl) and electrophoretic buffer for 3 min (5.25 μl). Electrophoretic buffer was a mixture of phosphate 25 mmol/l and borate 10 mmol/l, pH 8.5. Detectable wavelengths were from 190 to 400 nm. The wavelength for *t*-resveratrol was at the maximum wavelength of 206 nm. The wavelengths for other phenolic compounds were taken from the work of Minussi et al. (2003). All CE analyses were performed in duplicate. Before being used, all solutions were filtered through a 0.45 μm polyethersulphon membrane.

2.6. Statistical analysis

Two replicates of each wine variety were experimented. Each replicate was chemically analyzed in duplicate samples. Statistical analysis was evaluated in a completely randomized design (CRD) with Statistical Analysis System (1993) and means comparison by Duncan's Multiple Range Tests (DMRT) were analyzed. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. Total phenolic content and antioxidant activity of wines

The TPC contents of red and white wines ranged from 1498 to 2432 mgGAE/l and 306 to 846 mgGAE/l, respec-

tively (Table 1). The contents of phenolic compounds were similar to those presented by Waterhouse and Teissedre (1997) who reported the variability in the levels of total phenolic content (TPC) ranging from 1850 to 2200 mgGAE/l for red and 220 to 250 mg/l for white wines and mentioned that grape skins and seeds had long contact time during fermentation process for red wines giving high amounts of these compounds. Different vintage years gave differences in phenolic composition. The average TPC of Shiraz and Zinfandel wine produced in vintage year 2004 were significantly higher than those wine varieties produced in year 2003. However, Muscat Hamburg (China) red wine in vintage year 2003 contained TPC twice as much of the one produced in year 2004. These were in agreement with Waterhouse and Teissedre (1997) that TPC and individual compounds varied depending on vintage year. The red wines had significantly higher amounts of total phenols and flavonoids compared to white wines, except in Italian white wine variety. The amounts of flavonoids range between 74.27% and 91.74% of TPC for red wines and 29.35% and 67.46% for white wines, while the non-flavonoid phenols in wines ranged between 195 and 576 mgGAE/l for red wines and 159 and 275 mgGAE/l for white wines. There was no significant difference in non-flavonoids between red and white wines.

The free radical scavenging activities, EC50s, determined by DPPH method of red and white wines were not significantly different, ranging from 3.1 to 6.8 mgGAE/l except in wine produced from Chasselar Dore with the EC50 of 13.8 mgGAE/l. Moreover, red wines also had higher ferric reducing-antioxidant power (FRAP) than white wines. Chasselar Dore variety had significantly lowest antioxidant property (highest EC50 and lowest FRAP value) because of its low TPC and flavonoid content.

Table 1
Total phenolic content and antioxidant activity of selected SUT wine

Wine variety ^A	TPC (mgGAE/l)	Flavonoid (mgGAE/l)	Non-flavonoid (mgGAE/l)	DPPH (EC50) (mgGAE/l)	FRAP (mmol Fe ²⁺)
Red wine					
Shiraz (03)	1687.5 $\pm$ 109.6 ^{b,c}	1253.3 $\pm$ 9.2 ^{c,d}	434.2 $\pm$ 9.2 ^{a,b}	4.6 $\pm$ 0.1 ^{b,c,d}	10.5 $\pm$ 2.5 ^{c,d}
Shiraz_KIV (04)	2843.6 $\pm$ 235.9 ^a	2268.0 $\pm$ 105.7 ^{a,b}	575.6 $\pm$ 341.6 ^a	2.7 $\pm$ 0.5 ^d	19.5 $\pm$ 0.2 ^{a,b}
Shiraz_ECI (04)	2938.2 $\pm$ 57.9 ^a	2647.1 $\pm$ 40.7 ^a	291.1 $\pm$ 17.2 ^{b,c}	4.1 $\pm$ 0.8 ^{b,c,d}	19.3 $\pm$ 3.0 ^{a,b}
Muscat (China) (03)	2365.9 $\pm$ 19.6 ^{a,b}	2170.6 $\pm$ 3.7 ^{a,b}	195.3 $\pm$ 3.7 ^{b,c}	3.1 $\pm$ 0.0 ^d	17.1 $\pm$ 0.7 ^{a,b,c}
Muscat (China) (04)	1458.4 $\pm$ 382.1 ^{c,d}	1190.2 $\pm$ 280.7 ^{c,d}	268.1 $\pm$ 101.4 ^{b,c}	3.6 $\pm$ 0.0 ^{b,c,d}	10.6 $\pm$ 2.9 ^{c,d}
Muscat (04)	2184.4 $\pm$ 12.9 ^{a,b,c}	1901.0 $\pm$ 4.0 ^{a,b,c}	283.4 $\pm$ 8.9 ^{b,c}	3.8 $\pm$ 0.3 ^{b,c,d}	15.6 $\pm$ 1.5 ^{a,b,c}
Zinfandel (03)	1856.3 $\pm$ 133.4 ^{b,c}	1516.4 $\pm$ 41.2 ^{b,c}	339.9 $\pm$ 41.2 ^{b,c}	3.8 $\pm$ 0.1 ^{b,c,d}	12.8 $\pm$ 0.1 ^{b,c,d}
Zinfandel (04)	2750.9 $\pm$ 623.6 ^a	2449.3 $\pm$ 619.4 ^a	301.6 $\pm$ 4.2 ^{b,c}	3.3 $\pm$ 1.5 ^{c,d}	20.6 $\pm$ 7.2 ^a
Barbera (03)	2431.5 $\pm$ 398.1 ^{a,b}	2077.4 $\pm$ 15.8 ^{a,b}	354.1 $\pm$ 15.8 ^{a,b,c}	6.1 $\pm$ 0.0 ^{b,c,d}	16.4 $\pm$ 3.8 ^{a,b,c}
Barbera (04)	2479.7 $\pm$ 1029.2 ^{a,b}	2117.4 $\pm$ 999.9 ^{a,b}	362.3 $\pm$ 29.3 ^{a,b,c}	4.8 $\pm$ 0.3 ^{b,c,d}	15.9 $\pm$ 6.2 ^{a,b,c}
Blended (02)	1498.1 $\pm$ 84.9 ^{c,d}	1184.0 $\pm$ 7.4 ^{c,d}	314.1 $\pm$ 7.4 ^{b,c}	6.7 $\pm$ 0.7 ^{b,c}	10.8 $\pm$ 0.0 ^{c,d}
White wine					
Italia (03)	845.7 $\pm$ 9.5 ^{d,e}	570.5 $\pm$ 35.4 ^{d,e}	275.2 $\pm$ 35.4 ^{b,c}	5.7 $\pm$ 0.1 ^{b,c,d}	6.4 $\pm$ 0.1 ^{d,e}
Chasselar Dore (03)	306.0 $\pm$ 22.6 ^e	89.8 $\pm$ 26.4 ^e	216.2 $\pm$ 26.4 ^{b,c}	13.8 $\pm$ 3.0 ^a	1.9 $\pm$ 0.0 ^e
Chenin Blanc (04)	311.2 $\pm$ 9.7 ^e	151.6 $\pm$ 58.7 ^e	159.6 $\pm$ 68.4 ^c	6.8 $\pm$ 3.8 ^b	2.2 $\pm$ 0.6 ^e

Each value is the mean $\pm$ standard deviation, $n = 4$.

SUT, Suranaree University of Technology.

Numbers with different letters within the same column are significantly different ($P \leq 0.05$).

^A Muscat, Muscat Hamburg, (02), (03) and (04) mean vintage year 2002, 2003, and 2004, respectively, KIV = KIV1116 yeast strain, ECI = ECI11 yeast strain.

Table 2
Calibration and recovery data of 14 standard phenolic compounds by capillary electrophoresis

Peak no./compound	Regression equation ^a	Abs	Correlation coefficient	Recovery (%) ^b	Extraction recovery (%) ^c
1. <i>trans</i> -Resveratrol	$y = 5.31018x - 1.26761$	206	0.99679	102.27	90.81
2. (-)-Epicatechin	$y = 13.75689x - 7.01988$	206	0.99236	67.4	76.33
3. (+)-Catechin	$y = 18.1251x - 8.90925$	206	0.99536	76.96	104.81
4. Rutin	$y = 4.2446x - 1.7062$	206	0.99677	79.13	52.45
5. Syringic	$y = 6.59337x - 3.6545$	206	0.98815	74.03	92.49
6. Cinnamic	$y = 9.05151x - 0.0192$	217	0.99916	85.53	98.46
7. <i>p</i> -Coumaric	$y = 7.33965x - 2.17302$	206	0.99751	88.74	95.81
8. Gentisic	$y = 14.02428x - 3.15387$	206	0.99041	99.34	113.52
9. <i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	$y = 12.68154x + 1.09211$	206	0.9984	96.86	93.72
10. Quercetin	$y = 8.80158x - 1.35929$	206	0.99934	99.41	109.21
11. Salicylic acid	$y = 22.40915x - 5.99405$	206	0.95843	85.57	83.37
12. Caffeic acid	$y = 12.66657x - 4.3738$	217	0.998	88.1	102.78
13. Gallic acid	$y = 17.80169x - 8.85641$	217	0.99568	85.09	96.53
14. Protocatechuic acid	$y = 45.78436x - 13.50042$	206	0.9982	82.62	91.17

^a x is concentration in mg/l and y is peak area.

^b Recovery due to the performance of capillary electrophoresis instrument, $n = 7$.

^c Recovery due to extraction process, $n = 7$.

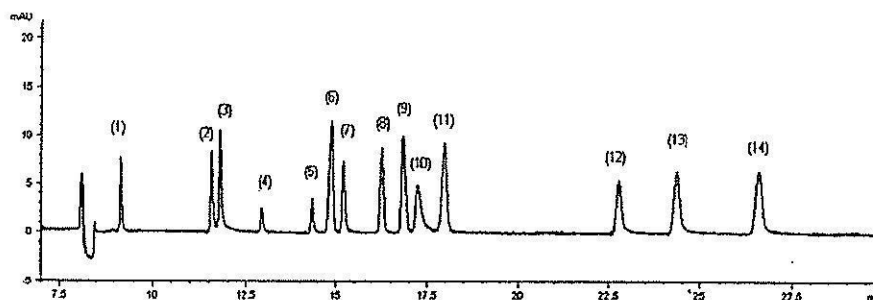


Fig. 1. Electropherogram of 14 standard phenolic compounds. Detectable wavelengths were from 190 to 400 nm; identification of peak numbers as in Table 2.

Table 3
The bioactive phenolic component (mg/l) of the selected SUT wines

Wine variety ^A	Phenolic composition of wine (mg/l)				
	Resveratrol	Epicatechin	Catechin	Rutin	Quercetin
Red wine					
Shiraz (03)	2.76 ± 0.84 ^a	2.32 ± 0.16 ^{a,b}	3.56 ± 0.04 ^{c,d}	5.33 ± 0.27 ^a	ND
Shiraz_KIV (04)	1.31 ± 0.75 ^b	4.09 ± 3.18 ^{a,b}	6.20 ± 4.94 ^{a,b,c,d}	ND	2.42 ± 0.62 ^{a,b}
Shiraz_ECI (04)	1.53 ± 0.50 ^b	4.14 ± 1.71 ^{a,b}	9.29 ± 1.33 ^{a,b,c,d}	ND	3.74 ± 2.47 ^a
Muscat (China) (03)	ND	3.93 ± 0.13 ^{a,b}	13.17 ± 0.09 ^{a,b}	2.50 ± 0.05 ^c	ND
Muscat (China) (04)	ND	1.44 ± 0.26 ^{a,b}	3.59 ± 1.33 ^{c,d}	ND	1.69 ± 0.49 ^{b,c,d}
Muscat (04)	ND	3.11 ± 1.14 ^{a,b}	9.97 ± 4.79 ^{a,b,c}	ND	2.28 ± 0.81 ^{a,b,c}
Zinfandel (03)	ND	3.56 ± 0.16 ^{a,b}	4.15 ± 0.25 ^{b,c,d}	ND	ND
Zinfandel (04)	1.38 ± 1.02 ^b	6.84 ± 5.50 ^a	14.46 ± 11.60 ^a	ND	2.07 ± 0.90 ^{a,b,c}
Barbera (03)	ND	ND	0.72 ± 0.10 ^{c,d}	ND	0.52 ± 0.08 ^{c,d}
Barbera (04)	ND	3.59 ± 2.79 ^{a,b}	6.15 ± 4.91 ^{a,b,c,d}	ND	1.28 ± 0.28 ^{b,c,d}
Blended (02)	1.21 ± 0.03 ^b	2.69 ± 0.27 ^{a,b}	6.26 ± 0.46 ^{a,b,c,d}	ND	ND
White wine					
Italia (03)	ND	ND	0.92 ± 0.03 ^{c,d}	3.46 ± 0.36 ^b	ND
Chasselas Dore (03)	ND	ND	ND	ND	ND
Chenin Blanc (04)	ND	ND	1.70 ± 0.11 ^{c,d}	ND	2.12 ± 0.10 ^{a,b,c}

Each value is the mean ± standard deviation, $n = 4$.

SUT, Suranaree University of Technology.

Numbers with different letters within the same column are statistically different ($P \leq 0.05$).

^A Muscat, Muscat Hamburg. (02), (03) and (04) mean vintage year 2002, 2003, and 2004, respectively, KIV = KIV1116 yeast strain, ECI = ECI118 yeast strain.

3.2. Phenolic component of selected wines

Fourteen pure chemicals of individual phenolic compounds were used as references to determine their presence in selected wines from SUT Farm and that available locally. The calibration and recovery data of 14 phenolic compounds used for capillary electrophoresis (CE) analysis are presented in Table 2 and electropherogram is shown in Fig. 1. Except for rutin and (–)-epicatechin, extraction recoveries were higher than 80%.

t-Resveratrol was found only in Shiraz, Zinfandel and blended wine ranging from 1.21 to 2.76 mg/l (Table 3). These results were similar to those of Gu, Creasey, Kester, and Zeece (1999) who reported low concentrations of *t*-resveratrol of 6.78 and 3.26 µM in Shiraz wine from Australia and Zinfandel wine from California, respectively. In our studies, Shiraz wine produced from vintage year 2003 had significantly higher amount of resveratrol than those produced from year 2004. However, resveratrol contents in Shiraz wines of the same vintage (2004) were not affected by yeast strains, K1V1116 and EC1118. There was no resveratrol present in Muscat and Barbara wines. Resveratrol is a phytoalexin produced by higher plants upon environmental stress such as fungal infection, injury or UV light exposure. Therefore, it is mostly located in the berry skin. Fremont (2000) reported the large variations in ranges of resveratrol concentrations of red wine originating from various countries. The concentration was dependent on grape variety, environmental conditions during cultivation, wine processing techniques and alcohol contents. Soleas, Diamandis, and Goldberg (1997) reported that grape varieties, which have a thin skin renders them sensitive to traumatic damage, Botrytis infection and UV light; for example Pinot Noir produced high resveratrol content. Thick skin berries such as those from Cabernet Sauvignon could generate low amounts of this compound. In addition, it was detected in low amounts in California wine in the range of 0.4–2 mg/l (Chu, O'Dwyer, & Zeece, 1998), 0.99–1.9 µM (Gu et al., 1999), 0.53–2.78 ppm (McMurtrey, 1997) and lower than 0.09 mg/l (Lamuela-Raventos & Waterhouse, 1999). Soleas et al. (1997) also reported that the concentration of resveratrol was climate dependent. In warm and dry climates where fungal attack is low, resveratrol production is also low. The resveratrol content of SUT wines produced from grapes grown in warm and dry climates, was also detected in low concentration. Wine processing conditions have much influence on the amount of resveratrol. Higher resveratrol contents are usually present in red wines in which there has been prolonged contact between the must and skins, whereas lower contents or amounts below the limit of detection are usually present in white wines, which are not macerated with skins and seeds (Soleas et al., 1997). In addition, Seraini, Maiani, and Ferro-Luzzi (1998) noted that alcohol was a natural stabilizing agent for polyphenolic compounds. Resveratrol, is an amphipathic molecule and requires sufficient of alcohol content to dissolve.

Table 4
Phenolic acids concentration (mg/l) of selected SUT wines

Wine variety ^a	Phenolic composition of wine (mg/l)							
	Syringic	Cinnamic	<i>p</i> -Coumaric	Gentisic	<i>p</i> -Hydroxy benzoic	Salicylic	Caffeic	Gallic
<i>Red wine</i>								
Shiraz (03)	7.32 ± 0.03 ^a	3.71 ± 0.04 ^a	18.33 ± 0.27 ^b	0.96 ± 0.85 ^a	1.82 ± 0.95 ^{a,b}	0.62 ± 0.13 ^b	8.45 ± 0.37 ^c	15.38 ± 1.31 ^{e,d}
Shiraz_K1V (04)	6.58 ± 0.69 ^{a,b}	ND	25.90 ± 0.51 ^a	ND	1.12 ± 0.15 ^{a,b,c}	ND	9.83 ± 1.28 ^b	14.44 ± 0.49 ^{e,d,e}
Shiraz_EC1 (04)	7.84 ± 4.76 ^a	ND	14.10 ± 5.06 ^c	ND	1.99 ± 1.10 ^a	1.30 ± 0.88 ^a	13.74 ± 0.43 ^a	20.99 ± 2.94 ^b
Muscat (China) (03)	4.97 ± 0.05 ^{a,b,c}	2.16 ± 0.50 ^b	1.72 ± 0.56 ^{d,e}	0.72 ± 0.11 ^a	1.39 ± 0.05 ^{a,b,c}	ND	5.73 ± 0.32 ^d	15.11 ± 0.28 ^{c,d}
Muscat (China) (04)	2.52 ± 2.09 ^{c,d}	ND	3.10 ± 2.20 ^{d,e}	ND	0.77 ± 0.11 ^{c,d}	ND	13.28 ± 0.60 ^c	10.56 ± 1.73 ^c
Muscat (04)	ND	ND	ND	ND	0.85 ± 0.08 ^{b,c,d}	ND	2.16 ± 0.01 ^f	10.30 ± 0.15 ^c
Zinfandel (03)	5.35 ± 1.04 ^{a,b,c}	1.36 ± 0.29 ^c	3.19 ± 0.28 ^{d,e}	ND	0.84 ± 0.01 ^{b,c,d}	0.63 ± 0.12 ^b	8.18 ± 0.85 ^c	13.93 ± 1.03 ^{e,d,e}
Zinfandel (04)	5.17 ± 1.68 ^{a,b,c}	ND	4.76 ± 1.16 ^d	ND	1.18 ± 0.27 ^{a,b,c}	0.85 ± 0.09 ^{a,b}	2.78 ± 0.13 ^f	17.48 ± 0.56 ^{b,c}
Barbera (03)	6.05 ± 0.06 ^{a,b,c}	ND	0.91 ± 0.03 ^{d,e}	ND	ND	0.57 ± 0.10 ^{b,e}	1.58 ± 0.33 ^{f,g}	25.69 ± 5.01 ^a
Barbera (04)	5.50 ± 2.10 ^{a,b,c}	ND	4.57 ± 0.13 ^d	ND	1.28 ± 0.32 ^{a,b,c}	0.76 ± 0.01 ^{a,b}	2.45 ± 0.01 ^f	20.92 ± 1.19 ^b
Blended (02)	5.47 ± 0.14 ^{a,b,c}	0.89 ± 0.20 ^d	3.20 ± 1.92 ^{d,e}	0.60 ± 0.16 ^a	0.51 ± 0.02 ^{c,d}	ND	ND	11.91 ± 1.46 ^{d,e}
<i>White wine</i>								
Italia (03)	6.09 ± 1.32 ^{a,b,c}	0.49 ± 0.04 ^f	ND	ND	ND	0.60 ± 0.01 ^b	ND	ND
Chasselas Dore (03)	4.27 ± 0.48 ^{a,b,c}	1.54 ± 0.27 ^c	1.15 ± 0.37 ^{d,e}	ND	0.75 ± 0.12 ^{c,d}	0.50 ± 0.89 ^{b,e}	0.64 ± 0.42 ^{g,h}	0.60 ± 0.05 ^{d,e}
Chenin Blanc (04)	2.64 ± 0.28 ^{b,c,d}	ND	1.33 ± 0.40 ^{d,e}	ND	0.73 ± 0.04 ^{c,d}	ND	4.28 ± 1.17 ^e	0.94 ± 0.13 ^{c,d,e}

Each value is the mean ± standard deviation, *n* = 4.

SUT, Suranaree University of Technology.

Numbers with different letters within the same column are significantly different (*P* ≤ 0.05).

^a Muscat, Muscat Hamburg, (02), (03) and (04) mean vintage year 2002, 2003, and 2004, respectively. K1 = K1V1116 yeast, strain EC = EC1118 yeast strain.

(-)-Epicatechin was found only in red wine and there were no significant difference in its content. The amount of (-)-epicatechin found ranged between none detected to 6.84 mg/l in all red wines which was lower than the (+)-catechin. This was in agreement with Minussi et al. (2003) who found higher amounts of catechin than epicatechin in Italian wines. Quercetin is a free form of flavonol group and rutin is a glucoside of this compound. The amounts of quercetin ranged from 0.52 to 3.74 mg/l. Rutin was found in some wines in low amounts or was not detected. Due to its fairly high polar property, extraction and recovery by extraction solvent (diethyl ether) and buffer used for CE analysis were limited (Table 2). The blended wine from a local food store was predominantly Shiraz with a mixture of other red grape varieties. Therefore, the blended wine and Shiraz wine variety contained similar components and amounts of phenolic compounds. In addition, the white Chasselas Dore wine contained no bioactive phenolic components (Table 3), therefore, it had the lowest antioxidant activity with the highest EC₅₀ of 13.8 mgGAE/l and lowest FRAP value of 1.9 mmol Fe²⁺/l (Table 1).

Phenolic acids contents were found in all wines at moderate concentrations (Table 4). These compounds have been said to be the principal compounds constituted in all plants (Harborne, 1998). Cinnamic acid plays the key role in the biosynthesis pathway of phenolic compounds as it is converted to *p*-coumaric acid, which is a substrate for the formation of flavonoid and some of non-flavonoid family (Soleas et al., 1997). In red wines, gallic acid was the highest of the polyphenols presented while it was detected in very low amount or not detected in white wines. The presence of high amounts of gallic acid in red wines would be expected, since this phenolic acid is principally formed by hydrolysis of flavonoid gallate esters, which are largely absent in white wine due to lack of skin extraction (Frankel et al., 1995). This finding was in agreement with the work of Minussi et al. (2003) who reported that gallic acid was the highest polyphenol in red wine.

4. Conclusions

Antioxidant activities of red wines were significantly higher ($p < 0.05$) than those of the white ones. There were no significant differences in antioxidant activities of the red wines. Health promoting *t*-resveratrol was found only in Shiraz and Zinfandel wine varieties. *t*-Resveratrol was also found in the commercially blended wine in similar amount to those of Shiraz wine produced in year 2004 and Zinfandel wine produced in the same year. Gallic acid was the main component in red wines, while it was absent in white wines. These investigations provided information on some of the potential health benefits of some selected wines produced in the northeast region of Thailand particularly those from the SUT Farm during the vintage years of 2003 and 2004, that the red wines had a better potential health benefit than white wines.

Acknowledgement

This work was supported by Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.

References

- Chu, Q., O'Dwyer, M., & Zeece, M. G. (1998). Direct analysis of resveratrol in wine by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 509–513.
- Frankel, E., Waterhouse, A., & Kinsella, J. (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*, 341, 1103–1104.
- Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., & Teissedre, P. L. (1995). Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 890–894.
- Fremont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Science*, 66, 663–673.
- Gu, X., Chu, Q., O'Dwyer, M., & Zeece, M. (2000). Analysis of resveratrol in wine by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 881, 471–481.
- Gu, X., Creasey, L., Kester, M., & Zeece, M. (1999). Capillary electrophoretic determination of resveratrol in wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 3223–3227.
- Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical methods* (3rd ed.). New York: Chapman and Hall.
- Kannel, W. B., & Ellison, R. C. (1996). Alcohol and coronary heart disease: The evidence for a protective effect. *Clinica Chimica Acta*, 246, 59–76.
- Katalinic, V., Milos, M., Modum, D., Music, I., & Bodan, M. (2004). *Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin*. Available at <<http://www.sciencedirect.com>>
- Lamuela-Raventos, R. M., & Waterhouse, A. L. (1999). Resveratrol and piceid in wine. *Methods in Enzymology*, 299, 184–190.
- Matthaus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 3444–3451.
- McMurtrey, K. D. (1997). Resveratrol in wine. In T. R. Watkins (Ed.), *Wine: Nutritional and therapeutic benefits* (pp. 44–55). American Chemical Society.
- Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., et al. (2003). Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry*, 82, 409–416.
- Ough, C. S., & Amerine, M. A. (1988). *Methods for analysis of musts and wines* (2nd ed.). New York: John Wiley and Sons.
- Renaud, S., & de Lorgeril, M. (1992). Wine alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339, 1523–1526.
- Sadecka, J., & Polonsky, J. (2000). Electrophoretic methods in the analysis of beverages. *Journal of Chromatography A*, 880, 243–279.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International*, 32, 407–412.
- Seraini, M., Maiani, G., & Ferro-Luzzi, A. (1998). Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Nutrition*, 128, 1003–1007.
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., & Goldberg, D. M. (1997). Resveratrol: A molecule whose time has come? and gone? *Clinical Biochemistry*, 30, 91–113.
- Statistical Analysis System. (1993). *SAS 6.08.04 WIN*. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- van de Wiele, A., van Golde, P. H. M., & Hart, H. C. (2001). Blessings of the grape. *European Journal of Internal Medicine*, 12, 484–489.
- Waterhouse, A. L., & Teissedre, P.-L. (1997). Levels of phenolics in Californian varietal wines. In T. R. Watkins (Ed.), *Wine: Nutritional and therapeutic benefits* (pp. 12–23). Washington D.C: American Chemical Society.
- Wollin, S. D., & Jones, P. J. H. (2001). Alcohol, red wine and cardiovascular disease. *Journal of Nutrition*, 131, 1401–1404.

บทที่ 4

การเปลี่ยนแปลงของ Phenolic Compounds ระหว่าง การหมักไวน์แดงด้วยยีสต์ต่างสายพันธุ์ Changes of Phenolic Compounds during Fermentation of Red Wine by Different Yeast Strains

4.1. คำนำ

ไวน์ประกอบด้วย phenolic compounds หลากหลายชนิดร่วมกัน ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารป้องกันการเกิด oxidation สาร phenolic ในไวน์ได้มาจากองุ่น ไม้โอ๊ก หรือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก metabolite ของยีสต์ (Soleas et al., 1997) phenolic compounds ในเปลือก เมล็ด และเนื้อขององุ่นจะถูกสกัดออกมาในไวน์ระหว่างกระบวนการหมักไวน์ การเพาะปลูกองุ่นและการทำไวน์มีความแตกต่างกันในแต่ละท้องถิ่น ประเทศ และผู้ผลิต ซึ่งส่งผลต่อปริมาณและองค์ประกอบของ phenolic compounds ไวน์ที่แตกต่างกัน ปัจจัยในการเพาะปลูกองุ่น เช่น สายพันธุ์องุ่น คุณภาพ สภาพภูมิอากาศ สภาพภูมิประเทศ และการติดเชื้อมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในองุ่น (Siemann and Creasy, 1992; McDonold et al., 1998) ปัจจัยในการทำไวน์ เช่น ระยะเวลาในการหมักรวมทั้งการอุณหภูมิ การหมักรวมทั้งเมล็ดและก้าน และการใช้ enzymes ล้วนมีผลต่อการสกัดเอา phenolic compounds ออกมาสู่น้ำคั้นองุ่น (must) (Ramey et al., 1986; Kovac et al., 1992; Mattivi et al., 1995)

นอกจากยีสต์จะสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้แล้ว เอนไซม์ที่อยู่ภายในยีสต์ (intrinsic enzyme) เช่น β -glucosidase มีความสามารถในการตัดพันธะระหว่าง glucose และสารประกอบที่บริเวณ anomeric carbon สารประกอบเหล่านี้อาจจะเป็นสารที่ให้กลิ่นหอม (aroma) เช่น monoterpenol หรือ phenolic compounds ซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่น *trans-resveratrol* (Günata et al., 1990) ยีสต์ต่างสายพันธุ์มีปริมาณ β -glucosidase ที่ต่างกัน ทำให้ผลิต phenolic compounds ได้ในระดับที่แตกต่างกัน (Echeverry et al., 2005)

การทำไวน์แดงส่วนใหญ่มีการหมักด้วย lactic acid bacteria หรือเรียกว่า malolactic fermentation (MLF) หลังจากหมักแอลกอฮอล์ (alcoholic fermentation, ALF) แล้ว เพื่อปรับคุณภาพและความเสถียรของไวน์ ซึ่งในระหว่างกระบวนการนี้ phenolic compounds ต่างๆในไวน์อาจจะมีการเปลี่ยนแปลง

กระบวนการบ่มไวน์ทำเพื่อเพิ่มความเสถียรและปรับเปลี่ยนคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไวน์ให้ดีขึ้น การแลกเปลี่ยนสารประกอบระหว่างสารประกอบจากไม้ tannins และสารที่ให้กลิ่นหอม

ในไวน์ อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ phenolic compounds ปัจจุบันนี้มีการใช้เศษชิ้นไม้โอ๊ก แทนถึงไม้โอ๊กในระหว่างการบ่มไวน์ Del Alamo-Sanza et al. (2004) แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงปริมาณ phenolic compounds ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ในไวน์ที่บ่มด้วยเศษไม้โอ๊ก ดังนั้น จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบที่มีคุณประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น *trans-resveratrol* ระหว่างการบ่มไวน์ด้วยชิ้นไม้โอ๊ก

4.2 วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อประเมินอิทธิพลของยีสต์ต่างสายพันธุ์ที่มีต่อ phenolic compounds ในไวน์ระหว่างการหมัก ALF การหมัก MLF และ ขณะบ่มไวน์ และติดตามการเปลี่ยนแปลงของ phenolic compounds ที่มีฤทธิ์ชีวภาพต่อการบริโภค อาทิ *trans-resveratrol* ระหว่างการทำไวน์จากองุ่นที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

4.3 อุปกรณ์และวิธีการ

4.3.1 แหล่งขององุ่นและยีสต์

องุ่นสายพันธุ์ Exotic และ Shiraz ได้จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา เก็บตัวอย่างในช่วงเดือนมีนาคม และ เมษายน ปี 2004 ตามลำดับ ที่ปริมาณน้ำตาลประมาณ 20 °Brix ล้างองุ่น ปิดจั่ว และเก็บที่ -20 °C จนกระทั่งใช้ทดลอง

ยีสต์ที่ใช้ 2 สายพันธุ์เป็น *Saccharomyces cerevisiae* คือ K1V1116 (Lalvin®), The Lallemant Inc., Montreal, Canada) และ CY3079 (CP Co., Ltd, Thailand) และอีกสายพันธุ์เป็น *S. bayanus* คือ EC1118 (Lalvin®), The Lallemant Inc., Montreal, Canada)

4.3.2 น้ำองุ่นและการสกัดเปลือกองุ่น

น้ำองุ่นและการสกัดเปลือกองุ่นเตรียมตามวิธีของ Zoecklein et al. (1995) โดยมีการปรับเปลี่ยนเล็กน้อย ชั่งองุ่น (แยกเอาส่วนเมล็ดออก) 25 กรัม ปั่นผสม และ centrifuge ที่ 4500 × g เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำองุ่น ไว้สำหรับวิเคราะห์ ส่วนกากที่เหลือ สกัดด้วย 50% ethanol โดยใช้สัดส่วน 10 ml ต่อกรัมตัวอย่าง ทั้งน้ำองุ่นและสารสกัดจากเปลือกนำมาใช้วิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic content (TPC) และสาร phenolic compounds แต่ละชนิด ด้วยวิธี spectrophotometry และ capillary electrophoresis (CE) phenolic compounds ทำระเหยออกแอลกอฮอล์ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ก่อนที่จะวิเคราะห์ด้วย CE

4.3.3 กระบวนการทำไวน์

การเตรียมน้ำองุ่น ละลายองุ่นแช่แข็ง และคั้น หลังจากนั้นแยกส่วนกากและเมล็ดออก ปรับปริมาณของแข็งทั้งหมดในน้ำองุ่นให้ได้ 21 - 22 °Brix โดยใช้น้ำตาล และปรับ pH ให้ได้ 3.6 - 3.7 โดยใช้ tartaric acid หลังจากนั้นผสมส่วนกากและเมล็ดใส่กลับเข้าไปในน้ำองุ่นในสัดส่วน เปลือกและเมล็ด 1.5 กิโลกรัม และ น้ำองุ่น 3.5 ลิตร ในทุกการทดลอง ส่วนที่ได้นี้เรียกว่า must เติม potassium metabisulfite 100 mg/l free SO₂ ที่ must ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน

การหมักแอลกอฮอล์ เตรียม stock เชื้อยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์โดยเติมเชื้อบริสุทธิ์ลงในน้ำองุ่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อซึ่งมีปริมาณน้ำตาล 24 °Brix และเขย่าตลอด 24 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์เริ่มต้นประมาณ 1.42×10^7 ในไวน์ Exotic และ 5.76×10^6 CFU/ml ในไวน์ Shiraz ก่อนทำการหมัก เติม trans-resveratrol บริสุทธิ์ทางการค้าลงในปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 และ 10 ppm ทำการหมักแอลกอฮอล์เป็นระยะเวลา 13 วัน หลังจากนั้นแยกส่วนเปลือกออกจากน้ำหมัก

การหมัก malolactic การหมัก MLF ทำได้โดยใช้ lactic acid bacteria, *Oenococcus oeni* MBR.B1 (Microenos®, Laffort Cénologie, St-Simon, France) แห่เข้ามาในน้ำเพื่อให้เกิดการคูณน้ำกลับและเติมลงในไวน์ในปริมาณเชื้อตั้งต้น 1×10^7 CFU/ml ทำการหมัก MLF เป็นเวลา 1 เดือน

การถ่ายไวน์และปล่อยให้ไวน์เสถียร หลังจากหมัก MLF แล้วถ่ายไวน์ออก และเติม SO₂ 60 ppm ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อให้ตกตะกอนสาร potassium bitartrate หลังจากนั้น ทำการถ่ายไวน์อีกครั้งเพื่อแยกส่วนตะกอนออก

การบ่มไวน์ หลังจากตกตะกอน เติมเศษชิ้นไม้โอ๊ก (Winetech supply and consult Co., Ltd., St-Simon, France) 0.5 g/l ลงในไวน์ก่อนการบ่ม ใช้เวลาบ่มไวน์นาน 6 เดือน ที่ 15 °C

4.3.4 การเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์

เก็บตัวอย่างไวน์ในระหว่างกระบวนการหมัก ALF หมัก MLF และการบ่ม เพื่อการวิเคราะห์ เก็บตัวอย่างทุกวันในระหว่างช่วงสัปดาห์ที่ 1 ของการหมัก หลังจากนั้น เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน จนกระทั่งครบสัปดาห์ที่ 2 สำหรับการหมัก MLF เก็บตัวอย่างในวันแรกที่เติมเชื้อแบคทีเรีย และเมื่อครบ 1 เดือน ระหว่างการบ่ม เก็บตัวอย่างที่เดือน 0, 1, 2, 4 และ 6 ตัวอย่างที่ได้ centrifuge ที่ 4 °C แรงเหวี่ยง $4500 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเอาส่วนที่ไม่ต้องการออก ส่วน supernatant ใช้ในการวิเคราะห์

4.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์

วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์โดยวิธี dichromate oxidation (AOAC, 1997) ใช้เครื่อง Kjeldahl apparatus ในการกลั่นแอลกอฮอล์ ปิเปตตัวอย่างไวน์ 1 ml ใส่ลงในหลอดกลั่น รองรับ distillate ด้วย flask ที่มีสารละลาย potassium dichromate 25 ml รองรับที่ด้านปลาย condenser โดยให้ส่วนปลายจุ่มลงในสารละลาย หลังจากกลั่น ไทเทรต potassium dichromate ที่เหลือกับสารละลาย ferrous ammonium sulfate (FAS) ใช้ 1-10-phenanthroline ferrous sulfate เป็น indicator คำนวณเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ได้ดังสมการ

$$\% \text{ Alconol by volume} = 25 - (25 \times V/V')$$

เมื่อ V = ปริมาณ FAS ที่ใช้สำหรับไทเทรตตัวอย่างไวน์

V' = ปริมาณ FAS ที่ใช้สำหรับไทเทรต blank

4.3.6 การวิเคราะห์ total phenolic content โดยเครื่อง spectrophotometer

ปริมาณ total phenolic content ในองุ่นและไวน์วิเคราะห์ได้โดยวิธี Folin-Ciocalteu (Matthaus, 2002) สารละลายตัวอย่าง 0.1 ml ผสมกับ 2% sodium carbonate 2 ml ตั้งไว้ 2 นาที เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu (Folin:Methanol, 1:1) หลังจากบ่ม 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm ปริมาณ TPC รายงานเป็นหน่วย mg gallic acid equivalent (GAE)/L of sample

4.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณ phenolic compounds โดยเครื่อง capillary electrophoresis

การเตรียมตัวอย่าง วิธีการสกัดมีการดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Minussi et al. (2003) สกัดโดยวิธี liquid/liquid extraction ใช้ตัวอย่างไวน์ 1 ml สกัดด้วย diethyl ether 1 ml จำนวน 2 รอบ รวมส่วน organic phase และทำให้แห้งโดยใช้ก๊าซไนโตรเจนเป่า หลังจากนั้นทำละลายใหม่ใน 50% ethanol 1 ml และกรองผ่าน 0.45 μm polyethersulfon membrane (Supor Acrodisc, Pull Life Sciences, Gelman Sciences Inc, USA)

วิธีวิเคราะห์โดยเครื่อง capillary electrophoresis เครื่องวิเคราะห์ Capillary electrophoresis เป็นของ Agilent Technologies, model G1600AX (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany) ต่อกับ diode-array detector ใช้ uncoated fused silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 μm (Agilent) ซึ่งมี effective และ total length เท่ากับ 50 และ 75 cm ตามลำดับ วิเคราะห์โดยให้กระแสไฟฟ้า 15 kV ที่ 25 °C Electrophoretic buffer ประกอบด้วย phosphate 25 mmol/l และ borate 10 mmol/l pH 8.5 ก่อนใช้ทุกครั้ง Capillary จะต้อง pre-rinsed ด้วยน้ำเป็นเวลา 2 นาที และ



ตามด้วย running buffer 3 นาที ตัวอย่างถูกฉีดเข้าโดยใช้ความดัน 50 mBar 7 วินาที ในระหว่างการวิเคราะห์ ถ้าง capillary ทุกครั้งด้วย 0.1 M NaOH 1 นาที น้ำ 2 นาที และ running buffer 3 นาที ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 2 ซ้ำ ก่อนวิเคราะห์ทุกครั้ง สารละลายทุกชนิดต้องกรองผ่าน 0.45 μm polyethersulfon membrane

กราฟมาตรฐานของสารประกอบแต่ละชนิดเตรียมโดยใช้สารบริสุทธิ์ช่วงความเข้มข้น 2 - 10 mg/l พล็อตกับพื้นที่ใต้พีค คำนวณโดยใช้โปรแกรม chemstation Rev.A.09.01 (1206) (Agilent Technologies 1990 - 2001) ทำการวิเคราะห์ 4 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น

4.3.8 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ตัวอย่างไวน์ทั้ง 2 สายพันธุ์และหมักด้วยยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ คัดเลือกเฉพาะไวน์ที่หมักโดยไม่เติม *trans-resveratrol* (0 ppm) และเติม *trans-resveratrol* 10 ppm ก่อนการหมักเพื่อการวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส ทำการประเมินคุณภาพด้วยวิธี quantitative descriptive analysis (QDA) (Stone and Sidel, 1993) ใช้ผู้ประเมินซึ่งเป็นผู้ที่มีความคุ้นเคย และนิยมการดื่มไวน์อยู่เป็นประจำ ทั้งหมด 7 คน แบบการให้คะแนนเป็นเส้นตรงยาว 10 เซนติเมตร (unstructured scale) คะแนนจาก 0 (ซ้ายมือ) ถึง 10 (ขวามือ) คุณลักษณะที่ประเมินประกอบด้วย สี (color) กลิ่น (aroma) รสชาติ (taste) ความเข้มข้น (body) และการยอมรับโดยรวม (overall acceptance) สุ่มตัวอย่างเสิร์ฟให้ผู้ประเมิน และให้ผู้ประเมินให้คะแนนโดยขีดเส้นตรงตัดตั้งฉากกับเส้นคะแนนตามความเห็น ทำการวัดระยะและแปลเป็นคะแนน

4.3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ วิเคราะห์ทางเคมี 2 ซ้ำต่อตัวอย่าง และวิเคราะห์ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้จำนวนผู้ประเมินเป็นจำนวนซ้ำการทดลอง วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี completely randomized design (CRD) ใช้โปรแกรม Statistical Analysis (SAS Institute, Inc., 1993) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Tests (DMRT) พิจารณานัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$ และเสนอผลการทดลองเป็นค่า mean $\pm$ standard deviation

4.4 ผลการทดลองและวิจารณ์

4.4.1 สาร phenolic compounds ในองุ่น

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด แอนโทไซยานินทั้งหมด และสารฟีนอลิกแต่ละชนิดในองุ่นพันธุ์เอ็กโซติกและชีราส แสดงดัง Table 4.1 ส่วนเปลือกขององุ่นทั้ง 2 สายพันธุ์มีปริมาณ total phenolic contents (TPC) มากกว่าส่วนน้ำองุ่น และยังพบว่าองุ่นพันธุ์ Exotic มีปริมาณ TPC มากกว่าพันธุ์

Shiraz สารกลุ่ม anthocyanins เป็นสาร polyphenol หลักที่พบในองุ่นทั้งสองสายพันธุ์ *trans-resveratrol* พบเฉพาะในส่วนเปลือกขององุ่น (1.15 mg/l ในองุ่นพันธุ์ Exotic และ 0.24 mg/l ในองุ่นพันธุ์ Shiraz) แต่ไม่พบในส่วนน้ำองุ่น ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jeandet et al. (1991) ซึ่งรายงานว่ พบ พันธุ์ *trans-resveratrol* ในส่วนเปลือกองุ่นเท่านั้น

พบสารกลุ่ม monomeric flavan-3-ols เช่น epicatechin และ catechin ปริมาณน้อยในองุ่นทั้งสองสายพันธุ์ ในองุ่นพันธุ์ Shiraz พบปริมาณสารเหล่านี้มากกว่าพันธุ์ Exotic โดยเฉพาะ catechin ซึ่งพบมากกว่าถึง 2 เท่า โดยปกติสารในกลุ่มนี้มีกัอยู่ในรูปที่จับกันเป็นกลุ่ม เช่น epicatechin gallate procyanidin proanthocyanidin (Zoecklein et al., 1995)

สารกลุ่ม flavonoid mmol/L s พบ quercetin ทั้งในน้ำและเปลือก ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยของ Burn et al. (2001) ซึ่งรายงานว่ ปริมาณ quercetin ในองุ่นพันธุ์ Cabernet sauvignon และ Merlot พบในปริมาณน้อย และยังรายงานอีกว่ quercetin ในองุ่นส่วนใหญ่จะพบในรูป conjugated quercetin

สารกลุ่ม hydroxybenzoic acid syringic พบทั้งในน้ำและเปลือกองุ่นทั้งสองพันธุ์ ซึ่งพันธุ์ Shiraz มีปริมาณมากกว่าพันธุ์ Exotic ประมาณ 2 เท่า ส่วน phenolic acid อื่นๆ เช่น gentisic *p*-hydroxybenzoic gallic และ protocatechuic acid ไม่พบทั้งในน้ำและเปลือกขององุ่นทั้ง 2 สายพันธุ์

สารกลุ่ม hydroxycinnamic acid พบ cinnamic และ *p*-coumaric acid ในน้ำและเปลือกองุ่นพันธุ์ Exotic ส่วน caffeic acid ไม่พบในน้ำและเปลือกขององุ่นทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Burn et al. (2001) ซึ่งรายงานว่ ไม่พบ *p*-coumaric และ caffeic acid อิสระในผลองุ่น

4.4.2 การเปลี่ยนแปลงระหว่างหมักแอลกอฮอล์

การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์

ระหว่างการหมัก ALF พบว่ ปริมาณแอลกอฮอล์ในไวน์ที่ผลิตจากองุ่นทั้ง 2 สายพันธุ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 2 ของการหมักและคงที่ตลอดการหมัก (Figure 4.1) ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ผลิตแอลกอฮอล์ได้ในปริมาณใกล้เคียงกัน

การผลิตไวน์โดยไม่เติม *trans-resveratrol* บริสุทธิ์ลงในน้ำองุ่น พบว่ *trans-resveratrol* ในไวน์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีปริมาณไม่แตกต่างกัน (Figure 4.2a, 4.2b) ในไวน์สายพันธุ์ Exotic พบ *trans-resveratrol* ปริมาณสูงสุดในวันที่ 3 ของการหมัก ซึ่งมีปริมาณ 1.26 – 1.84 mg/l ในยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในขณะที่ไวน์สายพันธุ์ Shiraz พบปริมาณสูงสุด 0.92 – 1.68 mg/l ในวันที่ 5 และ 6 ของการหมัก ปริมาณ *trans-resveratrol* ที่พบในไวน์ Exotic มีปริมาณมากกว่าไวน์ Shiraz อาจเนื่องมาจาก ปริมาณ *resveratrol* ในเปลือกขององุ่นสายพันธุ์ Exotic มีมากกว่า (1.15 ในองุ่นพันธุ์ Exotic และ 0.24 mg/l ในองุ่นพันธุ์ Shiraz) (Table 4.1)

Table 4.1 Phenolic composition of juice and skin in grape berries

Phenolics	Exotic variety		Shiraz variety	
	juice	skin extract	juice	skin extract
Total phenols ^a	1.22 ± 0.03	10.31 ± 0.56	0.98 ± 0.06	6.82 ± 0.13
Total anthocyanin ^b	23.27 ± 9.77	1391.36 ± 162.21	17.75 ± 6.12	839.17 ± 255.47
Total colored anthocyanin ^b	12.94 ± 3.99	125.00 ± 17.40	14.13 ± 1.23	110.60 ± 24.72
<i>trans</i> -Resveratrol ^b	ND	1.15 ± 0.74	ND	0.24 ± 0.05
Epicatechin ^b	ND	1.15 ± 0.30	2.00 ± 0.33	1.69 ± 1.09
Catechin ^b	2.11 ± 0.31	2.74 ± 0.37	3.14 ± 0.66	4.70 ± 3.69
Quercetin ^b	1.39 ± 0.01	1.30 ± 0.00	1.40 ± 0.02	0.95 ± 0.00
Syringic acid ^b	2.15 ± 0.56	2.81 ± 1.06	4.05 ± 1.32	4.67 ± 3.33
Gentisic acid ^b	ND	ND	ND	ND
<i>p</i> -hydroxybenzoic ^b	ND	ND	ND	ND
Salicylic acid ^b	ND	1.64 ± 0.51	ND	ND
Gallic acid ^b	ND	ND	ND	ND
Protocatechuic ^b	ND	ND	ND	ND
Cinnamic acid ^b	0.56 ± 0.08	0.54 ± 0.11	0.47 ± 0.00	ND
<i>p</i> -Coumaric acid ^b	2.00 ± 0.68	0.98 ± 0.20	1.63 ± 0.06	ND
Caffeic acid ^b	ND	ND	ND	ND

n = 4, a = expressed as g/l (for juice) and g/kg grape skin (for skin extract), b = expressed as mg/l (for juice) and mg/kg grape skin (for skin extract).

การเปลี่ยนแปลงปริมาณ *trans*-resveratrol

การผลิตไวน์พันธุ์ Exotic ร่วมกับการเติม *trans*-resveratrol บริสุทธิ์ พบปริมาณของ *trans*-resveratrol สูงสุดในวันที่ 3 สำหรับไวน์ที่เติม *trans*-resveratrol บริสุทธิ์ 5 ppm พบปริมาณ 2.59, 2.31 และ 3.26 mg/l เมื่อใช้ยีสต์สายพันธุ์ K1V1116, CY3079 และ EC1118 ตามลำดับ สำหรับไวน์ที่เติม *trans*-resveratrol บริสุทธิ์ 10 ppm พบปริมาณ 4.58, 5.00 และ 4.48 mg/l เมื่อใช้ยีสต์สายพันธุ์ K1V1116, CY3079 และ EC1118 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ในไวน์ Shiraz ที่เติม *trans*-resveratrol บริสุทธิ์ 5 ppm (Figure 4.2e, 4.2f) พบปริมาณ *trans*-resveratrol มากที่สุดในวันที่ 5 ของการหมักที่

ความเข้มข้น 1.84, 2.56 และ 2.58 mg/l สำหรับไวน์ที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ K1V1116, CY3079 และ EC1118 ตามลำดับ ส่วนไวน์ที่เติม *trans*-resveratrol 10 ppm พบปริมาณ 3.77, 3.73 และ 2.92 mg/l ตามลำดับ ไม่พบความแตกต่างของปริมาณ *trans*-resveratrol อย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ การเติม *trans*-resveratrol บริสุทธิ์ลงใน must ทำให้เพิ่มปริมาณ *trans*-resveratrol อิสระในไวน์ แต่พบว่าระดับที่พบจะมีความเข้มข้นน้อยกว่าปริมาณที่เติมลงไป อาจเป็นเพราะเกิดการรวมตัวของสารเป็นโมเลกุล dimeric หรือ polymeric ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น หรือ เกิดการดูดซับอยู่บนเปลือกขององุ่น

พบปริมาณ *trans*-resveratrol ปริมาณสูงเมื่อปริมาณแอลกอฮอล์ในไวน์ถึง 9.38 - 11.26% ระหว่างวันที่ 2 - 6 ของการหมัก (Figure 4.1) การเพิ่มขึ้นของ *trans*-resveratrol อาจเนื่องมาจากปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตขึ้นโดยยีสต์ ซึ่งจะเพิ่มความสามารถในการสกัดสาร phenolic ออกมาในไวน์ (Lamuela-Raventos et al., 1997) หรือเป็นเพราะเอนไซม์ β -glucosidase ในยีสต์ ซึ่งสามารถตัด piciated (resveratrol glucoside) ได้เป็น aglycon molecule (free resveratrol) ผลที่ได้นี้คล้ายกับการศึกษาของ Burn et al. (2001) และ Lamuela-Raventos et al. (1997) ซึ่งพบว่าปริมาณ *trans*-resveratrol มีมากที่สุดในวันที่ 6 และ 8 ของการหมัก ตามลำดับ และปริมาณจะลดลงหลังจากนั้น อาจเป็นเพราะว่าเมื่อสารถูกสกัดออกมาจากเปลือกขององุ่น สารนี้อาจถูกดูดซับโดยกากของยีสต์ และ/หรือ ถูกออกซิไดซ์ไปเป็นสารอื่น (Lamuela-Raventos et al., 1997) เป็นที่น่าสนใจว่า เมื่อหมักไวน์พร้อมกากเป็นเวลา 13 วัน (สิ้นสุดกระบวนการหมัก) *trans*-resveratrol ในทุกการทดลองของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์มีปริมาณใกล้เคียงกัน คือ 0.53 - 1.46 mg/l สำหรับไวน์ Exotic และ 0.31 - 1.11 mg/l สำหรับไวน์ Shiraz

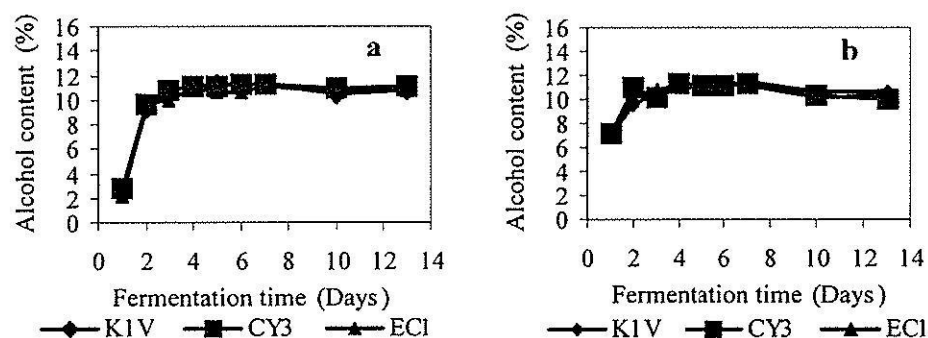


Figure 4.1 Alcoholic content of Exotic (a) and Shiraz (b) wine during Alcoholic fermentation.

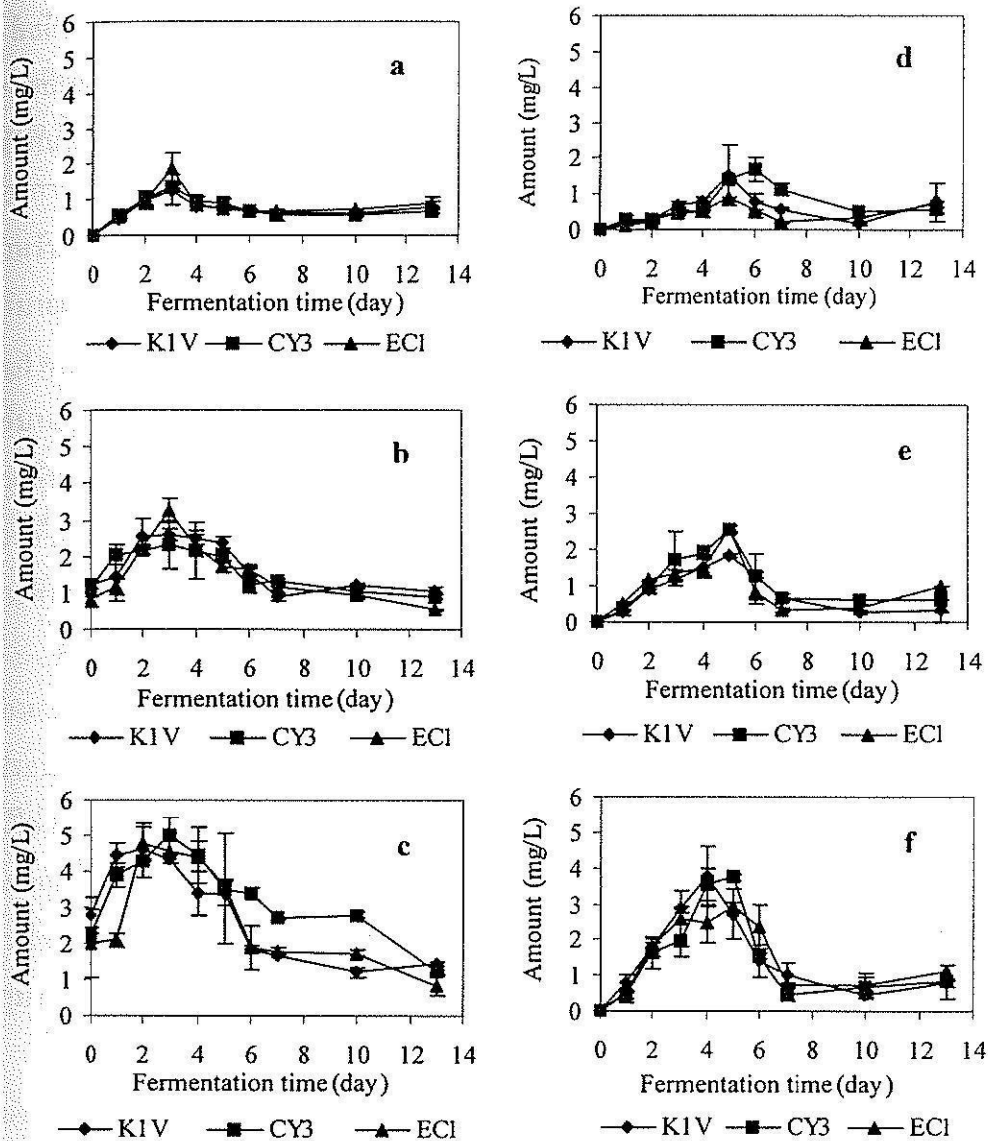


Figure 4.2 Changes of *t*-resveratrol during alcoholic fermentation of Exotic wine:

a = Resv 0 ppm, b = Resv 5 ppm and c = Resv 10 ppm and Shiraz wine: d = Resv 0 ppm, e = Resv 5 ppm and f = Resv 10 ppm.

การเปลี่ยนแปลงปริมาณ total phenolic contents และสาร phenolic อื่นๆ

ปริมาณ TPC ในไวน์ Exotic และ Shiraz เพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงวันที่ 3 ของการหมักและคงที่หรือลดลงเล็กน้อยในยีสต์ทุกสายพันธุ์ (Figure 4.3) ในไวน์ Exotic (Figure 4.3a) ปริมาณสูงสุดพบในวันที่ 3 ของการหมักที่ความเข้มข้น 3232, 3318 และ 3336 mg/l ในไวน์ที่ผลิตจากยีสต์ K1V1116, CY3079 และ EC1118 ตามลำดับ ในไวน์ Shiraz (Figure 4.3d) พบมากที่สุดในวันที่ 3 การที่พบ TPC มากในวันที่ 3 - 5 ของการหมัก อาจเนื่องมาจากปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตขึ้นในระหว่างการหมักมี

ปริมาณสูงสุดในวันนี้ด้วย TPC ในไวน์สายพันธุ์ Exotic มีมากกว่าสายพันธุ์ Shiraz อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากสายพันธุ์ Exotic มีปริมาณ anthocyanins สูงทั้งในส่วนน้ำและส่วนเปลือกองุ่น เมื่อสิ้นสุดการหมัก ไม่พบความแตกต่างของ TPC ที่ผลิตจากยีสต์ต่างสายพันธุ์ นอกจากนั้นการเติม *trans-resveratrol* ปริสุทธิ ก็ยังไม่ส่งผลต่อปริมาณ TPC ในไวน์

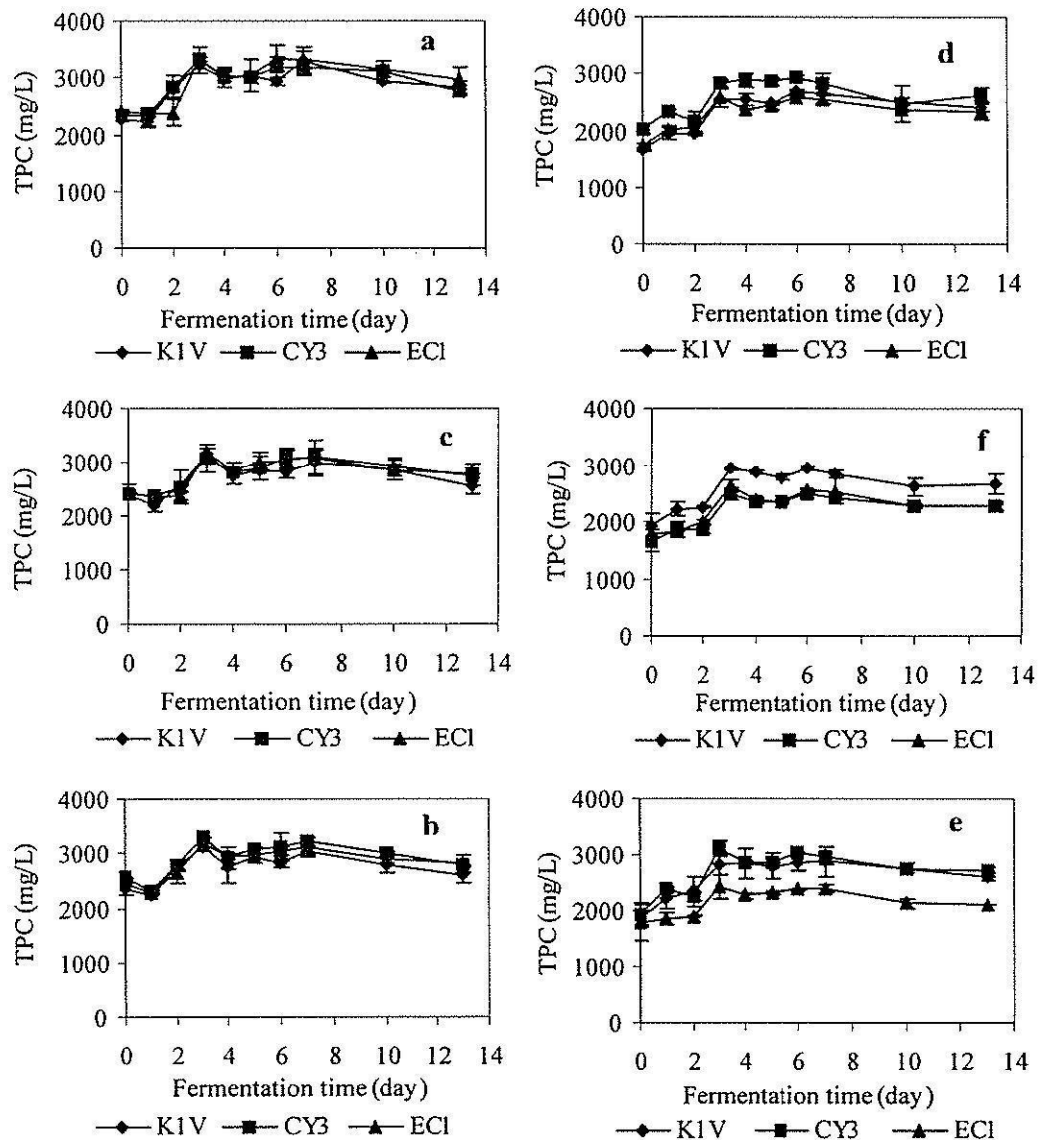


Figure 4.3 Changes of TPC during alcoholic fermentation of Exotic wine: a = Resv 0 ppm, b = Resv 5 ppm and c = Resv 10 ppm and Shiraz wine: d = Resv 0 ppm, e = Resv 5 ppm and f = Resv 10 ppm.

สารประกอบกลุ่ม flavan-3-ol ในไวน์ที่ไม่มีการเติม *trans-resveratrol* พบว่า ปริมาณของ epicatechin เพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงวันที่ 5 จากปริมาณ 0.78 ถึง 11.27 mg/l สำหรับไวน์ Exotic และ 5.43 ถึง 29.30 mg/l สำหรับไวน์ Shiraz (Figure 4.4a, 4.4d) ปริมาณ catechin ก็เพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงวันที่ 5 ของการหมักด้วยเช่นกัน จาก 1.15 ถึง 18.16 mg/l สำหรับไวน์ Exotic และ 4.30 ถึง 44.27 mg/l สำหรับไวน์ Shiraz (Figure 4.5a, 4.5d) ในไวน์ Exotic ตรวจพบปริมาณ epicatechin และ catechin ในปริมาณสูงสุดในวันที่ 5 ของการหมักเมื่อใช้ยีสต์สายพันธุ์ CY3079 ที่ความเข้มข้น 13.57 และ 20.68 mg/l ตามลำดับ ส่วนในไวน์ Shiraz พบปริมาณสูงสุดในวันที่ 4 – 5 ของการหมัก โดย epicatechin พบปริมาณ 32.02 mg/l เมื่อใช้ยีสต์สายพันธุ์ CY3079 และ catechin พบปริมาณ 50.84 mg/l เมื่อใช้ยีสต์สายพันธุ์ K1V1116 (Figure 4.4d, 4.5d) จากผลที่ได้ดูเหมือนว่าปริมาณ epicatechin และ catechin ในไวน์ที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ K1V1116 และ CY3079 ตรวจพบปริมาณมากกว่าไวน์ที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ EC1118

ตามงานวิจัยของ Sripunya (2005) รายงานว่า ยีสต์สายพันธุ์ K1V1116 และ CY3079 มีกิจกรรมของเอนไซม์ β -D-glucosidase (ประมาณ 90 และ 82 U/mg ตามลำดับ) มากกว่ายีสต์สายพันธุ์ EC1118 (ประมาณ 58 U/mg) สารกลุ่ม flavonoids อาจอยู่ในรูปอิสระหรือสร้างพันธะ ester กับสารกลุ่มที่ไม่ใช่ flavonoids หรือ กลุ่มน้ำตาล (Zoecklein et al., 1995) เอนไซม์ β -D-glucosidase ในยีสต์อาจตัดโมเลกุลที่เกาะกับน้ำตาลออกได้เป็น epicatechin และ catechin อิสระ ดังนั้น เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase ที่สูงในยีสต์สายพันธุ์ K1V1116 และ CY3079 ทำให้ตรวจพบสารประกอบในกลุ่ม flavonoids ทั้ง 2 ชนิดในปริมาณสูง

หลังจากวันที่ 6 ของการหมัก พบปริมาณ epicatechin และ catechin ลดลง ผลที่ได้นี้ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Burn et al. (2001) ซึ่งพบว่าปริมาณ flavan-3-ols เพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงวันที่ 7 ของการหมัก และค่อยๆลดลงหลังจากนั้น ซึ่งอาจเนื่องมาจากการเกิด copigmentation ของอนุพันธ์ flavan-3-ol กับสาร anthocyanins ในไวน์ หรือ เกิดจากการดูดซับโดยผนังของเซลล์ยีสต์ (Escribano-Bailon et al., 1996; Razmkhab et al., 2002)

เมื่อสิ้นสุดการหมัก ปริมาณ epicatechin และ catechin ที่พบในไวน์ Exotic มีปริมาณน้อยกว่าในไวน์ Shiraz อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ปริมาณ catechin ในไวน์จะพบในปริมาณมากกว่า epicatechin ในทุกการทดลอง ซึ่งคล้ายกับผลของ Burn et al. (2001) ซึ่งพบว่าปริมาณ catechin ในไวน์แดงมีปริมาณมากกว่า epicatechin ถึงสองเท่า สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ต่อปริมาณ epicatechin และ catechin ในไวน์ทั้ง 2 สายพันธุ์ นอกจากนั้นพบว่า การเติม *trans-resveratrol* ลงไปไม่มีผลต่อปริมาณ epicatechin และ catechin ในไวน์ทั้ง 2 สายพันธุ์เช่นกัน

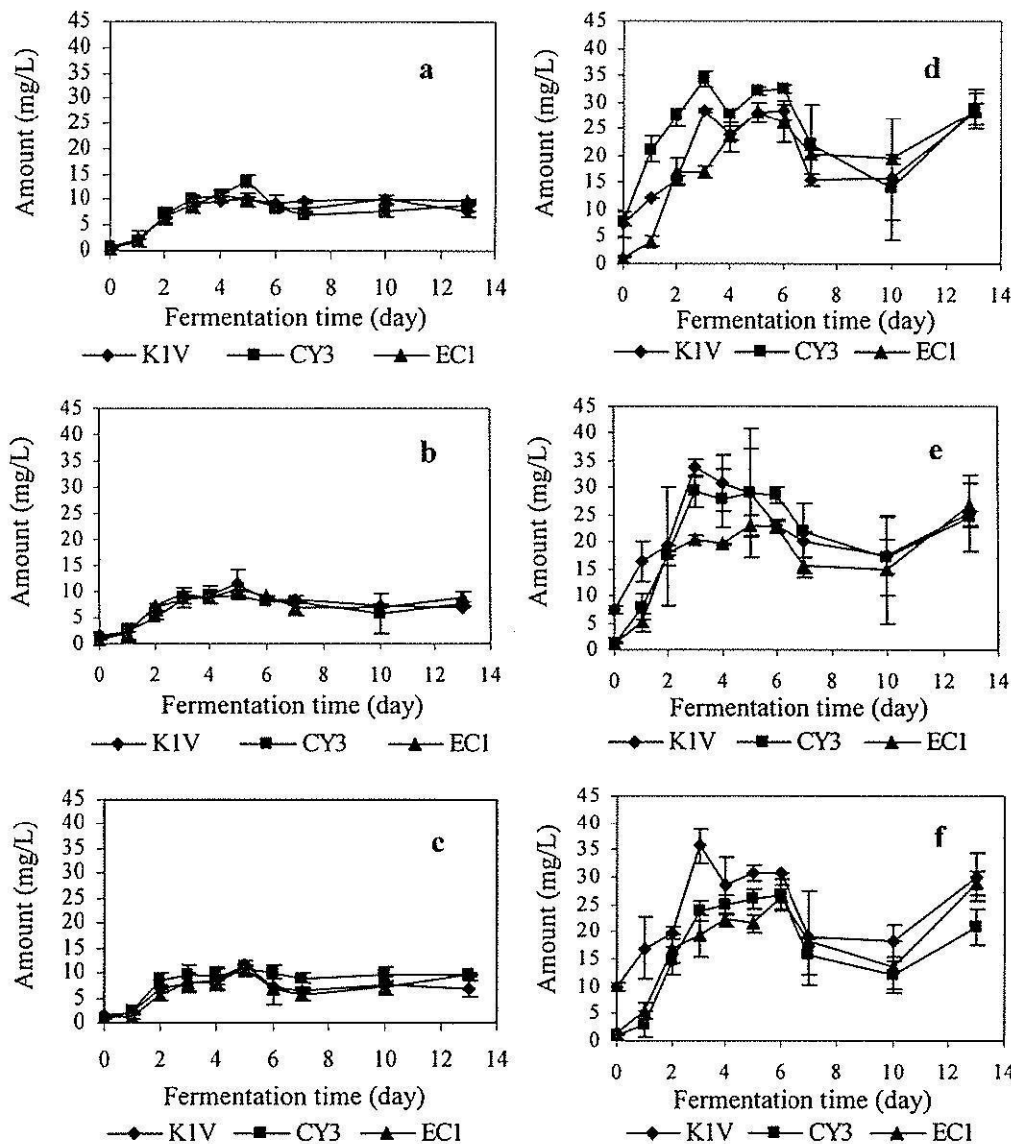


Figure 4.4 Changes of epicatechin during alcoholic fermentation of Exotic wine: a = Resv 0 ppm, b = Resv 5 ppm and c = Resv 10 ppm and Shiraz wine: d = Resv 0 ppm, e = Resv 5 ppm and f = Resv 10 ppm.

สารประกอบกลุ่ม flavonol ในไวน์ที่ไม่มีการเติม *trans-resveratrol* ไม่พบปริมาณ quercetin ใน must ขององุ่นทั้ง 2 สายพันธุ์ในวันแรกของการหมัก (Figure 4.6) quercetin เป็นสารที่มีคุณสมบัติชอบไขมัน (hydrophobic) จึงไม่ค่อยพบในน้ำองุ่น ดังนั้นปริมาณของสารนี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการผลิตแอลกอฮอล์เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก ปริมาณที่พบมากที่สุดในวันที่ 5 ของการหมักทั้งในไวน์ Exotic และไวน์ Shiraz (ประมาณ 3.16 และ 2.14 mg/l ตามลำดับ) (Figure 4.4a, 4.4d) ในไวน์ Exotic ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ของปริมาณ quercetin ในไวน์ที่ผลิตจากยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ขณะที่ไวน์ Shiraz ที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ CY3079 มีปริมาณ quercetin มากกว่ายีสต์

2 สายพันธุ์ ปริมาณของ quercetin เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 5 และลดลงหลังจากนั้น ผลที่ได้นี้คล้ายกับการทดลองของ Burn et al. (2001) ซึ่งพบว่าปริมาณ quercetin อิสระพบมากที่สุดในวันที่ 6 ของการหมัก และคงที่จนกระทั่งถึงวันที่ 9 ของการหมัก ในวันสุดท้ายของการหมัก ปริมาณ quercetin ที่ตรวจพบในไวน์ Exotic อยู่ในช่วง 1.04 – 1.93 mg/l และ ไวน์ Shiraz 1.51 – 2.65 mg/l นอกจากนี้พบว่า การเติม *trans-resveratrol* ไม่มีผลต่อปริมาณ quercetin ในไวน์ทั้ง 2 สายพันธุ์

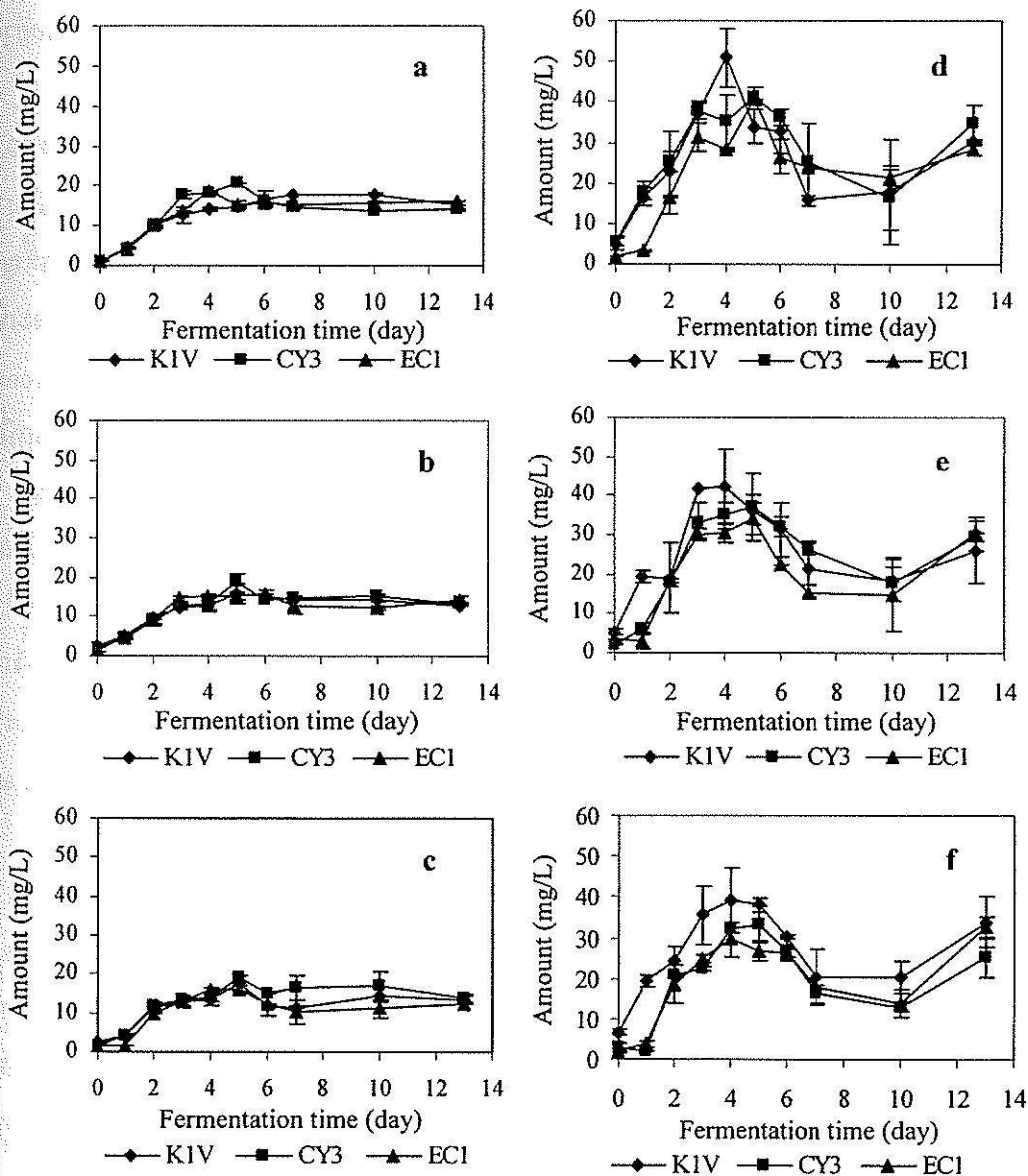


Figure 4.5 Changes of catechin during alcoholic fermentation of Exotic wine: a = Resv 0 ppm, b = Resv 5 ppm and c = Resv 10 ppm and Shiraz wine: d = Resv 0 ppm, e = Resv 5 ppm and f = Resv 10 ppm.

สารประกอบกลุ่ม hydroxybenzoic acid ในไวน์ที่ไม่มีการเติม *trans-resveratrol* ไวน์ Exotic มีปริมาณ syringic และ gallic acid น้อยกว่าไวน์ Shiraz (Figure 4.7a, 4.7d และ 4.8a, 4.8d) สายพันธุ์ยีสต์ไม่มีผลต่อปริมาณ syringic acid ในไวน์ทั้ง 2 สายพันธุ์ (Figure 4.7a, 4.7d) ในไวน์ Exotic ปริมาณ syringic acid เพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงวันที่ 2 ของการหมัก จาก 1.61 ถึง 4.29 mg/l เมื่อสิ้นสุดการหมัก ปริมาณ syringic acid ที่พบในยีสต์สายพันธุ์ EC1118 (3.05 mg/l) พบปริมาณมากกว่าในยีสต์สายพันธุ์ KIV1116 (1.71 mg/l) และ CY3079 (1.96 mg/l) สำหรับไวน์ Shiraz พบว่าปริมาณ syringic acid เพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงวันที่ 2 ของการหมัก จาก 1.59 ถึง 4.62 mg/l ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ของปริมาณ syringic acid ในไวน์ที่ผลิตจากยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์

ปริมาณ gallic acid เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนกระทั่งถึงวันที่ 2 ของการหมัก จาก 1.74 ถึง 10.14 mg/l ในไวน์ Exotic (Figure 4.8a) และ 2.76 ถึง 16.40 mg/l ในไวน์ Shiraz (Figure 4.8d) ปริมาณ gallic acid ในไวน์ Exotic พบปริมาณน้อยกว่าในไวน์ Shiraz ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ของปริมาณ gallic acid ในไวน์ที่ผลิตจากยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ gallic acid ที่พบน่าจะเป็นเพราะว่าสาร phenolic acid นี้เป็นรูปแบบตั้งต้นที่เกิดจากกระบวนการ hydrolysis ของ flavonoid gallate ester ในระหว่างกระบวนการหมักรวมทั้งเปลือกองุ่น (Frankel et al., 1995) นอกจากนี้ยังพบว่า การเติม *trans-resveratrol* ไม่มีผลต่อปริมาณ syringic และ gallic acid ในไวน์ทั้ง 2 สายพันธุ์

สารประกอบกลุ่ม hydroxycinnamic acid ไม่พบ cinnamic acid ใน must ขององุ่นทั้ง 2 สายพันธุ์ (Figure 4.9) ในไวน์ที่ไม่มีการเติม *trans-resveratrol* จะพบปริมาณ cinnamic acid ในไวน์ Exotic ในวันที่ 3 ของการหมักที่ระดับ 2.05 mg/l (Figure 4.9a) และ ในไวน์ Shiraz ในวันที่ 2 ของการหมักที่ระดับ 1.95 mg/l (Figure 4.9d) ปริมาณ cinnamic acid ลดลงหลังจากวันที่ 6 – 7 ของการหมักจนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก ในวันสุดท้ายของการหมักไม่พบความแตกต่างของปริมาณ cinnamic acid ในไวน์ที่ผลิตจากยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์

ปริมาณ *p*-coumaric acid ในไวน์ Exotic เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันแรกของการหมักจาก 1.05 ถึง 5.91 mg/l (Figure 4.10a) ส่วนในไวน์ Shiraz เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 ของการหมัก จาก 1.10 ถึง 5.77 mg/l (Figure 4.10d) หลังจากนั้นปริมาณจะคงที่ในไวน์ Exotic ส่วนไวน์ Shiraz จะลดลงเล็กน้อยจนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก เมื่อสิ้นสุดการหมัก ในไวน์ Exotic ปริมาณ *p*-coumaric acid ที่พบในไวน์ที่ผลิตจากยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่แตกต่างกัน ส่วนในไวน์ Shiraz ที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ CY3079 (3.35 mg/l) มีปริมาณ *p*-coumaric acid มากกว่า KIV1116 (2.96 mg/l) และ EC1118 (2.94 mg/l) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

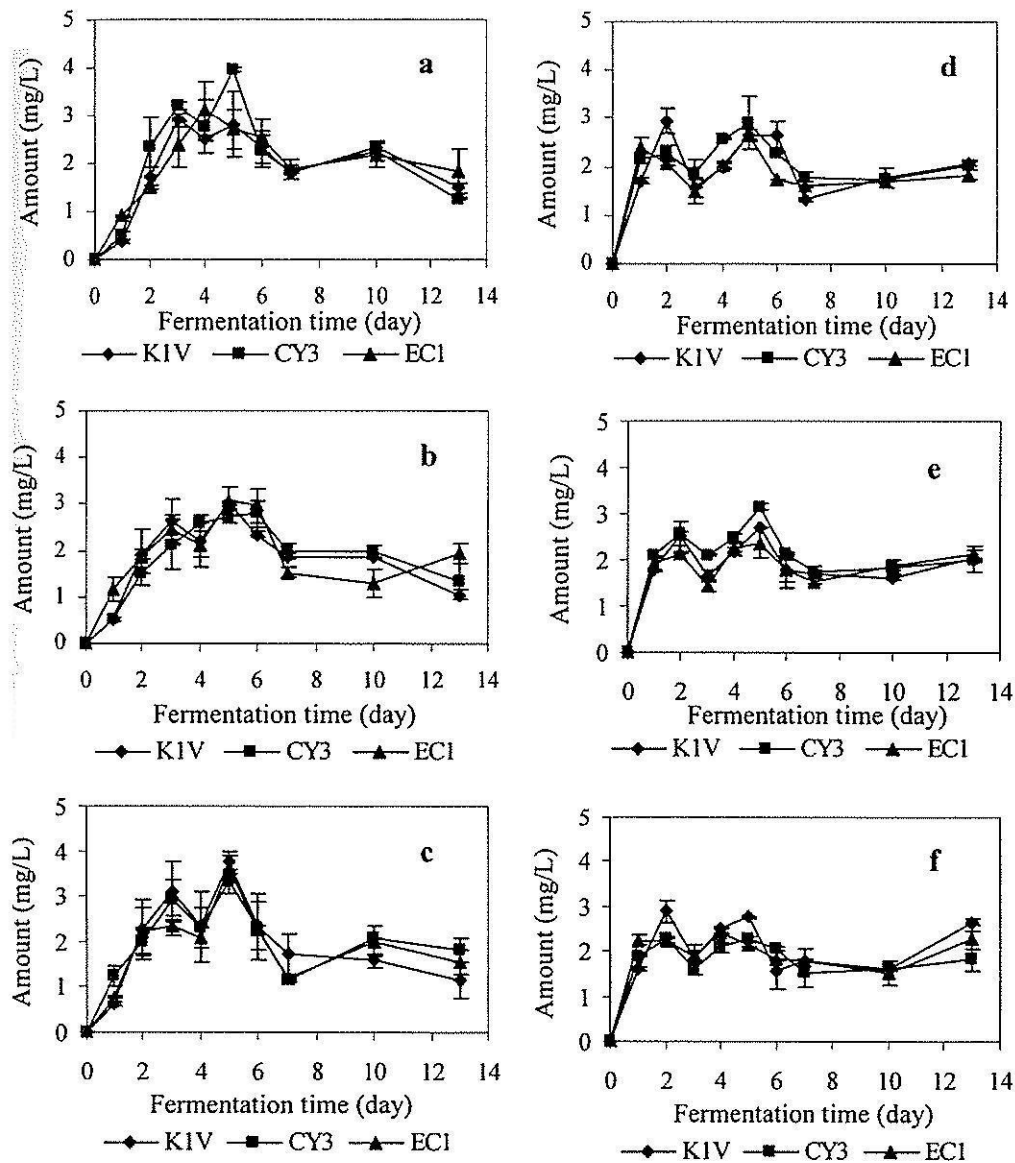


Figure 4.6 Changes of quercetin during alcoholic fermentation of Exotic wine:

a = Resv 0 ppm, b = Resv 5 ppm and c = Resv 10 ppm and Shiraz wine: d = Resv 0 ppm,

e = Resv 5 ppm and f = Resv 10 ppm.

การเพิ่มขึ้นของทั้ง cinnamic และ *p*-coumaric acid ระหว่างหมักแอลกอฮอล์ เนื่องจากอนุพันธ์ของ hydroxycinnamic acid เช่น caffeic หรือ acylated phenol ถูก hydrolyzed หลายรูปแบบได้เป็น cinnamic acid อิสระ (Zoecklein et al., 1995) free hydroxycinnamic acid อาจถูกออกซิไดซ์ต่อไปได้ volatile phenols โดยเอนไซม์ decarboxylase ในยีสต์ (Cillier and Singleton 1989; Chatonnet et al., 1993) หรือ ถูกดูดซับโดยยีสต์ (Somers et al., 1987) ปฏิกริยานี้อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ปริมาณของสารเหล่านี้ลดลงหลังจากวันที่ 5 ของการหมัก นอกจากนั้น Eiro and Heinonen (2002) รายงานว่า การลดลงของสารอาจเนื่องมาจากเกิด copigment กับ anthocyanins

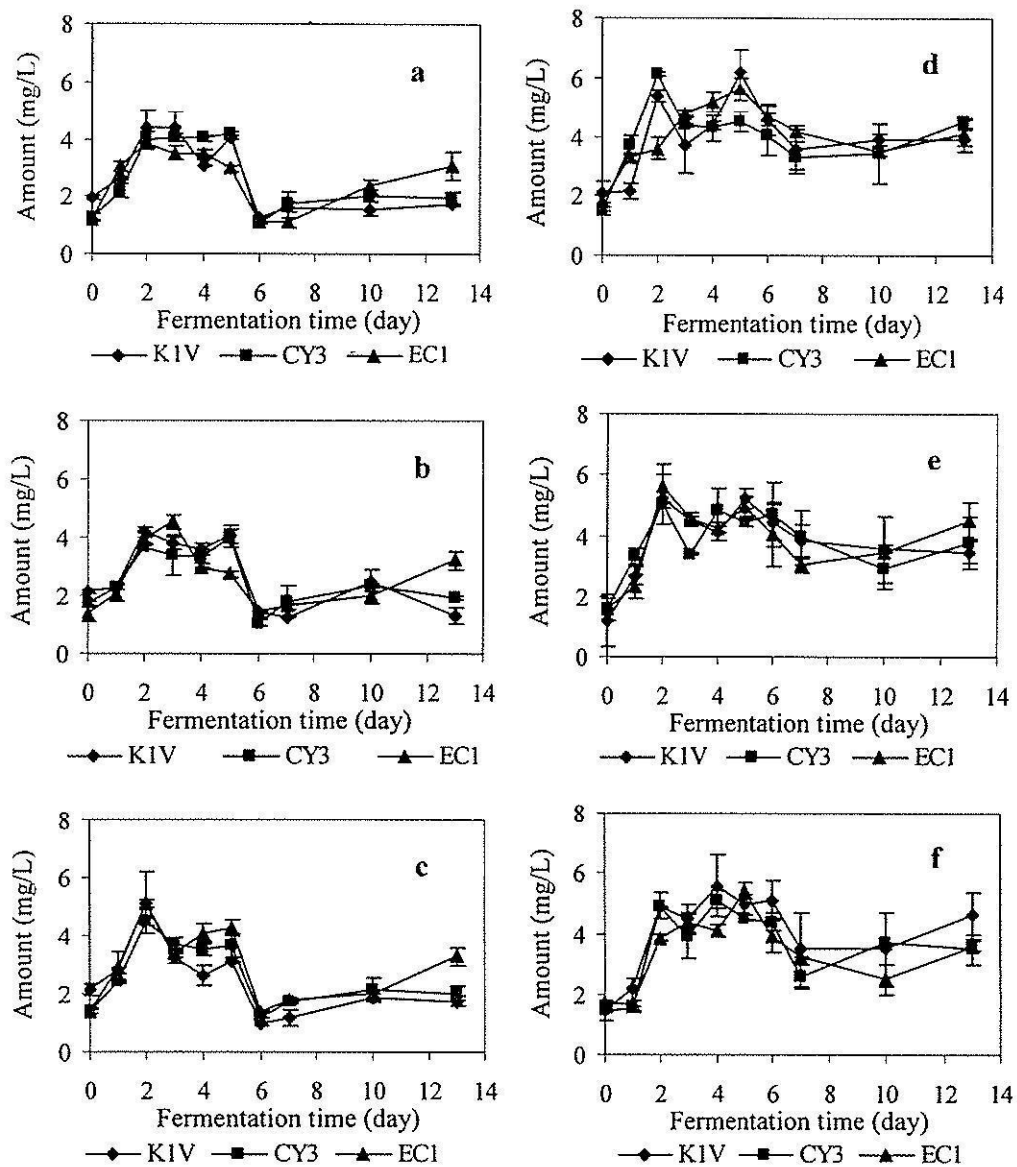


Figure 4.7 Changes of syringic acid during alcoholic fermentation of Exotic wine:

a = Resv 0 ppm, b = Resv 5 ppm and c = Resv 10 ppm and Shiraz wine: d = Resv 0 ppm, e = Resv 5 ppm and f = Resv 10 ppm.

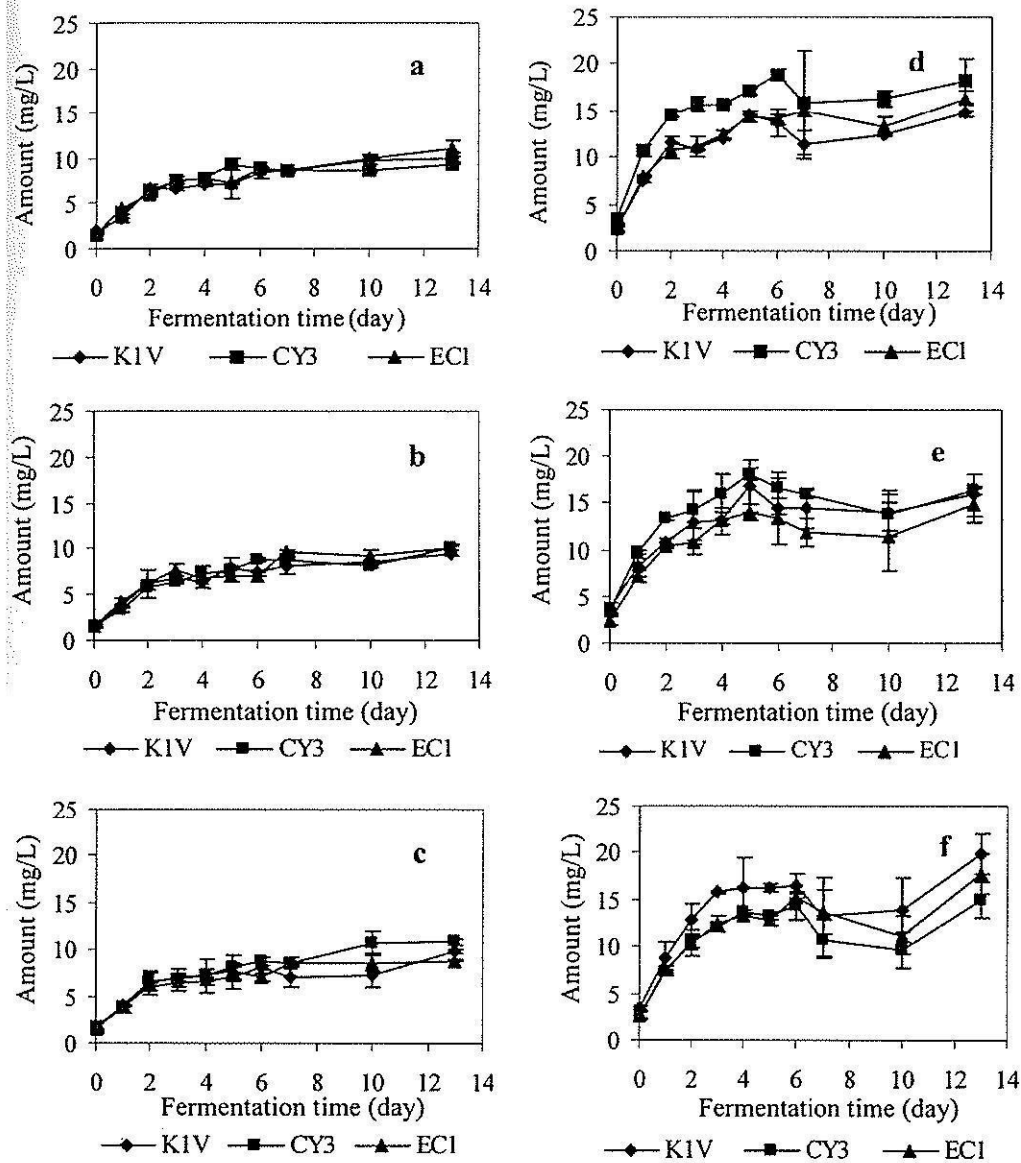


Figure 4.8 Changes of gallic acid during alcoholic fermentation of Exotic wine:

a = Resv 0 ppm, b = Resv 5 ppm and c = Resv 10 ppm and Shiraz wine: d = Resv 0 ppm,

e = Resv 5 ppm and f = Resv 10 ppm.

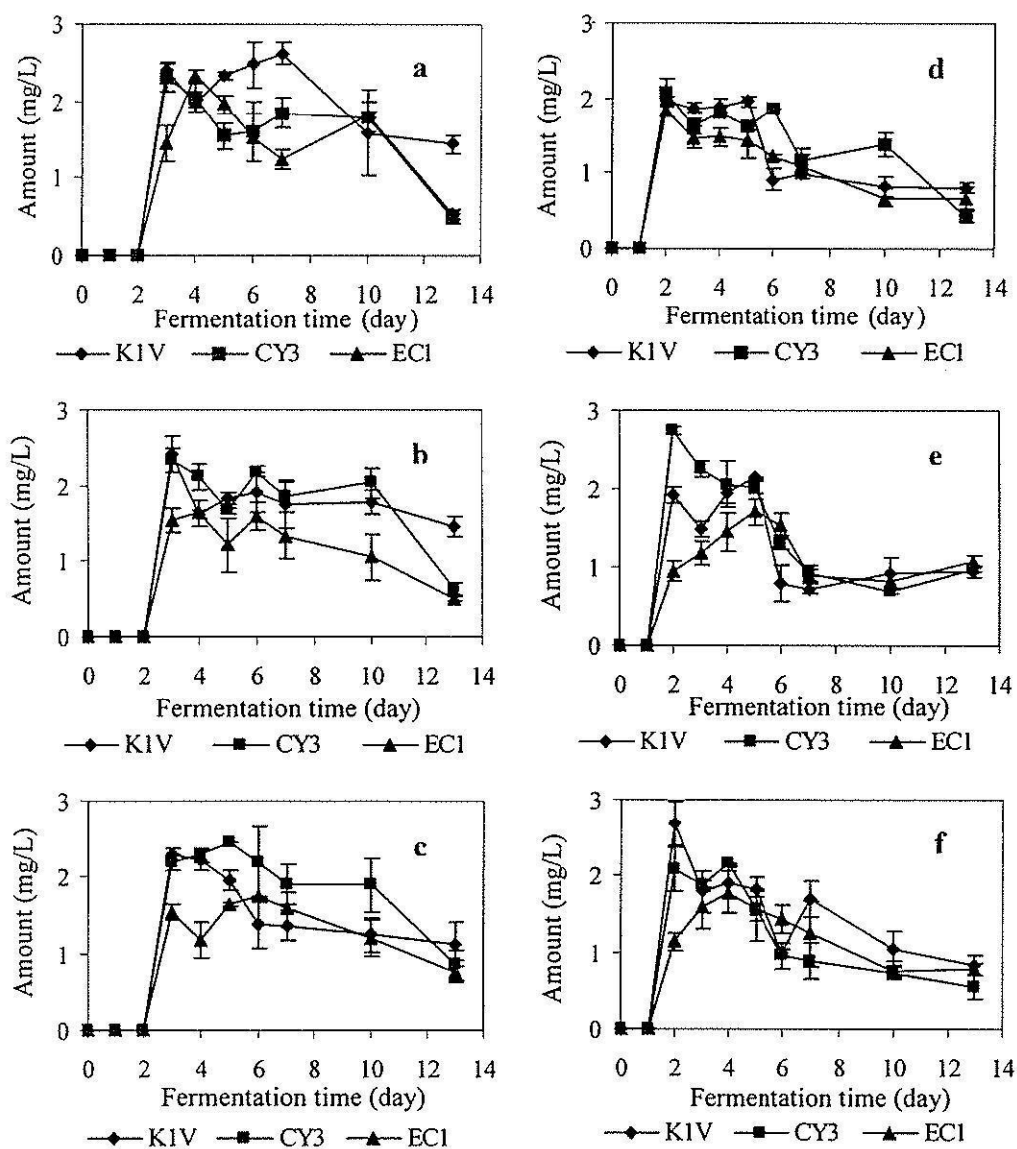


Figure 4.9 Changes of cinnamic acid during alcoholic fermentation of Exotic wine:

a = Resv 0 ppm, b = Resv 5 ppm and c = Resv 10 ppm and Shiraz wine: d = Resv 0 ppm, e = Resv 5 ppm and f = Resv 10 ppm.

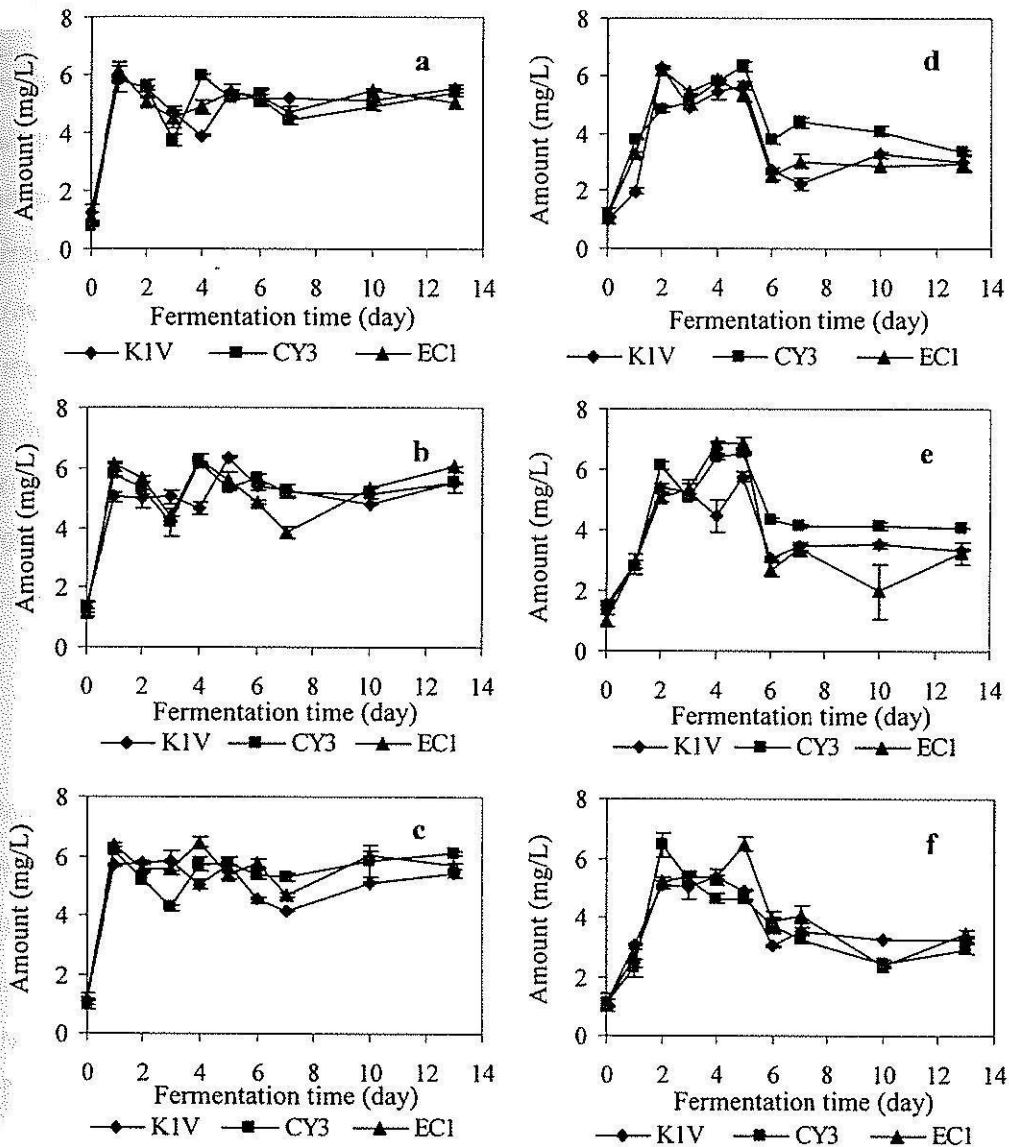


Figure 4.10 Changes of *p*-coumaric acid during alcoholic fermentation of Exotic wine: a = Resv 0 ppm, b = Resv 5 ppm and c = Resv 10 ppm and Shiraz wine: d = Resv 0 ppm, e = Resv 5 ppm and f = Resv 10 ppm.

4.4.3 การหมักมาโลแลคติก (Malolactic Fermentation)

การเปลี่ยนแปลงปริมาณ *trans*-resveratrol

Table 4.2 แสดงปริมาณ *trans*-resveratrol ก่อนและหลังกระบวนการหมัก MLF โดยใช้ lactic acid bacteria, *Oenococcus oeni* พบปริมาณ *trans*-resveratrol เพิ่มขึ้นหลังจากทำการหมัก MLF ในการ

หมักไวน์ที่ไม่มีการเติม *trans-resveratrol* ว่าไวน์ Exotic ที่ผลิตจากยีสต์ CY3079 และ ไวน์ Shiraz ที่ผลิตจากยีสต์ K1V1116 พบการเพิ่มขึ้นของ *trans-resveratrol* มากกว่าการทดลองอื่น

ในไวน์ที่เติม *trans-resveratrol* บริสุทธิ์ 5 ppm พบการเพิ่มขึ้นของ *trans-resveratrol* เฉลี่ยจาก 0.90 เป็น 1.49 mg/l ในไวน์ Exotic และ จาก 0.76 เป็น 0.80 mg/l ในไวน์ Shiraz ในไวน์ที่เติม *trans-resveratrol* บริสุทธิ์ 10 ppm พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณ *trans-resveratrol* มากที่สุดในไวน์ Exotic ที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ CY3079 จาก 1.22 เป็น 3.14 mg/l และ ไวน์ Shiraz ที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ EC1118 จาก 1.07 เป็น 1.49 mg/l การทดลองนี้คล้ายกับการทดลองของ Pezet and Cuenat (1996) ซึ่งพบการเพิ่มขึ้นของ *trans-resveratrol* ในไวน์จากองุ่นสายพันธุ์ Gamay หลังจากทำการหมัก malolactic ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากการที่สารอยู่ในรูป glucoside หรือ oligomeric ที่มีอยู่ถูกตัดโดยกิจกรรมของเอนไซม์ของ malolactic bacteria นอกจากนี้ Grimaldi et al. (2002) รายงานกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase ใน *Oenococcus oeni* (lactic acid bacteria) และ Alexandre et al. (2004) พบกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase, α -glucosidase และ N-acetyl- β -glucosaminidase ซึ่งอาจจะเปลี่ยนจากรูป glucoside หรือ oligomeric เป็น free isomer ของ resveratrol

การเปลี่ยนแปลงปริมาณ total phenolic content และสารกลุ่ม flavonoids

ในไวน์ที่ไม่มีการเติม *trans-resveratrol* ปริมาณ TPC ในไวน์ทั้ง 2 ชนิด หลังจากหมัก MLF ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (Table 4.2) อย่างไรก็ตามปริมาณ TPC จะลดลงเล็กน้อยหลังกระบวนการหมัก MLF เมื่อปริมาณของสารสูงมาก น่าจะเกิด copigmentation และ condensation ของสาร phenolic ทำให้ปริมาณที่ตรวจพบลดลง ในไวน์ Exotic ปริมาณ epicatechin ที่พบหลังจากหมักไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ส่วนปริมาณ catechin พบว่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) หลังจากหมัก จากค่าเฉลี่ย 15.08 ถึง 21.66 mg/l ผลที่ได้นี้คล้ายกับงานวิจัยของ Hernandez et al. (2005) ซึ่งพบการเพิ่มขึ้นทั้งปริมาณ epicatechin และ catechin หลังหมัก MLF ในทางตรงข้าม ไวน์ Shiraz พบการลดลงทั้ง epicatechin และ catechin อาจเนื่องมาจากหลังการหมัก ALF มีปริมาณของทั้ง epicatechin และ catechin ในปริมาณสูง ดังนั้นจึงอาจเกิดการรวมตัวกันและเกิด copigment ขึ้น และตกตะกอนลงมา นอกจากนี้ quercetin พบปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) หลังการหมักในไวน์ทั้ง 2 ชนิด การมีกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase ของ *O. oeni* เป็นปัจจัยที่ทำให้เกิด hydrolysis ของ quercetin glucoside ได้เป็น free quercetin (ETS laboratories, 2006) นอกจากนี้พบว่า การทดลองที่มีการเติม *trans-resveratrol* (Table 4.3, 4.4) ลงไปได้ผลการเปลี่ยนแปลงของสารคล้ายกับการทดลองที่ไม่เติม *trans-resveratrol*

Table 4.2 The TPC and monomeric flavonoid content (mg/l) of wine without added *trans*-resveratrol before and after MLF

Phenols	Before MLF			After MLF		
	KIV1116	CY3079	EC1118	KIV1116	CY3079	EC1118
Exotic						
TPC	2829.21 ± 112.03 ab	2775.06 ± 89.34 ab	2983.63 ± 199.56 a	2629.42 ± 67.18 b	2754.49 ± 106.94 ab	2743.82 ± 141.22 ab
Epicatechin	7.92 ± 1.00 b	8.52 ± 0.34 ab	9.68 ± 0.15a	7.92 ± 0.17 b	9.18 ± 0.13 ab	8.69 ± 0.74 ab
Catechin	15.14 ± 0.20 b	13.88 ± 0.19 b	16.23 ± 0.01 b	20.31 ± 0.73 a	23.64 ± 0.93 a	21.03 ± 3.05 a
Quercetin	1.54 ± 0.03 e	1.26 ± 0.02 f	2.11 ± 0.06 d	3.99 ± 0.20 b	4.38 ± 0.09 a	3.68 ± 0.16 c
Shiraz						
TPC	2397.08 ± 70.74 cd	2632.74 ± 112.91 bc	2343.21 ± 163.24 d	2549.28 ± 36.36 bcd	2896.38 ± 106.05 a	2701.40 ± 6.06 ab
Epicatechin	28.50 ± 0.82 b	35.67 ± 0.33a	33.19 ± 0.60 a	20.98 ± 0.32 d	24.12 ± 1.35 c	26.65 ± 2.36 bc
Catechin	29.21 ± 0.76 b	38.52 ± 0.78 a	34.75 ± 3.57 a	23.17 ± 0.96 c	29.73 ± 2.61 b	28.12 ± 0.72 b
Quercetin	1.72 ± 0.04 c	1.89 ± 0.18 bc	1.82 ± 0.10 c	2.04 ± 0.07 bc	2.55 ± 0.20 a	2.24 ± 0.18 ab

Numbers with different letters within the same row are significantly different ($p < 0.05$).

Table 4.3 The TPC and monomeric flavonoid content (mg/l) of wine with added 5 ppm trans-resveratrol before and after MLF

Phenols	Before MLF			After MLF		
	KIV1116	CY3079	EC1118	KIV1116	CY3079	EC1118
Exotic						
TPC	2604.59 ± 146.07 abc	2784.08 ± 8.51 ab	2818.18 ± 164.50 a	2430.68 ± 112.43 c	2593.55 ± 46.62 abc	2499.52 ± 154.93 bc
Epicatechin	6.87 ± 0.13 b	6.94 ± 0.39 b	9.33 ± 0.37 a	8.93 ± 0.39 a	6.89 ± 0.52 b	6.64 ± 0.48 b
Catechin	12.55 ± 0.71 c	12.85 ± 0.10 c	14.07 ± 0.94 bc	20.35 ± 0.96 a	15.92 ± 0.63 b	13.41 ± 1.50 c
Quercetin	1.02 ± 0.06 d	1.13 ± 0.09 d	1.93 ± 0.23 c	3.75 ± 0.18 a	3.27 ± 0.01 b	3.38 ± 0.16 b
Shiraz						
TPC	2595.23 ± 68.02 ab	2697.19 ± 92.50 a	2102.73 ± 10.88 c	2753.90 ± 253.01 a	2930.66 ± 181.81 a	2312.52 ± 7.58 bc
Epicatechin	27.91 ± 1.32 ab	31.24 ± 1.14 a	28.87 ± 1.48 ab	27.46 ± 3.04 ab	26.28 ± 1.48 b	24.24 ± 1.72 b
Catechin	28.14 ± 2.06 abc	32.88 ± 2.00 a	32.34 ± 1.50 ab	27.57 ± 3.07 bc	28.51 ± 1.03 abc	25.28 ± 0.05 c
Quercetin	2.06 ± 0.31 ab	1.83 ± 0.32 b	1.73 ± 0.08 b	2.62 ± 0.01 a	2.22 ± 0.14 ab	1.95 ± 0.35 b

Numbers with different letters within the same row are significantly different ($p < 0.05$).

Table 4.4 The TPC and monomeric flavonoid content (mg/l) of wine with added 10 ppm *trans*-resveratrol before and after MLF

Phenols	Before MLF			After MLF		
	K1V1116	CY3079	EC1118	K1V1116	CY3079	EC1118
Exotic						
TPC	2554.45 ± 148.90 a	2760.02 ± 201.37 a	2740.96 ± 55.31 a	2425.83 ± 122.02 a	2581.92 ± 265.98 a	2572.23 ± 142.59 a
Epicatechin	7.50 ± 0.58 d	9.17 ± 0.18 ab	9.88 ± 0.08 a	7.19 ± 0.15 d	8.34 ± 0.29 c	8.69 ± 0.24 bc
Catechin	13.61 ± 1.43 bc	13.89 ± 0.77 bc	12.87 ± 0.92 c	16.04 ± 0.18 b	20.99 ± 0.15 a	19.70 ± 1.51 a
Quercetin	0.86 ± 0.01 d	1.70 ± 0.17 c	1.79 ± 0.10 c	3.61 ± 0.10 b	4.06 ± 0.15 a	4.33 ± 0.14 a
Shiraz						
TPC	2676.99 ± 180.92 ab	2265.29 ± 82.98 c	2267.22 ± 39.45 c	2827.82 ± 251.50 a	2355.37 ± 92.42 bc	2481.79 ± 34.85 abc
Epicatechin	41.36 ± 2.13 a	28.48 ± 2.57 b	30.08 ± 0.40 b	27.66 ± 0.14 b	26.58 ± 3.22 b	26.15 ± 0.67 b
Catechin	42.33 ± 3.17 a	32.82 ± 1.14 b	33.41 ± 1.21 b	28.16 ± 1.21 c	28.88 ± 0.87 c	27.16 ± 0.62 c
Quercetin	1.72 ± 0.24 c	1.65 ± 0.02 c	1.92 ± 0.03 bc	2.17 ± 0.10 ab	2.32 ± 0.14 a	2.39 ± 0.02 a

Numbers with different letters within the same row are significantly different ($p < 0.05$).

การเปลี่ยนแปลงปริมาณ phenolic acids โมเลกุลขนาดเล็ก

การเปลี่ยนแปลงปริมาณ phenolic acid ในไวน์ทั้ง 2 สายพันธุ์แสดงใน Table 4.5, 4.6 และ 4.7 ในไวน์ที่ไม่มีการเติม *trans-resveratrol* ไวน์ Exotic พบว่าปริมาณ syringic acid เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) หลังการหมัก จาก 2.16 ถึง 4.38 mg/l (Table 4.5) gentisic *p*-hydroxybenzoic, salicylic protocatechuic และ caffeic acid ไม่พบในไวน์ก่อนการหมัก MLF แต่ตรวจพบสารดังกล่าวในไวน์หลังจากหมัก

สำหรับไวน์ Shiraz ไม่พบปริมาณ gentisic และ salicylic ทั้งก่อนและหลังการหมัก ปริมาณ *p*-hydroxybenzoic คงที่ ส่วน protocatechuic และ caffeic acid ตรวจพบหลังการหมัก ปริมาณ cinnamic acid เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) caffeic acid ที่เกิดขึ้น อาจได้มาจาก hydrolysis ของสาร cinnamoyl-glucoside anthocyanin (Monagas et al., 2005) รวมถึงมาจากอนุพันธ์ของ hydroxycinnamic อื่นๆ ที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ใน lactic acid bacteria (Hernandez et al., 2006) นอกจากนั้นพบว่า การทดลองที่มีการเติม *trans-resveratrol* ได้ผลการเปลี่ยนแปลงของสารคล้ายกับการทดลองที่ไม่เติม *trans-resveratrol*

4.4.4 การเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการบ่มไวน์

การเปลี่ยนแปลง total phenolic content, *trans-resveratrol* และ flavonoids

เพื่อให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของ *trans-resveratrol* อย่างชัดเจนระหว่างกระบวนการบ่มไวน์ จึงนำเสนอเฉพาะไวน์ที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ CY3079 และมีการเติม *trans-resveratrol* บริสุทธิ์ก่อนการหมัก (พบปริมาณ *trans-resveratrol* มากที่สุด) ระหว่างกระบวนการหมัก ปริมาณ TPC, *trans-resveratrol*, epicatechin, catechin และ quercetin ในไวน์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีปริมาณลดลงตามเวลาที่บ่ม (Table 4.8) ปริมาณ TPC ในไวน์ Exotic ลดลงเล็กน้อยในระหว่างกระบวนการบ่ม และในไวน์ Shiraz พบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนั้นยังพบการลดลงของ *trans-resveratrol* ในไวน์ Exotic จาก 2.43 เหลือ 0.75 mg/l และไวน์ Shiraz จาก 1.06 เหลือ 0.41 mg/l ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Soleas et al. (1997) ซึ่งพบว่าระหว่างการหมักไวน์ Ontario มีการสูญเสียปริมาณ *trans-resveratrol* ถึง 68 เปอร์เซ็นต์

ปริมาณ epicatechin และ catechin ในไวน์ Exotic มีการลดลงเล็กน้อย ในขณะที่ไวน์ Shiraz มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ตั้งแต่เดือนแรกของการหมัก และค่อยๆ ลดลง ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Gomez-Plaza et al. (1999) ซึ่งพบว่าระดับของ epicatechin และ catechin ลดลงตามเวลา สารในกลุ่ม flavan-3-ol อาจเกิด oxidation และ polymerization (Singleton and Esau, 1969) และอาจเกี่ยวข้องในการเกิด condensation กับ anthocyanin (Timberlake and Bridle, 1976)

Table 4.5 Phenolic acid content (mg/l) of wine without added trans-resveratrol before and after MLF

Phenolic acid	Before MLF			After MLF		
	K1V1116	CY3079	EC1118	K1V1116	CY3079	EC1118
Exotic						
Syringic	1.71 ± 0.20 c	1.88 ± 0.02 c	2.90 ± 0.29 b	4.11 ± 0.04 a	4.43 ± 0.04 a	4.59 ± 0.45 a
Gentisic	ND	ND	ND	0.67 ± 0.07 a	0.70 ± 0.03 a	0.57 ± 0.17 a
p-Hydroxybenzoic	ND	ND	ND	0.90 ± 0.28 a	0.73 ± 0.05 a	1.01 ± 0.05 a
Salicyclic	ND	ND	ND	0.73 ± 0.04 a	0.71 ± 0.01 a	0.73 ± 0.03 a
Galic	10.13 ± 0.34 de	9.62 ± 0.27 e	11.37 ± 0.43 bc	10.76 ± 0.15 cd	12.40 ± 0.20 a	11.88 ± 0.56 ab
Protocatechuic	ND	ND	ND	1.20 ± 0.03 a	0.82 ± 0.03 b	1.15 ± 0.07 a
Cinnamic	1.50 ± 0.04 a	0.45 ± 0.04 d	0.53 ± 0.07 cd	1.16 ± 0.01 b	1.28 ± 0.11 b	0.69 ± 0.09 c
p-Coumaric	5.54 ± 0.14 a	4.69 ± 0.11 bc	5.04 ± 0.22 b	4.56 ± 0.27 c	4.34 ± 0.16 c	4.44 ± 0.08 c
Caffeic	ND	ND	ND	4.22 ± 0.13 b	6.24 ± 0.10 a	ND
Shiraz						
Syringic	2.31 ± 0.06 c	3.34 ± 0.31 b	3.69 ± 0.11 b	4.48 ± 0.01 a	3.73 ± 0.37 b	3.66 ± 0.24 b
Gentisic	ND	ND	ND	ND	ND	ND
p-Hydroxybenzoic	0.67 ± 0.06 a	0.61 ± 0.01 a	0.63 ± 0.04 a	0.74 ± 0.05 a	0.75 ± 0.36 a	0.72 ± 0.01 a
Salicyclic	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Galic	14.37 ± 0.77 d	19.21 ± 0.17 b	18.76 ± 0.53 b	17.09 ± 0.41 c	22.05 ± 0.03 a	19.31 ± 0.22 b
Protocatechuic	ND	ND	ND	1.05 ± 0.08 a	1.07 ± 0.05 a	1.15 ± 0.13 a
Cinnamic	0.63 ± 0.05 c	0.84 ± 0.14 c	0.89 ± 0.10 c	2.24 ± 0.14 ab	2.58 ± 0.22 a	2.20 ± 0.15 b
p-Coumaric	2.43 ± 0.03 b	2.85 ± 0.40 ab	2.45 ± 0.30 b	2.42 ± 0.24 b	3.38 ± 0.15 a	2.26 ± 0.10 b
Caffeic	ND	ND	ND	1.46 ± 0.14 b	1.64 ± 0.02 a	1.56 ± 0.06 ab

Numbers with different letters within the same row are significantly different ($p < 0.05$).

Table 4.6 Phenolic acid content (mg/l) of wine with added 5 ppm trans-resveratrol before and after MLF

Phenolic acid	Before MLF		After MLF	
	K1V1116	CY3079	K1V1116	EC1118
Exotic				
Syringic	1.54 ± 0.20 b	1.87 ± 0.01 b	4.53 ± 0.10 a	4.85 ± 0.69 a
Gentisic	ND	ND	0.72 ± 0.06 a	0.69 ± 0.03 a
<i>p</i> -hydroxybenzoic	ND	ND	0.66 ± 0.04 a	0.68 ± 0.02 a
Salicylic	ND	ND	0.69 ± 0.04 b	0.83 ± 0.06 a
Gallie	9.59 ± 0.15 c	10.33 ± 0.15 abc	10.89 ± 0.54 ab	11.14 ± 0.73 a
Protocatechuic	ND	ND	1.01 ± 0.01 a	1.07 ± 0.02 a
Cinnamic	1.64 ± 0.10 a	0.84 ± 0.04 b	0.95 ± 0.05 b	0.93 ± 0.07 b
<i>p</i> -Coumaric	5.53 ± 0.01 a	5.48 ± 0.01 ab	5.14 ± 0.01 b	3.35 ± 0.11 d
Caffeic	ND	ND	4.33 ± 0.17 a	ND
Shiraz				
Syringic	2.86 ± 0.01 c	3.64 ± 0.04 b	4.27 ± 0.09 a	3.68 ± 0.04 b
Gentisic	ND	ND	ND	ND
<i>p</i> -hydroxybenzoic	0.82 ± 0.06 a	0.71 ± 0.15 a	0.57 ± 0.05 a	0.60 ± 0.05 a
Salicylic	ND	ND	ND	ND
Gallie	13.34 ± 0.42 c	17.32 ± 1.63 ab	19.78 ± 0.96 a	18.38 ± 0.08 ab
Protocatechuic	ND	ND	20.11 ± 1.75 a	1.04 ± 0.15 a
Cinnamic	0.83 ± 0.12 c	1.49 ± 0.10 b	1.01 ± 0.08 a	1.91 ± 0.25 a
<i>p</i> -Coumaric	2.65 ± 0.22 ab	2.84 ± 0.30 a	1.84 ± 0.13 ab	2.20 ± 0.16 bc
Caffeic	ND	ND	2.10 ± 0.21 c	1.42 ± 0.21 a

Numbers with different letters within the same row are significantly different ($p < 0.05$).

Table 4.7 Phenolic acid content (mg/l) of wine with added 10 ppm *trans*-resveratrol before and after MLF

Phenolic acid	Before MLF		After MLF	
	K1V1116	CY3079	K1V1116	CY3079
Exotic	EC1118		EC1118	
Syringic	1.87 ± 0.15 d	2.99 ± 0.10 c	4.16 ± 0.03 b	4.44 ± 0.02 a
Gentisic	ND	ND	0.72 ± 0.07 a	0.75 ± 0.03 a
<i>p</i> -hydroxybenzoic	ND	ND	0.71 ± 0.10 b	0.71 ± 0.04 b
Salicylic	ND	ND	0.66 ± 0.02 b	0.70 ± 0.03 b
Galic	10.28 ± 0.34 cd	10.67 ± 0.44 bc	9.42 ± 0.21 de	11.72 ± 0.24 ab
Protocatechuic	ND	ND	1.02 ± 0.01 b	1.12 ± 0.09 a
Cinnamic	1.30 ± 0.52 ab	0.71 ± 0.01 bc	0.77 ± 0.08 abc	1.32 ± 0.02 a
<i>p</i> -Coumaric	6.08 ± 0.13 a	6.19 ± 0.17 a	4.54 ± 0.10 d	4.54 ± 0.07 d
Caffeic	ND	ND	3.87 ± 0.22 b	4.19 ± 0.19 a
Shiraz	ND		ND	
Syringic	3.95 ± 0.05 b	3.43 ± 0.32 b	3.89 ± 0.26 b	3.96 ± 0.28 b
Gentisic	ND	ND	ND	ND
<i>p</i> -hydroxybenzoic	0.59 ± 0.10 ab	0.69 ± 0.07 ab	0.52 ± 0.02 b	0.78 ± 0.08 a
Salicylic	ND	ND	ND	ND
Galic	19.49 ± 1.97 a	16.52 ± 0.05 b	19.56 ± 0.19 a	18.70 ± 1.30 ab
Protocatechuic	ND	ND	1.04 ± 0.01 a	1.09 ± 0.08 a
Cinnamic	1.08 ± 0.18 b	0.77 ± 0.12 b	1.74 ± 0.04 a	1.90 ± 0.22 a
<i>p</i> -Coumaric	3.10 ± 0.27 a	2.81 ± 0.13 ab	2.55 ± 0.05 b	2.50 ± 0.24 b
Caffeic	ND	ND	1.49 ± 0.16 a	1.38 ± 0.16 a

Numbers with different letters within the same row are significantly different ($p < 0.05$).

Table 4.8 The concentration of *trans*-resveratrol before and after MLF of wine with and without added *trans*-resveratrol

Resveratrol added	Before MLF			After MLF		
	KIV1116	CY3079	EC1118	KIV1116	CY3079	EC1118
Exotic						
+ 0 ppm	0.83 ± 0.23 bc	0.68 ± 0.07 bc	0.61 ± 0.05 c	0.74 ± 0.11 bc	1.48 ± 0.02a	0.92 ± 0.06 b
+ 5 ppm	1.06 ± 0.07 c	0.91 ± 0.01 cd	0.72 ± 0.05 d	1.74 ± 0.01 a	1.33 ± 0.21 b	1.41 ± 0.04 b
+ 10 ppm	1.46 ± 0.02 cd	1.22 ± 0.03 de	0.76 ± 0.14 e	1.84 ± 0.07 c	3.14 ± 0.39 a	2.33 ± 0.23 b
Shiraz						
+ 0 ppm	0.51 ± 0.19 ab	0.54 ± 0.10ab	0.71 ± 0.09 a	0.65 ± 0.01ab	0.46 ± 0.04 b	0.60 ± 0.02 a
+ 5 ppm	0.78 ± 0.14 b	0.80 ± 0.05 ab	0.70 ± 0.10 b	0.98 ± 0.01 a	0.72 ± 0.02 b	0.69 ± 0.02 b
+ 10 ppm	1.06 ± 0.07 ab	1.07 ± 0.11 ab	0.91 ± 0.07 b	1.18 ± 0.10 ab	1.49 ± 0.43 a	1.59 ± 0.18 a

Numbers with different letters within the same row are significantly different ($p < 0.05$).

การเปลี่ยนแปลงปริมาณ phenolic acids โมเดลขนาดเล็ก

ปริมาณ phenolic acid มีค่าผันผวนระหว่างการหมักตลอดระยะเวลา 6 เดือน (Table 4.9) สำหรับกลุ่ม hydroxybenzoic acid พบว่า ปริมาณ syringic, *p*-hydroxybenzoic, salicylic และ gallic acid ในไวน์ทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ปริมาณ protocatechuic acid มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นระหว่างการบ่ม ส่วนกลุ่ม hydroxycinnamic acid พบว่า ปริมาณ cinnamic และ *p*-coumaric ในไวน์ Exotic เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) หลังจาบ่มได้ 4 เดือน ในขณะที่ปริมาณ caffeic acid ไม่เปลี่ยนแปลง ในขณะที่ไวน์ Shiraz ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสารกลุ่ม hydroxycinnamic acid ระหว่างกระบวนการบ่ม ผลที่ได้คล้ายกับงานวิจัยของ del Alamo Sanza et al. (2004) ซึ่งพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณ syringic, gallic, protocatechuic, *p*-coumaric และ caffeic acid ในไวน์ที่บ่มด้วย จินไม้โอ๊ก แท่งไม้โอ๊ก และถังไม้โอ๊ก สารเหล่านี้มาจาก hydroalcoholysis ของไม้โอ๊ก (del Alamo Sanza et al., 2004) นอกจากนั้น phenolic acid อาจเกิด copigmentation กับ anthocyanin ได้ (Brouillard and Dangle, 1994) ทั้ง 2 ปฏิกริยานี้อาจเกิดขึ้นได้พร้อมๆกันในระหว่างกระบวนการบ่ม เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้ที่มีการเติมจินไม้โอ๊ก 0.5 g/l มีปริมาณน้อยกว่างานวิจัยของ del Alamo Sanza et al. (2004) (2.67 g/l) ถึง 5 เท่า ดังนั้นปริมาณจินไม้โอ๊กที่น้อยอาจทำให้ phenolic acid ที่ออกมาปริมาณน้อยด้วย

4.4.5 คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไวน์

คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไวน์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่เติมและไม่เติม *trans*-resverstrol บริสุทธิ์ และหมักโดยยีสต์ต่างสายพันธุ์ ประเมินด้วยวิธี QDA โดยผู้ประเมินที่มีความคุ้นเคยและดื่มไวน์เป็นประจำแสดงใน Table 4.10

คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไวน์ Exotic

ไวน์ Exotic ที่ไม่มีการเติม *trans*-resverstrol (0 ppm) ได้จากการหมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ EC1118 มีสีแดงเข้มกว่า ($p < 0.05$) (คะแนนสีสูงกว่า) ไวน์ที่หมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ K1V1116 และ CY3079 แตกกัน รส และความเข้มข้นของเนื้อไวน์ไม่แตกต่างกัน แม้ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจะไม่แตกต่างกัน แต่คะแนนของคุณลักษณะดังกล่าวของไวน์หมักด้วยยีสต์ EC1118 สูงกว่าไวน์หมักด้วยยีสต์อีก 2 สายพันธุ์ จึงทำให้ไวน์หมักด้วยยีสต์ EC1118 ได้รับการยอมรับรวมสูงกว่า ในทำนองเดียวกันสำหรับไวน์ Exotic มีการเติม *trans*-resverstrol 10 ppm แม้คุณลักษณะต่าง ๆ ที่ใช้ประเมินจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ไวน์ที่หมักด้วยยีสต์ EC1118 ยังคงได้รับการยอมรับรวมสูงกว่าเช่นกัน

Table 4.9 The phenolic acid (mg/l) of wine during ageing

Ageing (month)	Phenolic acid composition (mg/L)							
	<i>p</i> -hydroxy			Proto				
	Syringic	benzoic	Salicylic	Gallic	catechuic	Cinnamic	<i>p</i> -Coumaric	Caffeic
Exotic								
0	5.52 ± 0.94 a	0.92 ± 0.06 b	0.69 ± 0.07 b	10.08 ± 0.28 a	1.15 ± 0.02 ab	0.88 ± 0.03 b	5.06 ± 0.31 b	4.04 ± 1.75 a
1	5.12 ± 0.65 a	0.64 ± 0.02 d	0.81 ± 0.12 b	9.78 ± 2.02 a	1.16 ± 0.06 ab	0.83 ± 0.14 b	4.91 ± 0.59 b	4.28 ± 1.68 a
2	4.27 ± 0.36 a	0.84 ± 0.07 bc	1.15 ± 0.19 a	9.92 ± 1.63 a	1.09 ± 0.14 b	0.82 ± 0.11 b	4.90 ± 0.43 b	4.32 ± 1.27 a
4	5.17 ± 0.17 a	1.25 ± 0.10 a	0.86 ± 0.07 b	9.28 ± 0.51 a	1.31 ± 0.15 ab	0.81 ± 0.03 b	4.84 ± 0.11 b	6.95 ± 2.75 a
6	4.63 ± 0.06 a	0.75 ± 0.01 cd	0.74 ± 0.06 b	10.23 ± 1.67 a	1.62 ± 0.37 a	1.50 ± 0.31 a	6.59 ± 0.02 a	8.54 ± 2.04 a
Shiraz								
0	3.29 ± 0.20 bc	0.52 ± 0.02 c	0.64 ± 0.02 ab	22.30 ± 3.03 a	1.11 ± 0.12 b	2.31 ± 0.18 a	2.46 ± 0.34 bc	1.51 ± 0.18 ab
1	3.85 ± 0.39 ab	0.63 ± 0.05 bc	0.58 ± 0.05 b	23.51 ± 1.27 a	1.08 ± 0.06 b	1.75 ± 0.14 b	3.18 ± 0.04 a	1.63 ± 0.03 ab
2	3.01 ± 0.06 c	0.63 ± 0.03 bc	0.61 ± 0.01 ab	16.58 ± 1.46 b	1.06 ± 0.02 b	1.92 ± 0.11 ab	3.06 ± 0.06 ab	1.40 ± 0.03 b
4	4.36 ± 0.26 a	1.07 ± 0.26 a	0.70 ± 0.04 a	20.36 ± 0.67 ab	1.28 ± 0.21 ab	1.82 ± 0.17 b	2.66 ± 0.15 bc	1.64 ± 0.03 a
6	3.63 ± 0.40 abc	0.87 ± 0.02 ab	0.69 ± 0.02 a	19.82 ± 0.90 ab	1.48 ± 0.12 a	1.73 ± 0.18 b	2.57 ± 0.16 bc	1.40 ± 0.01 b
Numbers with different letters within the same column are significantly different ($p < 0.05$)								

Numbers with different letters within the same column are significantly different ($p < 0.05$)

คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไวน์ Shiraz

ไวน์ Shiraz ที่ไม่มีการเติม *trans-resverstrol* (0 ppm) พบว่า ไวน์ที่หมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ EC1118 มีคะแนนคุณลักษณะทั้งหมดที่ใช้ประเมินต่ำกว่า ($p < 0.05$) ไวน์ที่หมักด้วยยีสต์อีก 2 สายพันธุ์ ซึ่งมีคุณลักษณะทั้งหมดไม่แตกต่างกัน สำหรับไวน์ที่เติม *trans-resverstrol* 10 ppm กลับพบว่า ไวน์ที่หมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ K1V1116 มีคะแนนคุณลักษณะทั้งหมดต่ำที่สุด ($p < 0.05$) ขณะที่ไวน์หมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ EC1118 มีคะแนนทั้งหมดสูงกว่าไวน์ที่หมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ CY3079 แม้ผลทางสถิติจะไม่แตกต่าง อย่างไรก็ตามผู้ประเมินทั้งหมดให้ข้อสังเกตว่ามีการเกิด oxidation ขึ้นในไวน์ Shiraz ที่ไม่เติม *trans-resverstrol* และหมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ EC1118 และชนิดที่เติม *trans-resverstrol* และหมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ K1V1116 ด้วยเหตุนี้จึงมีความน่าจะเป็นไปได้ว่า การเติม *trans-resverstrol* ไม่น่าจะมีผลต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส แต่สายพันธุ์ยีสต์มีอิทธิพลต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส และยีสต์สายพันธุ์ EC1118 ให้คุณลักษณะที่ดีที่สุดในยีสต์ 3 พันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้

Table 4.10 Sensory characteristics of Exotic and Shiraz wines evaluated by QDA method

<i>trans</i> -resveratrol added		0 ppm			10 ppm		
Yeast strain	K1V1116	CY3079	EC1118	K1V1116	CY3079	EC1118	
Exotic wines							
Color	1.49 b	1.36 b	4.56 a	2.84 ab	2.63 b	3.12 ab	
Aroma	1.79 a	1.96 a	2.55 a	3.16 a	2.38 a	3.14 a	
Taste	2.58 a	2.34 a	3.16 a	3.20 a	2.81 a	3.41 a	
Body	2.37 b	2.44 b	3.31 ab	3.28 ab	2.58 ab	3.76 a	
Overall acceptance	2.06 b	1.78 b	3.56 a	3.19 a	2.46 ab	3.36 a	
Shiraz wines							
Color	5.49 a	6.10 a	1.55 b	1.53 b	5.24 a	5.72 a	
Aroma	4.84 a	4.41 a	3.46 ab	2.16 b	4.08 a	4.67 a	
Taste	4.65 a	4.74 a	1.84 b	1.28 b	4.18 a	4.88 a	
Body	3.64 a	4.68 a	1.45 b	0.96 b	3.76 a	3.90 a	
Overall acceptance	4.26 a	4.88 a	1.62 b	0.63 b	4.14 a	4.28 a	

Numbers with different letters within the same row are significantly different ($p < 0.05$).

4.5 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลอง ปริมาณสาร phenolic ในไวน์ขึ้นกับสายพันธุ์องุ่นและกระบวนการผลิตไวน์ องุ่นพันธุ์ Exotic มีปริมาณ total phenolic content (TPC) สูงกว่าพันธุ์ Shiraz ทั้งในน้ำองุ่นและผิวองุ่น พบ *trans-resveratrol* เฉพาะในผิวเท่านั้น ไม่พบในน้ำองุ่น กระบวนการหมักไวน์มีอิทธิพลต่อองค์ประกอบและปริมาณสาร phenolic compounds

ช่วงการหมักแอลกอฮอล์ สายพันธุ์ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่ทำให้ไวน์ที่ได้มีปริมาณ phenolic compounds แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ในช่วงสุดท้ายของการหมัก แต่ปริมาณ *trans-resveratrol* เพิ่มขึ้นใน 3 วันแรก และลดลงหลังการหมักได้ 6 วัน เป็นที่น่าสังเกตว่าไวน์ที่เดิมและไม่เดิม *trans-resveratrol* บริสุทธิ์ เมื่อเสร็จสิ้นการหมักแอลกอฮอล์ พบว่ามีปริมาณของสารนี้ในไวน์ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ส่วน TPC ในไวน์เพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 3 ของการหมัก และคงที่หรือลดลงเล็กน้อยจนเสร็จสิ้นการหมัก ปริมาณสาร flavonoids และ phenolic compound โมเลกุลต่ำจะเพิ่มขึ้นเช่นกันในช่วง 2-6 วันแรก และลดลงในช่วงสุดท้ายของการหมัก และการเติม *trans-resveratrol* ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสาร flavonoids และ phenolic acid

ระหว่างการหมัก malolactic fermentation (MLF) ด้วย lactic acid bacteria, *Oenococcus oeni* มีปริมาณ *trans-resveratrol* ถูกปล่อยเข้ามาในไวน์มากขึ้น และพบมากที่สุดเมื่อเติม *trans-resveratrol* บริสุทธิ์สูงมากถึง 10 ppm ใน must ก่อนการหมัก พบว่าสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ทั้ง 3 สายพันธุ์ ทำให้มีปริมาณ *trans-resveratrol* ที่แตกต่างกัน ($p < 0.05$) ขณะที่ TPC ลดลงเล็กน้อย และมีสาร phenolic ที่พบว่ามีปรากฏขึ้นในช่วง MLF อาทิ gentisic, *p*-hydroxybenzoic, salicylic, protocatechuic and caffeic acid

ระหว่างการบ่มไวน์ ปริมาณ TPC และ phenolic อื่น ๆ คือ *trans-resveratrol*, epicatechin, catechin และ quercetin ลดลงตามเวลาบ่มแต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ syringic, hydroxybenzoic, salicylic และ gallic acid ในไวน์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ทั้งนี้พบว่าปริมาณ protocatechuic acid เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) หลังบ่มได้ 4 เดือน ส่วน cinnamic acid มีปริมาณลดลงตามเวลาการบ่ม ขณะที่ ปริมาณของ *p*-coumaric และ caffeic acid ไม่เปลี่ยนแปลง

สายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้หมักในการทดลองนี้ พบว่ามีอิทธิพลต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไวน์ โดยพบว่ายีสต์ใน 3 สายพันธุ์ที่ใช้ทดลอง สายพันธุ์ EC1118 ให้คุณลักษณะที่ดีกว่าสายพันธุ์ KIV1116 และ CY3079 ขณะที่การเติมหรือไม่เติมสารบริสุทธิ์ของ *trans-resveratrol* ในการผลิตไวน์ มีอิทธิพลน้อยหรืออาจไม่มีเลยต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไวน์

เอกสารอ้างอิง

- Alexandre, H., Costello, P.J., Remize, F., Guzzo, J., and Guilloux-Benatier, M. (2004). *Saccharomyces cerevisiae*-*Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *Int. J. Food Microbiol.* 93:141-154.
- AOAC. (1997). Official methods of analysis (16th ed.). Association of official analytical chemists, Washington, DC.
- Brouillard, R., and Dangles, O. (1994). Anthocyanin molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging. *Food Chem.* 51:365-371.
- Burn, J., Burns, J., Gardner, P.T., Matthews, D., Duthie, G.G., Lean, M.E., Crozier, A. (2001). Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wine during vinification. *J. Agric. Food Chem.* 49:5797-5808.
- Chatonnet, P., Dubourdiey, D., Boidron, J.N., and Lavigne, V. (1993). Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *J. Sci. Food Agric.* 62:191-202.
- Cheynier, V., Souquet, J-M., Kontek, A.E., Moutounet, M. (1994) –Anthocyanin degradation in Oxidising Grape Musts. *J. Sci. Food Agric.* 66:283-288.
- Cilliers, J.J.L., and Singleton, V.L. (1989). Nonenzymic autooxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. *J. Agric. Food Chem.* 37: 890-896.
- Del Alamo-Sanza, M., Dominguez, I.N., Carcel, L.M.L., and Gracia, L.N. (2004). Analysis for low molecular weight phenolic compounds in a red wine aged in oak chips. *Anal. Chim. Acta.* 513:229-237.
- Echeverry, C., Ferreira, M., Reyes-Parada, M., Abin-Carriquiry, J.A., Blasina, F., Gonzales-Neves, and G., Dajas, F. (2005). Changes in antioxidant capacity of Tannat red wines during early maturation. *J. Food En.* 69:147-154.
- Eiro, M.J., and Heinonen, M. (2002). Anthocyanin colour behavior and stability during storage: effect of intermolecular copigmentation. *J. Agric. Food Chem.* 50:7461-7466.
- Escribano-Bailon, T., Dangles, O., and Brouillard, R. (1996). Coupling reactions between flavylum ions and catechin. *Phytochem.* 41:1583-1592.
- ETS Laboratories. (2006). The ETS red wine phenolic report [online]. Available: <http://www.etslab.com/pagetemplate/blank.asp?pageid=298>.

- Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., and Teissedre, P.L. (1995). Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* 43:890-894.
- Gomez-Plaza, E., Gil_Munoz, R., Lopez-Roca, J.M., and Martinez, A. (1999). Color and phenolic compounds of a young re wine as discriminating variables of its ageing status. *Food Res. Int.* 32:503-507.
- Grimaldi, A., McLean, H., and Jiranek, V. (2002). Identification and partial characterization of glycosidic activity of commercial strains of the lactic acid bacterium: *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* 51:362-369.
- Günata, Z., Bayonove, C., Tapiero, C., and Cordonnier, R. (1990). Hydrolysis of grape monoterpenyl β -D-glucosides by various β -glucosidases. *J. Agric. Food Chem.* 38:1232-1236.
- Hernandez, T., Estrella, I., Carlavilla, D., Martin-Alvarez, P.J., and Moreno-Arribas, M. V. (2006). Phenolic compounds in red wine subjected to industrial malolactic fermentation and ageing on lees. *Anal. Chim. Acta.* 563:116-125.
- Jeandet, P., Bessis, R., Gautheron, B. (1991). The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *Am. J. Enol. Vitic.* 42:41-46.
- Kovac, V., Alonso, E., Bourzeix, M., and Revilla, E. (1992). Effect of several enological practices on the content of catechins and proanthocyanidins of red wines. *J. Agric. Food Chem.* 40:1953-1957.
- Lamuela-Raventos, R.M., Romero-Perez, A.I., Waterhouse, A.L., Lloret, M., and delaTorreBoronat, M.C. (1997). Resveratrol and piceid levels in wine production and in finished wine. In T.R. Watkins (eds.). *Wine nutritional and therapeutic benefits ACS symposium 661* (pp 56-68). American chemical society, Washington, DC.
- Matthaus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *J. Agric. Food Chem.* 50:3444-3451.
- Mattivi, F., Reniero, F., and Koehammer, S. (1995). Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. *J. Agric. Food Chem.* 43:1820-1823.

- McDonald, M.S., Hughes, M., Burns, J., Lean, M.E., Matthews, D., and Crozier, A. (1998). A survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *J. Agric. Food Chem.* 46:368-375.
- Minussi, R.C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G.M., and Duran, N. (2003). Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chem.* 82:409-416.
- Monagas M., Bartolome B., and Gomez-Cordoves C. (2005). Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle – II. Non-anthocyanin phenolic compounds. *Eur. Food Res. Technol.* 220:331-340.
- Pezet, R., and Cuenat, P. (1996). Resveratrol in wine: Extraction from skin during fermentation and post-fermentation standing of must from Gamay grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 47:287-290.
- Ramey, D., Bertrand, A., Ough, C. S., Singleton, V. L., and Sanders, E. (1986). Effect of skin contact temperature on Chardonnay must and wine composition. *Am. J. Enol. Vitic.* 37:99-106.
- Razmkhab, S., Lopez-Toledano, A., Ortega, J.M., Mayen, M., Merida, J., and Medina, M. (2002). Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeasts and their cell walls. *J. Agric. Food Chem.* 50:7432-7437.
- SAS. (1993). SAS 6.08.04 WIN. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Siemann, E. H., and Creasy, L. L. (1992). Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 43:49-52.
- Singleton, V. L., and Esau, P. (1969). Phenolic substances in grapes and wines and their significant. New York: Academic Press.
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P. and Goldberg, D. M. (1997). Resveratrol: A molecule whose time has come? and gone?. *Clin. Biochem.* 30:91-113.
- Somers, T. C., Verette, E., and Pocock, F. (1987). Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera*: changes during white wine vinification and effects of exogenous enzymic hydrolysis. *J. Sci. Food Agric.* 40:67-78.
- Sripunya, P. (2005). Selection of yeast strains containing β -D-glucosidase for improving aroma in wine. M.S. thesis, Suranaree University of Technology, Thailand.
- Stone, H., and Sidel, J.L. (1993). Sensory evaluation practices. California: Academic Press, Inc.

- Timberlake, C.F., and Bridle, P. (1976). Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 27:97-105.
- Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., and Nury, F. S. (1995). *Wine analysis and production*. Chapman & Hall NY.

บทที่ 5

การดูดซึมและอิทธิพลของ เรสเวอราทรอล และ ผลิตภัณฑ์องุ่นแดงต่อโครงสร้างจุลภาคเซลล์ตับหนู

Absorption and Effects of Resveratrol and Red Grape Products on Ultrastructures of Mouse Liver Cells

5.1. คำนำ

ประชาชนในประเทศพัฒนาแล้วรวมทั้งประเทศฝรั่งเศสนิยมดื่มไวน์ และพบว่าประชากรประเทศฝรั่งเศสมีโอกาasเป็นโรคหัวใจ (coronary heart disease, CHD) ต่ำที่สุด ทำให้มีการกล่าวถึงคำว่า French Paradox ซึ่งหมายถึงชาวฝรั่งเศสมีการบริโภคอาหารไขมันสูงแต่มีโอกาasเสี่ยงการเป็น CHD เพียง 42% ของชาวอเมริกัน ทั้งนี้เพราะนอกจากมีแอลกอฮอล์ในไวน์ยังมีองค์ประกอบอื่น ๆ ที่มีประโยชน์ในเชิงสุขภาพ ซึ่งองค์ประกอบเหล่านั้น คือ สารประกอบ polyphenols โดยเฉพาะอย่างยิ่งในไวน์แดง ซึ่งได้แก่ phenolic acids (p-coumaric, cinnamic, caffeic, gentisic, ferulic และ vanillic acids), trihydroxystilbenes (resveratrol และ polydatin) และ flavonoids (catechin, epicatechin และ quercetin) สารประกอบในผลิตภัณฑ์องุ่นที่มีการวิจัยมากที่สุดได้แก่ resveratrol และ quercetin ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น antioxidant ที่มีประสิทธิภาพมากกว่า α -tocopherol (St. Leger et al., 1979) พบว่า resveratrol เป็น phytoestrogen หรือเป็น agonist ต่อ estrogen receptor ที่สามารถแทน estradiol ซึ่งเป็นฮอร์โมน estrogen จากธรรมชาติได้ (Gehm et al., 1997) และเป็นที่ทราบดีว่า estrogen สนับสนุนการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม แต่ estrogen อาจสามารถป้องกันการเกิดโรคหัวใจล้มเหลวได้ อย่างไรก็ตาม พบว่า resveratrol เป็น antagonist ต่อ estrogen ด้วยยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ในลักษณะ dose-dependent fashion (Lu and Serrero, 1999)

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) เป็นสารประเภท phytoalexin ซึ่งเป็นสาร antibiotics ที่พืชสังเคราะห์ขึ้นเมื่อเกิดโรคเนื่องจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* (Paul et al., 1998) โดยธรรมชาติจะพบ resveratrol และอนุพันธ์ ในรูปของ polymer เรียกว่า viniferin พบ Resveratrol มากในองุ่น ถั่วลิสง และผลมัลเบอรี่ และพบในรากของวัชพืช *Polygonum cuspidatum* ซึ่งชาวจีนและญี่ปุ่นได้สกัดใช้เป็นยาแผนโบราณ เรียกว่า Ko-jo-kon ในกระบวนการหมักไวน์ glucosides ของ resveratrol จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูป resveratrol (free isomer) ที่มีความเสถียรมากในแอลกอฮอล์ resveratrol มีประสิทธิภาพเป็น antioxidant โดยทำหน้าที่เป็น metal chelator (Fremont et al., 1999; Sánchez-Moreno et al.,

1999) และมีฤทธิ์เป็น anti-inflammatory, estrogenic, anticancer ในคน (Fremont, 2000; Wenzel and Somoza, 2005) resveratrol ยับยั้ง lipid autoxidation และ oxidation ของ low-density lipoprotein (LDL) resveratrol สามารถลดโอกาสการเกิดโรคหัวใจและยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือดได้ (Pace-Asciak et al., 1995, 1996) ยับยั้ง peroxidation ของ membrane lipid ของ liver microsomes (Fremont, 2000) ลดการตายและความเสียหายต่อตับในหนูเมาส์ (Bujanda et al., 2006) ป้องกันการสะสมไขมันในตับและการเกิด alcoholic fatty liver ในหนูเมาส์ (Ajmo et al., 2006) และยับยั้ง nonalcoholic fatty liver disease ในหนูแรท (Bujanda et al., 2008) นอกจากนี้ มีผลงานวิจัยแสดงว่า resveratrol สามารถป้องกันการเกิดโรคมะเร็งได้โดยลดการอักเสบและการเกิดเนื้องอกของเซลล์สัตว์ทดลอง (Jang et al., 1997; Carbo et al., 1999) และป้องกันการเกิดโรคเนื่องจากการเสื่อมสภาพของเส้นประสาท คือโรค Alzheimer's และ Parkinson's โดยการกระตุ้นการสร้างปลายของเซลล์ประสาทขึ้นใหม่ได้ (Salafia, 1999) พบว่า resveratrol และ polydatin จากสารสกัดรากพืช *Polygonum cuspidatum* สามารถยับยั้งการสะสมของ cholesterol และ triglyceride ในตับในหนู (rats และ mice) และลดปริมาณของ triglyceride และ LDL (low density lipoprotein) ในน้ำเลือด ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ป้องกันการเกิดความล้มเหลวในการทำงานของหัวใจ (Arichi et al., 1983) และในเซลล์ตับ Hep G2 (human hepatocarcinoma) (Goldberg et al., 1995)

อย่างไรก็ตาม การตอบสนองต่อ resveratrol และ wine ขึ้นกับ bioavailability ของสารในเลือดและอวัยวะ โดยเฉพาะเซลล์ตับอวัยวะหลักในกระบวนการย่อยสลายสารที่ร่างกายรับเข้าไปซึ่งข้อมูลหลักฐานตอบสนองต่อ resveratrol และ ผลิตภัณฑ์ขององุ่นยังมีน้อยมาก resveratrol ใน wine มีปริมาณน้อยมาก ประมาณ 5 mg/l แต่สามารถอยู่ในร่างกายนานและดูดซึมได้ในปริมาณพอเพียงให้ประสิทธิภาพดีต่อสุขภาพของคนได้ (Fremont, 2000) resveratrol ดูดซึมในร่างกายคนได้สูงแต่ bioavailability ต่ำ สามารถตรวจวัดได้ในน้ำเลือด (plasma) ในปริมาณต่ำมากในรูปของ unchanged resveratrol และ glucuronic acid conjugate (Yu et al., 2002; Andreas et al., 2003; Walle et al., 2004; Wenzel et al., 2005) และเซลล์ตับดูดซึม resveratrol โดยกระบวนการ passive diffusion และ carrier-mediated transport (Lancon et al., 2004)

5.2 วัตถุประสงค์

ในการศึกษานี้มีความประสงค์วิเคราะห์ผลของ total phenolic compounds จากองุ่นแดง *Vitis vinifera* เน้นสายพันธุ์ Zinfandel และ pure *trans*-resveratrol ต่อการดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดโดยสังเกตจาก bioavailability ใน plasma และผลน้ำองุ่น (grape juice - GJU), wine (GWI), สารสกัดกากองุ่น (grape pomace - GPE) และ resveratrol (RES) ต่อ ultrastructure ของเซลล์ตับหนูเมาส์

5.3 อุปกรณ์และวิธีการ

5.3.1 สารเคมีและเครื่องมือ

Trans-resveratrol จาก Dimethyl sulfoxide (DMSO) ซื้อจาก Riedel-deHaen, Seelze, Germany; Absolute Ethyl alcohol, Boric acid (H_3BO_3) (HPLC grade), Acetic acid และ Chloroform ซื้อจาก Merck, Darmstadt, Germany; Dimethyl sulfoxide, Folin Ciocalteu's reagent, Gallic acid, Paraformaldehyde, Glutaraldehyde (EM grade), Sodium cacodylate (EM grade), Lead citrate, Uranyl acetate (EM grade), Araldite 502, Toluidine blue, Acetonitrile ซื้อจาก Sigma, Chemical Company, St. Louis, MO; micronizer; rotary evaporator จาก Bosch, Co., USA.; lyophilizer (Labconco Corp., Kansas City, USA); capillary electrophoresis model G1600AX จาก Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany; ultramicrotome, knife glass จาก Rrichert ultracut S, Australia, uncoated 200-300 mesh copper grids, transmission electron microscope Philips CM10, Japan

5.3.2 ฝรั่ง น้ำฝรั่ง ไวน์แดง และ สารสกัดจากฝรั่งแดง

ฝรั่งแดงและไวน์แดงจากฝรั่ง *Vitis vinifera* ผลิตภัณฑ์ของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา เตรียมน้ำฝรั่งและสารสกัดจากฝรั่ง โดยล้างผลฝรั่งให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง บดด้วย micronizer ไม่ให้เมล็ดแตก แยกและกรองน้ำฝรั่งออกเก็บที่ $-20^{\circ}C$ บดกากซึ่งรวม peel, skin, และ seeds ให้ละเอียด และสกัดโดย macerate ด้วย 80% (v/v) ethanol ค้างคืนปั่นกากสกัดที่ 450 x g 15 นาที แยกน้ำตะกอนไปสกัดซ้ำ 2-3 ครั้ง รวมน้ำสกัดทั้งหมดแล้วกรองผ่านกรวย cotton wood ระเหยใน rotary evaporator ที่ $40^{\circ}C$ ให้เหลือ 250 ml เก็บภายใต้ nitrogen gas แล้วทำแห้งด้วย lyophilizer ที่ $-50^{\circ}C$ เก็บผง crude pomace extract ที่ $-80^{\circ}C$ ก่อนใช้

5.3.3 หนูเมาส์

หนูเมาส์สายพันธุ์ Institute cancer research (ICR) เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ น้ำหนัก 25-27 กรัม จาก National Laboratory Animal Center ตำบลศาลายา จังหวัดนครปฐม เลี้ยงที่อาคารเลี้ยงสัตว์ทดลอง ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อุณหภูมิห้อง $24-25^{\circ}C$, ความชื้นสัมพัทธ์ 40-70% แสงสว่าง:มืด 12:12 ชั่วโมง อาหารและน้ำ *ad libitum* การสัตว์ทดลองเป็นไปตามคู่มือของคณะกรรมการใช้สัตว์ทดลอง

5.3.4 การวัดปริมาณ Total phenolic compounds (TPCs) *in vitro*

Total phenolic compounds (TPCs) ของ น้ำองุ่น (GJU), ไวน์ (GWI) และ สารสกัดจากองุ่น (GPE) วัดโดยวิธี Folin Ciocalteu's method (Swain and Hills, 1959; Matthaus, 2002). ละลาย GPE ใน ethanol ใส่ 100 μ l ของ สารละลายตัวอย่างใน 2 ml Sodium carbonate บ่ม 2 นาที แล้วใส่ 100 μ l Folin Ciocalteu's phenol reagent ซึ่งละลายใน methanol (1:1) บ่ม 30 นาที วัด absorbance ที่ 750 nm ใช้ pure gallic acid เป็นสารมาตรฐานเทียบ วัด triplicate และแสดงปริมาณของ total phenolic compounds เป็น milligram gallic acid equivalent (GAE)/l

5.3.5 Absorption ของ Total phenolic compounds และ *trans*-resveratrol *in vivo*

ให้สารตัวอย่างแก่หนูทางปาก (oral gavage) วันละครึ่ง ๆ ละ 0.5 ml โดยให้ 20 mg/kg *trans*-resveratrol (ละลายใน 12% ethanol, v/v), 0.15 g/kg (b.w.) GPE (ละลายใน 10% DMSO), และ resveratrol-spiked wine (20 mg/kg resveratrol) เป็นเวลา 0, 15, 30, 60 นาที 3, 6, 12, และ 24 ชั่วโมง และ control ไม่ให้สาร ใช้หนู 3 ตัวต่อการทดลอง ทำการฆ่า (scarify) หนูและเก็บเลือดใน EDTA-K3 tube ซึ่งเคลือบด้วยสารกันเลือดแข็งตัว (anticoagulant) ปั่นเลือดที่ 1500 x g, 20 นาที 4 °C ถ่าย plasma ใส่หลอดสะอาด เก็บที่ -20 °C ก่อนวิเคราะห์หา total phenolic compounds โดย Folin-Ciocalteu's method และวิเคราะห์หา *trans*-resveratrol ด้วย capillary electrophoresis (CE, model G1600AX Agilent Technologies Deutschland GmbH, Germany) โดยใช้ 2-100 mg/l *trans*-resveratrol spiked ใน plasma สำหรับ calibration curve คำนวณหาความเข้มข้นด้วย program chemstation Rev.A.09.01 (1206) (Agilent Technologies 1990-2001) วิเคราะห์ 6 replicates ต่อการทดลอง และใช้ 10% DMSO เป็น control

5.3.6 Effect ของ resveratrol และ grape products ต่อ ultrastructure ของ liver cells

ให้สารทดสอบแก่หนูทางปาก (oral gavage) วันละครึ่ง ๆ ละ 0.5 ml โดยให้ 20 mg/kg *trans*-resveratrol (ใน 12% ethanol, v/v), 0.5 ml/day GJU, 0.5 ml/day GWI (12% ethanol), และ 0.15 g/kg (b.w.) GPE (ใน 10% DMSO) เป็นเวลา 2, 4 และ 6 เดือน และให้ 12% ethanol และ 10% DMSO เป็น vehicle control เก็บตัวอย่างตับหลังทำการสลับและ scarify หนู แล้ว fix ตับที่ด้วย Karnovsky's fixative โดยการทำ vascular perfusion ผ่าตัดแยกตับออก และตัดให้เป็นชิ้นเล็กประมาณ 1 x 1 mm fix ต่อชิ้นตับใน Karnovsky's fixative ที่ 4 °C ค้างคืน ล้างชิ้นตับด้วย PBS บ่มด้วย osmium tetroxide 2 ชั่วโมง จากนั้นดึงน้ำออกจากตัวอย่างด้วย acetone ทำ block ตัวอย่างสำหรับใช้ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่อง (transmission electron microscopy, TEM) ตามกรรมวิธีมาตรฐาน (Wischnitzer, 1981; Hayat, 2000) sectioning ด้วย ultramicrotome ใช้มีดแก้ว ความหนาของ section เทียบกับตารางสีมาตรฐานของ TEM section วาง section บน copper grid บ่มด้วย uranyl acetate

และ lead acetate ในที่มีค นำ section เข้าเครื่อง TEM (Philips CM10) ถ่ายภาพ ultrastructure ของเซลล์ตับ

5.3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างโดย Duncan's New Multiply Range Test (DMRT) ความน่าจะเป็น $p \leq 0.05$

5.4 ผลการทดลองและวิจารณ์

5.4.1 Absorption ของ Total phenolic compounds

ปริมาณ total phenolic compounds (TPC) (วัด *in vitro*) ในผลผลิตขององุ่น *V. vinifera* ดังนี้ GJU มี TPC $1,102.67 \pm 21.96$ mg/l, GWE มี TPC $3,613.00 \pm 15.13$ mg/l และ GPE มี TPC $4,407.33 \pm 13.65$ mg/l ซึ่ง TPC มากที่สุดในผลผลิตทั้งหมดขององุ่น (Figure 5.1)

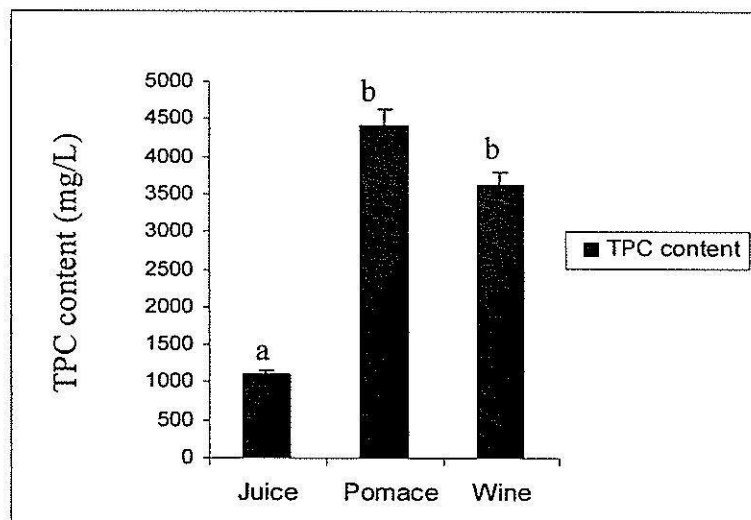


Figure 5.1 Total phenolic content (TPC) in *V. vinifera* products, juice, pomace extract and wine, expressed as mg/l GAE. Each sample was measured in triplicates. All values are mean $\pm$ S.D. Values with differing in small alphabets are significantly different ($p \leq 0.01$).

ปริมาณ TPC ในผลผลิตขององุ่นที่เพาะปลูกในฟาร์ม มทส ใกล้เคียงกับผลการตรวจวิเคราะห์ในไวน์แดง (Teissedre and Landrault, 2000) และอาจเป็นไปได้ที่ปริมาณ TPC ที่มากกว่าอาจจะมีสาร active ingredient ของผลผลิตองุ่นต่ออีกกิจกรรมทางเซลล์ชีววิทยา เช่น อาจจะมี resveratrol, quercetin

(3,3',4',5,7-pentahydroxy-flavon), catechin และ proanthocyanidin ที่สำคัญและพบมากในเปลือกผล องุ่นแดง และไวน์แดงซึ่งให้ฤทธิ์ลดจำนวนของเซลล์สายพันธุ์/มะเร็งของมนุษย์หลายสายพันธุ์ (Yoshida et al., 1990; Bianchini and Vainio, 2003; Haider et al., 2003; Alkhalaf, 2007). และทำให้เซลล์มะเร็งหลายชนิดตายแบบ apoptosis (Surh et al., 1999; Lee et al., 2006) แต่ไม่มีพิษต่อเซลล์ปกติ (Bagchi et al., 1998, 2000)

การดูดซึม (absorption) *in vivo* ของ TPC ใน GJU และ GPE หลังให้หนูได้รับสารทางปากที่ 0 นาทีเข้าสู่ plasma ไม่แตกต่างกับการดูดซึมของ DMSO vehicle baseline พบว่า absorption ของ TPC ใน plasma น้อยมาก (Figure 5.2) TPC จาก GPE ใน plasma เริ่มแตกต่างชัดเจนจาก GJU ซึ่งคงเท่ากับ baseline หลัง 30 นาที absorption ของ TPC จาก GJU สูงสุดเท่ากับ 0.2152 ± 0.01 g/l ที่ 12 ชั่วโมง และ จาก GPE ดูดซึมได้เร็วกว่าที่ 6 ชั่วโมง เท่ากับ 0.2157 ± 0.01 g/l และ TPC recovery สูงสุดเท่ากับ 22.93% เท่ากัน อย่างไรก็ตามปริมาณ TPC จาก GJU และ GPE มีแนวโน้มลดลงในระดับเท่ากันที่ 24 ชั่วโมง

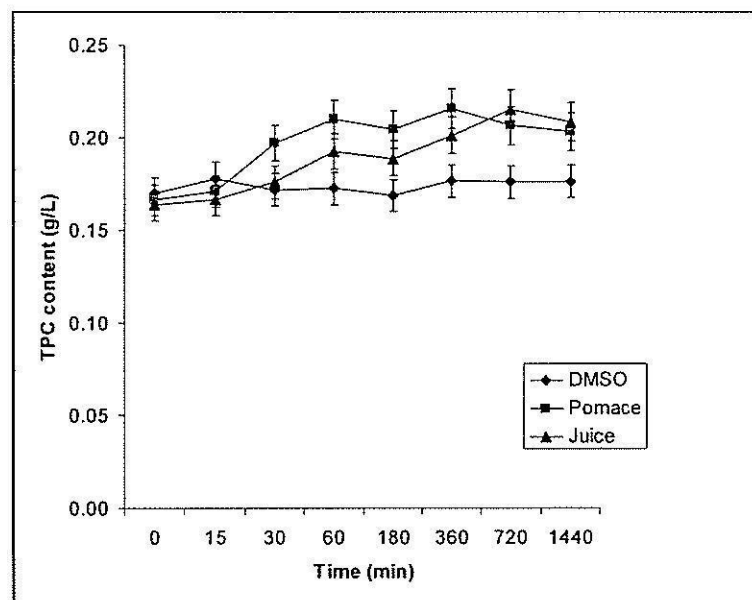


Figure 5.2 Total phenolic compounds absorbed in the mouse plasma after oral administration of grape juice and pomace extract at different times. DMSO was use as the vehicle. Data represents the mean $\pm$ S.D. (n=3) and $p \leq 0.01$.

การดูดซึมของ TPC/polyphenol จากผลผลิตขององุ่นจากฟาร์ม มทส ในหนูเมาส์ของการทดลองนี้เป็น พบว่า TPC สามารถดูดซึมเข้าเลือดได้เช่นเดียวกับการดูดซึมในคนที่วิเคราะห์โดย

นักวิจัยหลายท่าน สาร polyphenol ถูกดูดซึมเข้าเลือดและถูกย่อยได้ในร่างกาย พบว่าในคนที่ได้รับ catechin ทางปาก ถูกดูดซึมเข้าเลือดใน 6 ชั่วโมงและปรากฏในปัสสาวะภายใน 24 ชั่วโมง น้ำย่อยในกระเพาะอาหารไม่ย่อย polyphenol แต่ทำให้เกิด polymerization ของสารแล้วขับออกกับอุจจาระประมาณ 19% ของสารที่ได้รับ (Das, 1971) ในคนดื่มไวน์แดง วิเคราะห์พบปริมาณ polyphenol ในน้ำเลือด (plasma) เพิ่มขึ้น โดยไวน์ถูก absorbed ที่ upper gastrointestinal tract พร้อมกับการเพิ่มภาวะ antioxidant (Sarafini, Maiani and Ferro-Luzzi, 1998; Caccetta et al., 2000; Tedesco et al., 2000) และสามารถตรวจพบมี resveratrol และ quercetin ใน plasma ได้หลังจาก คน หนูเมาส์และหนูแรท ได้รับ grape juice (Meng et al., 2004) นอกจากนี้ การดื่ม coffee ก็เพิ่มปริมาณ caffeic acid ใน plasma ได้สูงสุดที่ 1 ชั่วโมง (Nardini et al., 2002) ในทำนองเดียวกับคนกิน anthocyanins ซึ่งมีมากในเมล็ดพืชพวก vine เช่นองุ่นและ blueberry ก็สามารถตรวจพบ anthocyanins ได้ในเลือดพร้อมกับพบ antioxidant capacity เพิ่มขึ้น (Mazza et al., 2002) และมีการทดลองพบว่า การดูดซึมของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นสามารถลดระดับ lipid peroxides และ carbonylated proteins ซึ่งไปเสริม antioxidant activity ในการต้าน reactive oxygen species ที่เกิดจาก hyperglycaemic conditions ในเลือด และเนื้อเยื่อตับของหนูแรทที่เป็นเบาหวาน (Chis et al., 2009)

5.4.2 Absorption ของ *trans*-resveratrol *in vivo*

การดูดซึม resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) ใน plasma หนูเมาส์หลังให้หนูได้รับสาร resveratrol โดยตรง และ resveratrol-spiked wine ทางปาก พบว่า resveratrol ถูกดูดซึมและอาจถูกย่อยในทางเดินอาหารไปเป็นอนุพันธ์ จึงวิเคราะห์ไม่พบมี resveratrol ด้วย capillary electrophoresis (CE) ใน plasma ของหนูที่ได้รับ resveratrol (*in vivo*) และไม่พบมีใน plasma ของหนูที่ได้รับ 20 mg/l resveratrol-spiked wine (*in vivo*) แต่วิเคราะห์พบมี resveratrol ใน 16 mg/ml resveratrol-spiked plasma นอกตัวหนู (*ex vivo*) (Figure 5.3, 5.4 และ 5.5)

การดูดซึม resveratrol ใน plasma ของหนูเมาส์ที่ได้รับ resveratrol หรือ resveratrol-spiked wine (*in vivo*) เวลา 0, 15, 30, 60 นาที, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ไม่พบ resveratrol ตลอดทุกช่วงเวลาการทดลอง (Table 5.1)

การศึกษาการดูดซึม resveratrol เข้าสู่ร่างกายโดยใช้หนูเมาส์เป็นต้นแบบครั้งนี้ ไม่สามารถตรวจหา resveratrol ด้วย capillary electrophoresis (CE) เทคนิคอาจเป็นเพราะ resveratrol ถูกเปลี่ยนเป็นสารอนุพันธ์ในรูปที่ CE ไม่สามารถตรวจได้ ผลการทดลองนี้คล้ายกับการดูดซึมของ resveratrol ในหนูแรท ซึ่งพบว่า หนูแรท resveratrol ถูกดูดซึมเข้าลำไส้เล็กได้ และไม่ถูกย่อย แต่ถูก glucuronidation ให้เป็น resveratrol glucuronide ถึง 96.5% ของที่ดูดซึมในลำไส้เล็กและกระแสเลือด (Kuhnle et al., 2000) นอกจากนี้อาจเป็นเพราะการวิเคราะห์หาปริมาณ resveratrol ที่ดูดซึมเข้ากระแส

เลือดด้วยเทคนิค CE ซึ่งความไว ก่อนข้างต่ำ (sensitivity วิเคราะห์ resveratrol ได้ต่ำสุดที่ 4 mg/l) จึงอาจทำให้ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณ resveratrol ที่มีน้อยมากๆ ได้เมื่อเทียบกับการตรวจหา resveratrol ด้วยเทคนิค high-performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) ซึ่งมีความไวสูงกว่า

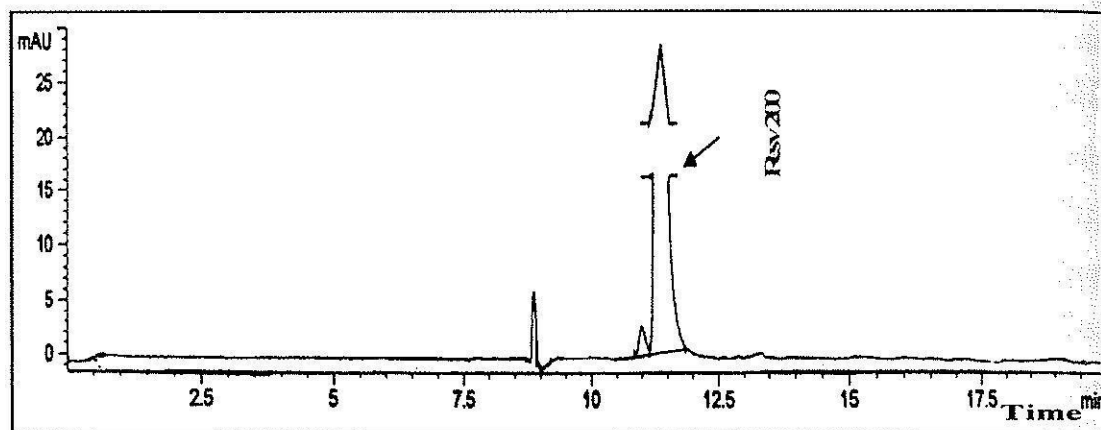


Figure 5.3 Electrophoregram of standard *trans*-resveratrol (200 mg/l) showing the retention time of resveratrol (*in vitro*) at 12 minutes analyzed by capillary electrophoresis, detection wavelength at 220 nm.

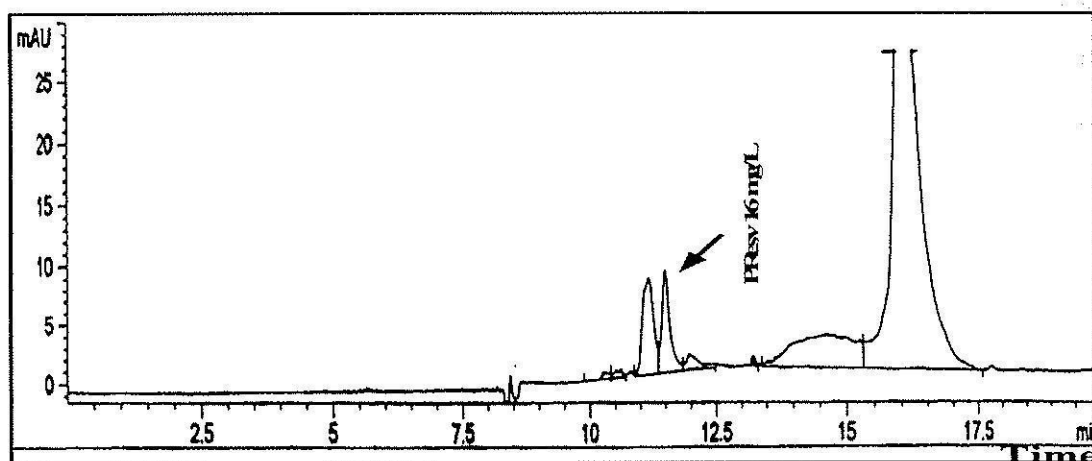


Figure 5.4 CE electrophoregram of 16 mg/l *trans*-resveratrol-spiked plasma (*ex vivo*) showing the separation of resveratrol at the retention time, 12 minutes, detection wavelength at 220 nm.

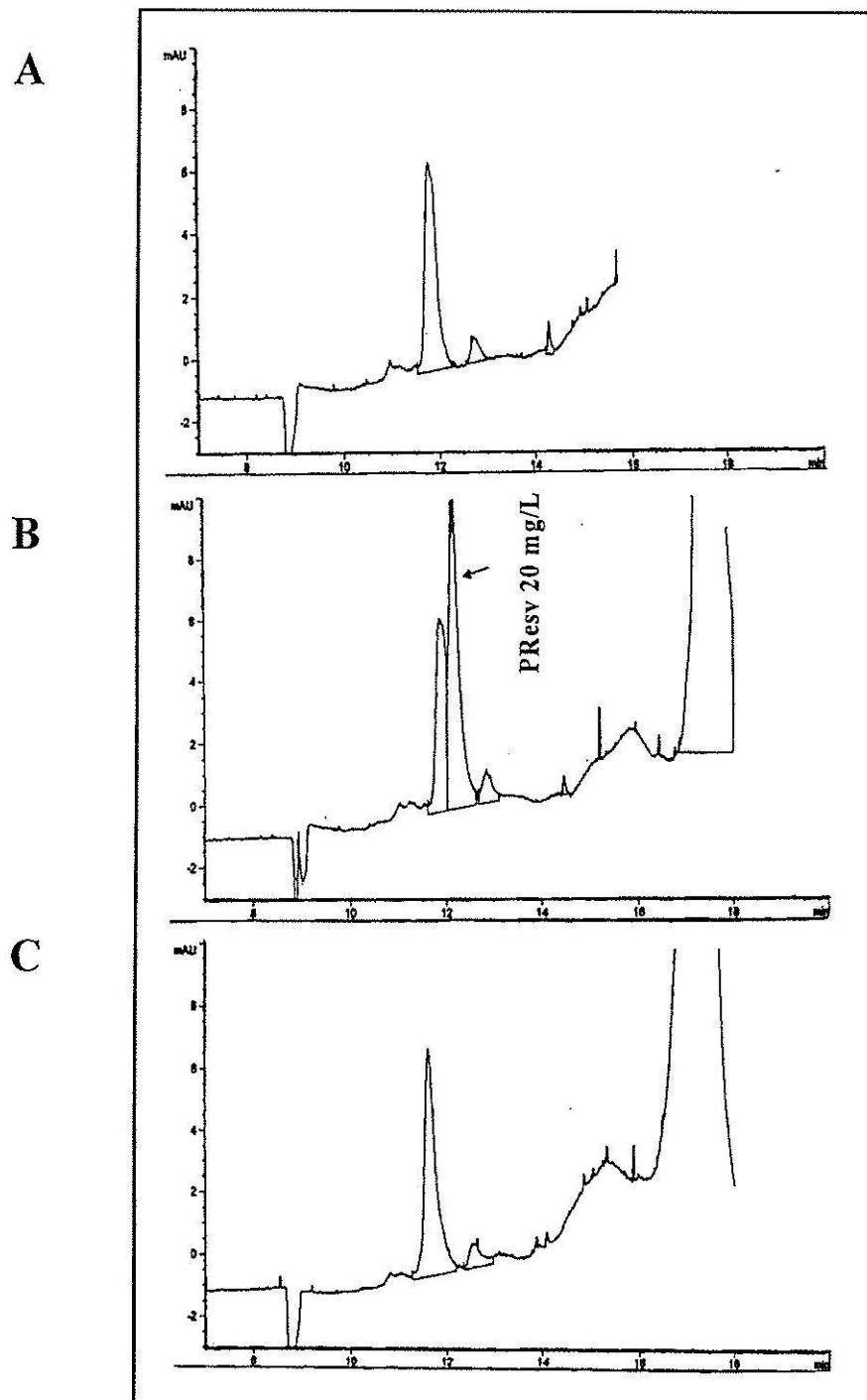


Figure 5.5 CE electrophoregram showing the separation of resveratrol detection of plasma samples. A, plasma sample as a control. B, resveratrol-spiked plasma (*ex vivo*). C, 20 mg/l-resveratrol spiked wine plasma (*in vivo*). Detection at 220 nm.

ใช้ HPLC-DAD ตรวจวัดปริมาณ resveratrol ในหนูแรทได้โดยใช้ synthesized resveratrol conjugate เป็น standards เมื่อให้ 50 mg/kg/day resveratrol ทางปาก ตรวจปริมาณ resveratrol ได้ 19% ใน plasma, 15% ใน urine และ 13% ใน feces และเมื่อให้ 300 mg resveratrol ตรวจวัดใน urine ได้ถึง 54% (Wenzel et al., 2005) นอกจากนี้สามารถติดตามปริมาณ resveratrol ที่ดูดซึมเข้าร่างกายสัตว์และการกระจายของฤทธิ์ไปตามอวัยวะต่างๆ ได้โดยใช้สารกัมมันตรังสี หนูเมาส์ Balb/c และคนอาสาสมัครที่ได้รับ ^{14}C -trans-resveratrol ทางปาก พบการดูดซึมและการกระจายของ resveratrol ใน stomach, liver, kidney, intestine, bile, urine แสดงว่า resveratrol ในอวัยวะคงอยู่เป็น intact form และยังบ่งชี้อวัยวะเป้าหมายของ cancer prevention ของ polyphenols ได้ด้วย (Vitrac et al., 2003; Walle et al., 2004) ^3H -labelled resveratrol เข้าสู่ภายในเซลล์มะเร็งคนสายพันธุ์ HepG2 ได้โดยกลไก passive diffusion และ carrier-mediated transport และขึ้นกับความเข้มข้นและอุณหภูมิ (Lancon et al., 2004)

Table 5.1 The results of *in vivo* resveratrol absorption in plasma from the mice after oral administration of 20 mg/l resveratrol and resveratrol-spiced wine as the designated time of treatments.

Time of Administration	Trans-resveratrol (mg/l)								
	Minute				Hour				
Plasma sample	0	15	30	60	3	6	12	24	N
Resveratrol-treated plasma	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3
Resveratrol spiced wine plasma	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3

ND = not detected

5.4.3 Effect ของ resveratrol และ grape products ต่อ ultrastructure ของเซลล์ตับ

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับ ultrastructure ของเซลล์ตับหนูเมาส์ (ICR mouse) จากฤทธิ์ของ resveratrol และผลผลิตขององุ่นด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope) การเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของเซลล์ตับของหนูที่ได้รับ 10% DMSO และ 12% ethanol ซึ่งเป็น vehicle control (Figure 5.7) เซลล์ตับที่ได้รับ 10% DMSO พบการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย มีการสะสม glycogen granules (Gly) และ mitochondria (M) ปกติ (Figure 5.7, C) ส่วนเซลล์ตับที่ได้รับ 12% ethanol (Figure 5.7, D) พบช่อง vesicle (V) ขนาดใหญ่ใน cytoplasm ซึ่งอาจเป็น

storage lipid droplet ที่เกิดจากการรวมกันของ lipid droplet ขนาดเล็ก, dearrangement ของ agranular endoplasmic membrane (AER), mitochondria (M) ปกติ และ chromatin ใน nucleus (N) condensation มากกว่า control

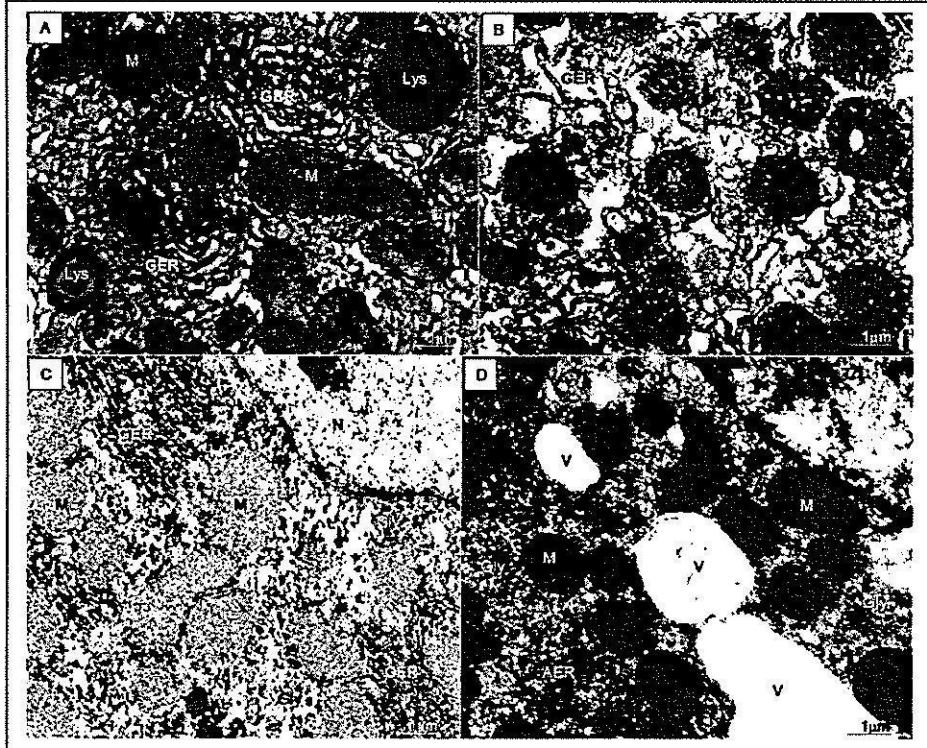


Figure 5.6 Transmission electron micrographs of liver cells of ICR mouse normal control at 2 and 6 months (A, B) and 6-month oral administration of 10% DMSO (C) and 12% ethanol (D). Lys = lysosome, M = mitochondrion, N = nucleus, GER = granular endoplasmic reticulum, AER = agranular endoplasmic reticulum, Gly = glycogen granule, V = vesicle.

น้ำองุ่น GJU ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ultrastructure ของเซลล์ตับทั้งระยะต้นและระยะยาว (Figure 5.7, A) ส่วนเซลล์ตับที่ได้รับสารสกัดจากองุ่น GPE ซึ่งทำละลายด้วย 10% DMSO เป็นเวลานานกว่า 4 เดือน พบ mitochondria (M) และ granular endoplasmic reticulum (GER) ปกติ และพบ dilation ของ agranular endoplasmic reticulum (AGE) บ้างเล็กน้อย (Figure 5.7, B) เซลล์ตับที่ได้รับ wine (GWI) และ resveratrol (RES) ซึ่งละลายด้วย 12% ethanol พบมี dilation ของ agranular endoplasmic reticulum (AGE), มี vesicle (V) ขนาดเล็กจำนวนมาก และ พบมี mitochondria (M) ใหญ่กว่าปกติ (Figure 5.7, C and D) vesicle ขนาดใหญ่นี้อาจเป็น lipid storage หรือเป็น mitochondria ที่มี dilation ซึ่งต้องการสีย้อมด้วยเฉพาะในการจำแนก

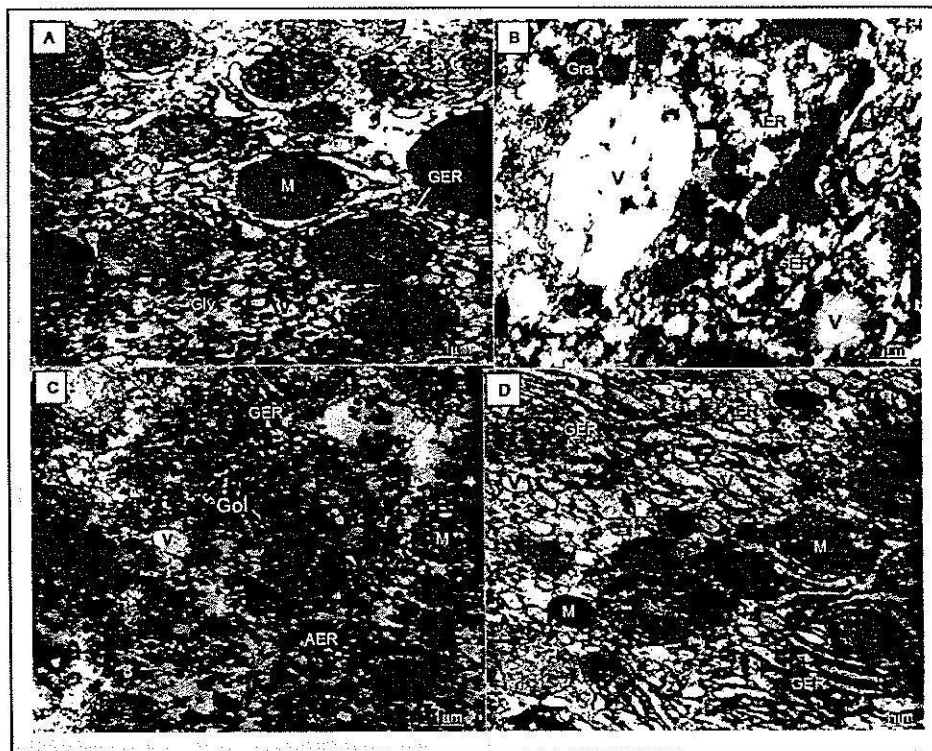


Figure 5.7 Transmission electron micrographs of liver cells of ICR mouse at 6-month administration of 0.5 ml/day grape juice (A), 0.15 g/kg grape pomace extract (B), 0.5 ml/day wine (C), and 20 mg/kg resveratrol (D). M = mitochondrion, GER = rough endoplasmic reticulum, AER = agranular endoplasmic reticulum, Gol = Golgi complex, Gra = granule, Gly = glycogen granule, V = vesicle

อย่างไรก็ตาม หนูได้รับสารผลิตผลขององุ่นในระยะเวลาสั้น 2 เดือน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้าง ultrastructure ของเซลล์ตับ ระยะเวลา 4 เดือนพบการเปลี่ยนแปลงบ้างเล็กน้อย แต่เมื่อได้รับสารนานมากขึ้น (prolong treatment) พบการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเซลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (Table 5.2) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปลี่ยนแปลงเกิดกับเซลล์ของตับที่ได้รับ 10% ethanol อย่างเดียว และ ethanol ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายสาร resveratrol และในไวน์ที่เกิดจากการหมักอาจเป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ultrastructure ของเซลล์ได้

เป็นที่ประจักษ์มานานมาแล้วว่า ethanol และเครื่องดื่มที่มี ethanol ทำให้ตับเสียหาย ตับเป็นไขมันหรือตับแข็ง (fatty liver / liver fibrosis) มีการวิจัยในหนูแรท กระต่าย คน และเซลล์สายพันธุ์มะเร็งตับ HepG2 พบว่า ethanol เปลี่ยนแปลงโครงสร้างส่วนประกอบ ultrastructure ของเซลล์ตับทั้งระยะสั้น และระยะยาว ซึ่งคล้ายกับผลการทดลองของการวิจัยนี้ นั่นคือ ethanol มีผลทำให้เซลล์ตับเปลี่ยนแปลง endoplasmic reticulum (ER) และมี glycogen สะสมระหว่างท่อของ endoplasmic

reticulum (ER) ทำให้เกิดเป็นถุง vesicles ขนาดเล็กและใหญ่ระหว่าง ER, mitochondria ขนาดใหญ่ ขึ้นและมีความผิดปกติของการจัดตัวของ cristae, agranular endoplasmic dilation เป็น vesicle และ lipid droplet ขนาดใหญ่ขึ้น (Ashworth et al., 1965; Lane and Lieber, 1966; Sana et al., 1997; Vilaro and Llobera, 1988; Cameron, et al., 1998) mitochondria ขนาดใหญ่ (megamitochondria) มี cristae ไม่ชัดเจน ทำให้ลด succinate dehydrogenase activity และ ลด respiration activity แม้มี proliferation ของ mitochondria จำนวนมากก็ตาม (Koch et al., 1978; Cameron et al., 1998)

Table 5.2 Ultrastructural changes in mouse liver cells after administration of grape products, resveratrol and vehicles of ethanol and DMSO (dimethyl sulphonyloxide) during 2, 4, and 6 months.

Treatment	Level of changes in the ultrastructure of liver cells		
	2 months	4 months	6 months
Normal control	-	-	-
10% Dimethylsulfoxide (DMSO)	-	+	+
12% Ethanol	++	+++	++++
Grape juice	-	-	-
Grape pomace extract (in 10% DMSO)	-	+	+
Wine 0.5 ml/day (12% ethanol)	-	+	+
<i>trans</i> -resveratrol (in 12% ethanol)	-	+	+

Dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นสารธรรมชาติ ไม่มีพิษ มีศักยภาพ และคุณสมบัติ ใช้ในการรักษาอาการหลายอย่าง เช่น inflammation, allergy, free radical scavenging, และ paralysis จาก spinal cord injury, sinusitis และ ใช้ DMSO ในการรักษามะเร็ง เนื่องจาก DMSO ขยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ (Kovach, 2007) DMSO ที่ใช้ในการละลายสารสกัดจากองุ่น (GPE) ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับ ซึ่งสอดคล้องกับการใช้ 2-5% DMSO ช่วยรักษา morphology ของ mitochondria และ myofibril ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนูแรทที่บกพร่อง copper (Saari and Medeiros, 1991) และ DMSO ทำให้ส่วนประกอบของเซลล์ตับหนูแรทที่ขาดเลือด (ischemia) ไม่เปลี่ยนแปลง (Coskun and Huseyin, 1998) 10-20% DMSO ไม่เปลี่ยนแปลง ultrastructure ของ oocytes สุนัขในการแช่แข็ง (Turathum et al., 2010) ในการทดลองครั้งนี้ 10% DMSO เป็น vehicle และ solvent ของสารสกัดจากองุ่น (GPE) พบลักษณะ dilation ของ agranular endoplasmic reticulum ในเซลล์ตับหนูเมาส์ อาจเป็นผลจาก DMSO ที่ความเข้มข้นสูง ทำให้มี dislocation ของ microfilament

(Fukui, 1980) ที่คำจั้น endoplasmic reticulum แสดงว่า 10% DMSO ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ด้วย อย่างไรก็ตาม DMSO ที่ความเข้มข้นสูงมาก (70%) อาจทำให้เซลล์เสียหาย (Admin, 2010)

การศึกษาอิทธิพลของ grape juice (GJU), pomace extract (GPE), wine (GWI) และ resveratrol (RES) ต่อการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างส่วนประกอบ ultrastructure ของเซลล์ครั้งนี้เป็นการวิจัยแรก ยังไม่มีหลักฐานการวิจัยทำนองนี้มาก่อน สารสกัดจากองุ่นที่ละลายใน 10% DMSO ไม่มีผลต่อเซลล์มากนัก อาจเป็นเพราะ DMSO เป็นสาร free radical scavenger และเป็นสารทำลายโดยธรรมชาติที่ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของสารเข้าสู่เซลล์หรือนำสารเข้าทำปฏิกิริยากับเซลล์โดยง่าย แต่ DMSO ที่เข้มข้นมากอาจดึงน้ำเข้าเซลล์ได้บ้างซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อโครงสร้างภายในเซลล์ได้ แต่ไม่ถึงระดับทำให้เซลล์ผิดปกติ พบว่า GPE ลดระดับ cholesterol ใน plasma ของหนูแรท และ suppressed fatty acid และ sterol biosyntheses แต่ลดน้ำหนักตัวเล็กน้อย (Yunoli et al., 2008) ในทำนองเดียวกันหนูแรทที่ได้รับ grape seed extract (GSE) เป็นเวลานานก็ไม่แสดงผล toxic ต่อเซลล์ (Wren et al., 2002) นอกจากนี้การเทคนิคการสกัดอาจไม่สามารถสกัด polyphenols ออกจากการองุ่นได้ทั้งหมด ทำนองเดียวกัน GWI ซึ่งมี 12% ethanol (จากผลการหมักด้วยยีสต์) ทำให้เปลี่ยนแปลงโครงสร้างเซลล์เพียงเล็กน้อย อาจเป็นได้ว่า ระหว่างการหมักและบ่มไวน์มีตะกอน lees เกิดขึ้นและ lees ผลิตสาร esters ปรับเปลี่ยน phenolic compounds และลดสารพิษจากราและสารกำจัดวัชพืชที่ติดมากับองุ่น (Perez-Serradilla and Luque de Castro, 2008) ในไวน์องุ่น อาจเป็นผลให้ไวน์ที่มี ethanol ปริมาณมาก แต่ไม่เป็นพิษไม่เปลี่ยนโครงสร้างเซลล์ และยังพบว่าไวน์จากองุ่นหลายสายพันธุ์ยับยั้ง proliferation ของเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ Caco-2, HepG2 and MCF-7 จากคน (Yang, Martinson and Liu, 2009)

มีการศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของ resveratrol ซึ่งเป็น polyphenol ชนิดหนึ่งจากพืชพวก grape vines และ berry ในเชิงคุณสมบัติของสุขภาพของคนและสัตว์ทดลองอื่น หนูแรทที่ได้รับ acute spinal cord injury พบว่า resveratrol ลดการทำลาย axon, neurofilaments, myelin sheath, mitochondria และ nuclease ของเซลล์ประสาทใน spinal cord ทำให้ energy metabolism system ดีขึ้นและยับยั้ง lipid peroxidation ณ บริเวณที่ spinal cord ได้รับบาดเจ็บ ทำให้ลด secondary damage ต่อ spinal cord (Ying-Bao and Ying-Jei, 2003; Ates et al., 2006) resveratrol มี antioxidant capacity ด้านกับ estrogen ยับยั้งกิจกรรมของ actin cytoskeleton ใน breast cancer cells ทำให้เซลล์ไม่เคลื่อนที่ (Azios et al., 2007) และ resveratrol ป้องกัน mitochondria จาก reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเกิดจาก arachidonic acid (AA, proinflammatory fatty acid) และ อนุมูลอิสระ (Shin, Cho and Kim, 2009) และป้องกันไม่ให้ mitochondria ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจบวมจากการบาดเจ็บ (Xi et al., 2009) โดยทั้งสองกรณีกลไกของ resveratrol เป็นการยับยั้ง phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β และวัดขนาดของ mitochondria ด้วย spectrophotometer ไม่ได้วัดจาก transmission electron

micrograph นอกจากนี้ resveratrol มีอิทธิพลยับยั้งการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งตับสายพันธุ์ H₂₂ และลดขนาดมะเร็งตับ (hepatoma) ในหนู โดยหยุดกิจกรรมเซลล์มะเร็งที่ S phase ทำให้เซลล์ไม่แบ่งตัว (Yu et al., 2003; Wu et al., 2004) เซลล์มะเร็งสายพันธุ์ (Caco-2) จากมะเร็งลำไส้คนไม่สามารถย้ายจาก S phase ไป G₂ phase และลดปริมาณ cyclin D1/Cdk4 complex เอนไซม์ที่ต้องการในการแบ่งเซลล์ (Wolter et al., 2001)

5.5 สรุปผลการทดลอง

ผลผลิตขององุ่น *Vitis vinifera* สายพันธุ์ Zinfandel ซึ่งปลูกในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้แก่ น้ำองุ่น (grape juice GJU) ไวน์ (wine, GWI) และ สารสกัดกากองุ่น (pomace ethanolic extract, GPE) มีส่วนประกอบสาร phenolics ต่างกัน GPE มี total phenolic compounds มากที่สุด รองลงคือ GWI และ GJU ปริมาณตามลำดับดังนี้ GPE มี TPC $4,407.33 \pm 13.65$ mg/l, GWI มี TPC $3,613.00 \pm 15.13$ mg/l และ GJU มี TPC $1,102.67 \pm 21.96$ mg/l

สาร phenolics ที่หนูเมาส์ได้รับทางปากถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด สามารถตรวจหาได้ใน plasma ได้ประมาณ 22.93% หลัง 24 ชั่วโมง phenolics ใน plasma มีแนวโน้มลดลง สารอาจถูก metabolized, จับกับสารอื่น หรือ ถูกขับออกจากร่างกาย เช่นเดียวกับ resveratrol สารบริสุทธิ์ซึ่งพบมากในผลผลิตขององุ่นและในการวิจัยนี้ใช้เป็นสารเทียบ (referent compound) กิจกรรมของผลผลิตขององุ่นที่ศึกษา resveratrol สามารถถูกดูดซึมเข้ากระแสเลือดได้เช่นกัน แต่พบมี resveratrol ปริมาณน้อยมากใน plasma จนไม่สามารถตรวจหาได้ด้วยเครื่องมือ capillary electrophoresis ซึ่งมีความไวของระบบ (sensitivity) ไม่สูงเท่าเครื่องมือ high pressure liquid chromatography (HPLC) แต่สามารถตรวจสอบได้เมื่อใส่ resveratrol ผสมใน plasma โดยตรง (spiked resveratrol plasma) ไม่น้อยกว่า 16 mg/l

น้ำองุ่น (grape juice, GJU) ไวน์ (wine, GWI) และ สารสกัดกากองุ่น (pomace ethanolic extract, GPE) และ resveratrol ไม่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างส่วนประกอบ ultrastructure ของเซลล์ตับหนูเมาส์ ส่วน 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) ซึ่งใช้เป็นสารทำละลายสารสกัดกากองุ่นและเป็น vehicle control เปลี่ยนแปลง ultrastructure ของเซลล์ตับเล็กน้อยโดยสะสม glycogen granules และ 12% ethanol ซึ่งความเข้มข้นเท่ากับ ethanol ในไวน์และใช้เป็น vehicle control โครงสร้างเซลล์ตับเปลี่ยนแปลง มี storage lipid droplet, endoplasmic reticulum เรียงตัวผิดปกติ และ chromatin ใน nucleus จัดตัวแน่นกว่าปกติ

สรุปได้ว่าผลผลิตองุ่นสายพันธุ์ Zinfandel ที่เพาะปลูกในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ผลิตสาร phenolics ที่เป็นประโยชน์และเมื่อรับเข้าร่างกายแล้ว ร่างกายสามารถดูดซึมเข้ากระแสเลือด

ได้ ไม่มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบภายในเซลล์และใช้เพื่อประโยชน์ในการลดไขมันและป้องกันการก่อมะเร็ง

เอกสารอ้างอิง

- Ajmo, J.M., Liang, X., Rogers, C.Q., Pennock, B., and You, M. (2008). Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 295:833-842.
- Alkhalaf, M. (2007). Resveratrol-induced apoptosis is associated with activation of p53 and inhibition of protein translation in T47D human breast cancer cells. *Pharma.* 80:134-143.
- Alternative Cancer Treatments – A Review of the Most Effective Treatments by admin. (2010). Available at <http://www.latestcancernews.com/alternative-cancer-treatments-a-review-of-the-most-effective-treatments>. Accessed on 09-08-10.
- Andreas, A.C., Gescher, J., and Steward, W.P. (2003). Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 12:953-957.
- Arichi, H., Kimura, Y., Okuda, H., Baba, K., Kozawa, M., and Arichi, S. (1983). Effects of shilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. On lipid metabolism. *Chem. Pharm. Bull.* 30:1766-1770.
- Ashworth, C.T., Wrightsman, F., Cooper, B., and Di Luzio, N.R. (1965). Cellular aspects of ethanol-induced fatty liver: A correlated ultrastructural and chemical study. *J. Lipid Res.* 6:258-268.
- Azios, N.G., Krishnamoorthy, L., Harris, M., Cubano, L.A., Cammerz, M., and Dharmawardhane, S.F. (2007). Estrogen and resveratrol regulate Rac and Cdc42 signaling to the actin cytoskeleton of metastatic breast cancer cells. *Neoplasia.* 9:147-158.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S.J., Das, D.K., Ray, S.D., Kuszynski, C.A., Joshi, S.S., and Pruess, H.G. (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicol.* 148:187-97.
- Bagchi, D., Garg, A., Krohn, R. L., Bagchi, M. and Bagchi, D., Balmoori, J. J., and Stohs, S.J. (1998). Protective Effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *Gen. Pharma.* 30:771-776.
- Bianchini, F., and Vainio, H. (2003). Wine and resveratrol: Mechanisms of cancer prevention? *Eur. J. Cancer Prev.* 12:417-425.

- Bujanda, L., García-Barcina, M., Gutiérrez-de Juan, V., Bidaurreazaga, J., Fernández de Luco, M., Gutiérrez-Stampa, M., Larzabal, M., Hijona, E., Sarasqueta, C., Echenique-Elizondo, M., and Arenas, J.I. (2006). Effect of resveratrol on alcohol-induced mortality and liver lesions in mice. *BMC Gastroenterol*, 6:35. Available at <http://www.biomedcentral.com/1471-230X/6/35>. Accessed on 12-08-2005.
- Bujanda, L., Hijona, E., Larzabal, M., Beraza, M., Aldazabal, P., García-Urkia, N., Sarasqueta, C., Cosme, A., Irastorza, B., González, A., and Arenas J.I., Jr. (2008). Resveratrol inhibits nonalcoholic fatty liver disease in rats. *BMC Gastroenterol*, 8. Available at <http://www.biomedcentral.com/1471-230X/8/40>. Accessed on 12-08-2005.
- Caccetta, R.A.A., Croft, K.D., Beilin, L.J., and Puddey, B. (2000). Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability 1–3. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:67–74.
- Cameron, R.G., Neuman, M. G., Shear, N.H., Katz, G., Bellentani, S., and Tiribilli, C. (1998). Modulation of liver-specific cellular response to ethanol *in vitro* in Hep G2 cells. *Toxicol. in Vitro* 12:111–122.
- Carbo, N., Costelli, P., Baccino, F.M., Lopez-Soriano, F.J., and Argiles, J.M. (1999). Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumour growth in a rat tumour model. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 254:739–743.
- Chis, I.C., Ungureanu, M.I., Marton, A., Simedrea, R., Muresan, A., Postescu, I-D., and Decea, N. (2009). Antioxidant effects of a grape seed extract in a rat model of diabetes mellitus. *Diabetes Vascular Dis. Res.* 6:200–204.
- Coskun, Y., and Huseyin, G. (1988). The effect of dimethyl sulphoxide (DMSO) after reperfusion in liver ischemia (An Electron Microscopical Study). *T. Klin. J. Med. Sci.* 18:240–244.
- Das, N.P. (1971). Studies on flavonoid metabolism: Absorption and metabolism of (+)-catechin in man. *Biochem. Pharma.* 20(12):3435–3445.
- Fremont, L., Belguendouz, L., and Delpal, S. (1999). Antioxidant activity of resveratrol and alcohol free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sci.* 64: 2511–2521.
- Fremont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 66(8):663–673.

- Fukui, Y. (1980). Formation of multinuclear cells induced by Dimethyl sulfoxide: Inhibition of cytokinesis and occurrence of novel nuclear division in dictyostelium cells. *J. Cell Biol.* 6:181-189.
- Gehm, B.D., McAndrews, J.M., Chien, P.Y., and Jameson, J.L. (1997). Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 94:14138-14143.
- Goldberg, D.M., Hamm, S.E, and Parkes, J.G. (1995). Beyond alcohol: Beverage consumption and cardiovascular mortality. *Clin Chim Acta*, 237:155-187.
- Haider, U.G., Sorescu, D., Griending, K.K., Vollmar, A.M., and Dirsch, V.M. (2003). Resveratrol increases serine15-phosphorylated but transcriptionally impaired p53 and induces a reversible DNA replication block in serum-activated vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharma.* 63:925-932.
- Hayat, M.A. (2000). Principles and techniques of electron microscopy; biological applications, 4th ed. Cambridge university press, pp 545.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.U., Thomas, C.F., Beecher, C.W.W., Fong, H.H.S., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G, Moon, R.C., and Pezzuto, J.M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Sci.* 275:218-220.
- Koch O.R., Roatta de Conti L.L., Luis, P., Bolaifos, L.P., and Stoppani A.O.M. (1978). Ultrastructural and Biochemical Aspects of Liver Mitochondria During Recovery From Ethanol-Induced Alterations: Experimental Evidence of Mitochondrial Division. *Am. J. Pathol.* 90:325-344.
- Kovach S. (2007). The untapped healing potential DMSO. *Life Extension*, July, pp 62-68.
- Kuhnle, G., Spencer, J.P.E., George C. G., Hagen, S. H., Debnam, E.S., Srai, S.K.S., Rice-Evans, C., and Hahn, U. (2000). Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 272:212-217.
- Lancon, A., Delmas, D., Osman, H., Thenot, J.-P., B. Jannin, B., and Latruffe, N. (2004). Human hepatic cell uptake of resveratrol: Involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 316:1132-1137.
- Lane, B.P., and Lieberc, S. (1966). Ultrastructural alterations in human hepatocytes following ingestion of ethanol with adequate diets. *Am. J. Pathol.* 49(4):593-603.

- Lee, T.J., Kim, O.H., Kim, Y.H., Lim, J.H., Kim, S., Park, J.W., and Kwon, T.K. (2006). Quercetin arrests G2/M phase and induces caspase-dependent cell death in U937 cells. *Cancer Lett.* 240:234-242.
- Lu, R., and Serrero, G. (1999). Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells. *J. Cell Physiol.* 179:297-304.
- Matthaus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *J. Agric. Food Chem.* 50:3444-3452.
- Mazza, G., Kay, C.D., Cottrell, T., and Holub, B.J. (2002). Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *J. Agric. Food Chem.* 50:7731-7737.
- Meng, X., Maliakal, P., Lu, H., Lee, M.-J., and Yang, C.S. (2004). Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *J. Agri. Food Chem.* 52:935-942.
- Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., and Scaccini, C. (2002). Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J. Agric. Food Chem.* 50(20):5735-5741.
- Paul, B., Chereyathmanjiyil, A., Masih, I., Chapuis, L., and Benoit, A. (1998). Biological control of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grapevine and elicitation of stilbene phytoalexin (resveratrol) by a soil bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* 165:65-70.
- Pace-Asciak, C.R., Hahn, S., Diamandi, E.P., Soleas, G., and Goldberg, D.M. (1995). The red wine phenolics *trans*-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta.* 235:207-219.
- Pace-Asciak, C.R., Rounova, O., Hahn, S.E., Diamandis, E.P., and Goldberg, D.M. (1996). Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects, *Clin. Chim. Acta.* 246:163-182.
- Perez-Serradilla, J.A., and de Castro, L. (2008). Role of lees in wine production: A review. *Food Chem.* 111:447-456.
- Saari, J.T., and Medeiros, D.M. (1991). Effect of dimethyl sulfoxide on enlarged hearts of copper-deficient rats. *Biol. Trace Element Res.* 31:249-263.

- Salafia, S.J. (1999). Why wine is good for your brain. *New Scientist* # 2168. Available at www.newscientist.com/ns/990109/newsstory8.html. Accessed on 10-01-2010.
- Sanan, D.A., Fan, T.J., Bemadom, A., and Taylor, J.M. (1997). Hepatic lipase is abundant on both hepatocyte and endothelial cell surfaces in the liver. *J. Lipid Res.* 58:1002-1013.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., and Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grapes and related polyphenolic constituents. *Food Res. Int.* 32:407-412.
- Serafini, M., Maiani, G., and Ferro-Luzzi, A. (1998). Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J. Nutr.* 128:1003-1007.
- Shin, M.I., Cho, I.J., and Kim, S.G. (2009). Resveratrol protects mitochondria against oxidative stress through AMPK-mediated GSK3 β inhibition downstream of poly (ADPribose) polymerase-LKB1 pathway. *Mol. Pharma.* 76(4):884-895.
- St. Leger, A.S., Cochrane, A.L., and Moore, F. (1979). Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet.* 1:1017-1020.
- Surh, Y-J., Hurh, Y-J., Kang, J-Y., Lee, E., Kong, G., and Lee, S.J. (1999). Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Lett.* 140:1-10.
- Swain, T., and Hills, W.E. (1959). The phenolics contents of prunus domestica I.-The quantitative analysis of phenolics constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10:63-8.
- Tedesco, I., Russo, M., Russo, P., Iacomino, G., Russo, G.L., Carraturo, A., Faruolo, C., Moio, L., and Palumbo, R. (2000) Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *J. Nutr. Biochem.* 11:114-119.
- Teissedre, P.L., and Landrault, N. (2000). Wine phenolics: Contribution to dietary intake and bioavailability. *Food Res. Int.* 33 (6):461-467.
- Turathum, B., Saikhun, K., Sangsuwan, P., and Kitiyanant, Y. (2010). Effects of vitrification on nuclear maturation, ultrastructural changes and gene expression of canine oocytes. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8:70. Open Access, available at <http://www.rbej.com/content/8/1/70>.
- Vilaro, S., and Llobera, M. (1988). Uptake and metabolism of intralipid by rat liver: An Electron-microscopic study 1. *J. Nutr.* 118:932-940.

- Vitrac, X., Desmoulière, A., Brouillaud, B., Krisa, S., Deffieux, G., Barthe, N., Rosenbaum J., and Mérillon, J-M. (2003). Distribution of [14 C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci.* 72(20):2219-2233.
- Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M.H., Oatis, J.O., Jr., and Walle, U.K. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab. Dispos.* 32:1377-1382.
- Wenzel, E., Soldo, T., Erbersdobler, H., and Somoza, V. (2005). Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 49:482-494.
- Wischnitzer, S. (1981). Introduction to electron microscopy, 3rd ed. Pergamon Press inc., Maxwell House, New York, U.S.A. pp.263-276.
- Wren, A.F., Cleary, M., Frantz, C., Melton, S., and Norris, L. (2002). 90-day oral toxicity study of a grape seed extract (IH636) in rats. *J. Agric. Food Chem.* 50:2180-2192.
- Wenzel, E., and Somoza, V. (2005). Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol. Nutr. Food Res.* 49:472-481.
- Wolter, F., Akoglu, B., Clausnitzer, A., and Stein, J. (2001). Downregulation of the Cyclin D1/Cdk4 Complex Occurs during Resveratrol-Induced Cell Cycle Arrest in Colon Cancer Cell Lines. *J. Nutr.* 131:2197-2203.
- Wu, S-L., Sun, Z-J., Yu, L., Meng, K-M., Qin, X-L., and Pan, C-E. (2004). Effect of resveratrol and in combination with 5-FU on murine liver cancer. *World J. Gastroenterol.* 10:3048-3052.
- Xi, J., Wang, H., Mueller, R.A., Norfleet, E.A., and Xu, Z. (2009). Mechanism for resveratrol-induced cardioprotection against reperfusion injury involves glycogen synthase kinase 3 β and mitochondrial permeability transition pore. *Eur. J. Pharma.* 604:111-116.
- Yang, J., Martinson, T.E., and Liu, R.H. (2009). Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chem.* 116:332-339.
- Ying-Bao, Y., and PIAO Ying-Jie, P. (2003). Effects of resveratrol on secondary damages after acute spinal cord injury in rats. *Acta. Pharma. Sin.* 24:703-710.
- Yoshida, M., Sakai, T., Hosokawa, N., Marui, N., Matsumoto, K., and Fujioka, A. (1990). The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEBS Lett.* 260:10-13.
- Yu, C., Shin, Y.G., Chow, A., Li, Y., Kosmeder, J.W., Lee, Y.S., Hirschelman, W.H., Pezzuto, J. M., Mehta, R.G., and van Breemen, R.B. (2002). Human, Rat, and mouse metabolism of resveratrol. *Pharm. Res.* 19:1907-14.

Yu, L., Sun, Z-J., Wu, S-L., and Pan, C-E. (2003). Effect of resveratrol on cell cycle proteins in murine transplantable liver cancer. *World J. Gastroenterol.* 9:2341-2343.

Yunoki, K., Sasaki, G., Tokuji, Y., Kinoshita, M., Nato, A., Aida, K., and Ohnishi, M. (2008). Effect of dietary wine pomace extract and oleanolic acid on plasma lipids in rats fed high-fat diet and its DNA microarray analysis. *J. Agric. Food Chem.* 56:12052-12058.

บทที่ 6

อิทธิพลผลิตภัณฑ์องุ่นแดงต่อความเป็นพิษและการเพิ่มจำนวนของเซลล์

Effects of Red Grape Products on Cytotoxicity and Cell Proliferation

6.1 คำนำ

สารประกอบในองุ่นได้รับความนิยมมากขึ้นเนื่องจากมีประโยชน์ต่อสุขภาพ ด้วยองุ่นแดงมีสารประกอบฟีนอลิก (phenolics) ปริมาณสูง ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง reactive oxygen species ที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidation) และทำลาย ดีเอ็นเอ (DNA) โปรตีน (protein) และไขมัน (lipid) ในเซลล์และเนื้อเยื่อได้ (Fulda and Debatin, 2006; Potter, 1997) สารประกอบฟีนอลิก รวมทั้งที่สกัดจากองุ่นพบว่ามีความสำคัญคือ เรสเวอราทรอล (resveratrol) ที่สามารถลดการเปลี่ยนเซลล์ให้เป็นเซลล์ก้อน (neoplastic) ลดการเจริญเติบโต ชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ปรับเปลี่ยนวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) และ รบกวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ของเซลล์มะเร็ง ช่วยลดอุบัติการณ์ของการพัฒนาของมะเร็งที่ถูกชักนำโดยสารก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง (Katsuzaki et al., 2003; Clement et al., 1998; Potter, 1997; Brownson et al., 2002; Dong, 2000) สารประกอบในสารสกัดองุ่นแสดงการเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) และต่อต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (cell proliferation) (Davila, 1998; Soils et al., 1993) องุ่นแดงจึงเป็นที่นิยใช้ผลิตไวน์และบดอัดเม็ดเป็นแคปซูลจำหน่ายเพื่อการบริโภคเป็นอาหารเสริมหรือยาอีกด้วย

สารสกัดจากกากขององุ่น (grape pomace extract, GPE) และไวน์องุ่น (grape wine, GWI) ยังขาดข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในด้านคุณสมบัติทางชีววิทยา รวมถึง การต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง ไวน์และกาก (เปลือกผลและเมล็ด) องุ่นแดงสายพันธุ์ชिरาซ (Shiraz) ซึ่งปลูกในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีจึงได้รับความสนใจมาศึกษาเกี่ยวกับการป้องกันมะเร็ง โดยได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากองุ่นด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติและฤทธิ์ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งจากหนู เซลล์สายพันธุ์ไมอีโลมา (myeloma; P3X63Ag8.653) ซึ่งเป็นมะเร็งเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดผลิตภูมิคุ้มกันเป็นต้นแบบการทดลอง

6.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของไวน์ (GWI) และสารสกัดหยาบจากกากองุ่น (grape pomace extract, GPE) สายพันธุ์ชिरาซ ด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) และต่อการเพิ่มจำนวน (cell proliferation) ของเซลล์สายพันธุ์/เซลล์มะเร็ง

6.3 อุปกรณ์และวิธีการ

6.3.1 สารเคมีและเครื่องมือ

l-glutamine fetal bovine serum (FBS) penicillin-streptomycin 10000IU และ อาหาร RPMI 1640 (ประกอบด้วย l-glutamine ไม่มี sodium bicarbonate) และ 0.4% trypan blue ซื้อจากบริษัท Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA น้ำ ultrapure ได้มาจากการกรองผ่านเครื่อง Milli-Q system, Millipore Corp., Temecula, CA, USA Dimethyl sulfoxide (DMSO) ซื้อมาจาก Riedel-deHaen, Seelze, Germany 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) resveratrol (3,5,4'-*trans*-trihydroxystibene) และ sodium bicarbonate ซื้อมาจาก Sigma Aldrich Chemicals, Inc., St.Louis, MO, USA สารเคมีทั้งหมดใช้เกรดวิเคราะห์และเกรดสำหรับเลี้ยงเซลล์

6.3.2 การเตรียมสารสกัดหยาบจากก้อนและไวน์

แยกกากก้อนอบแห้งที่อุณหภูมิ 4-10 °C และสกัดด้วย 70% ethanol (Universal Extractor, Buchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) ระเหยสารสกัดกากก้อนและไวน์ (Buchi R-250 evaporator, Buchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) ทำแห้งด้วย lyophilizer (Labconco Corp., Kansas City, USA) และเก็บสารสกัดแห้งของกากก้อน (กำหนดให้เป็น GPE) และของไวน์ (กำหนดให้เป็น GWI) ที่อุณหภูมิ -80 °C สารละลายมาตรฐานเรสเวราทรอล (resveratrol – RES) เตรียมใน 0.01% (v/v) DMSO ส่วนไวน์เป็นผลิตภัณฑ์ของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6.3.3 การเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์

เซลล์มะเร็ง/สายพันธุ์ myeloma (P3X63Ag8.653, ATCC-CRL 1580) ของหนูเมาส์ BALB/c (ได้รับอนุเคราะห์จาก National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA)) เซลล์เลี้ยงในสารละลาย RPMI 1640, 10% heat-inactivated FBS, 1% L-glutamine, และ 1% penicillin-streptomycin 10000 U/ml 5×10^5 /ml บ่มที่ 37 °C, 5% CO₂ ตรวจสอบการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยสี trypan blue

6.3.4 ความเป็นพิษ (Cytotoxicity) โดย Brine shrimp lethal assay (BSLA)

วิเคราะห์ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี Brine Shrimp Lethal Assay (BSLA) (Parra, et al., 2001) โดยเตรียมน้ำทะเลเทียม (3.8% NaCl) ในกล่องซึ่งกันเป็น 2 ช่องไม่เท่ากัน เพาะกุ้งฝอย (brine shrimp) โดยใส่ไข่แห้ง (cysts) ในช่องเล็ก ปิดช่องนี้เพื่อกันแสงด้วยกระดาษดำ เลี้ยง brine shrimp ที่ 25 °C ประมาณ 24 ชั่วโมง ได้ตัวอ่อน nauplii ส่องไฟที่ช่องใหญ่เพื่อคัดตัวอ่อน nauplii ออกจากที่เพาะไข่ (Figure 6.1)

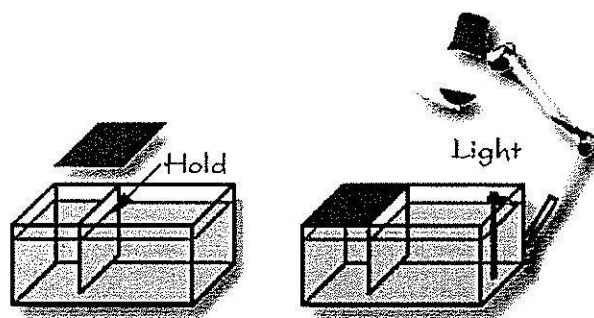


Figure 6.1 The two-chamber container with a perforate divider. The smaller compartment was for brine shrimp egg hatching. The larger compartment was for the nauplii, migrated toward the light.

ถ่ายย้าย 10 nauplii ใส่ในหลุมของ 24-well plate ซึ่งบรรจุ 4 ml น้ำทะเลเทียม ใส่สารสกัดจากองุ่น (GPE), ไวน์ (GWI) และ เรสเวอราทรอล (RES) ซึ่งละลายใน 0.01% DMSO ที่ 10 - 1000 $\mu\text{g/ml}$ เลี้ยงต่อ และนับจำนวน nauplii ดาย ที่ 6, 12, และ 24 ชั่วโมง คำนวณหา % corrected mortality ด้วย Abbot's formula

$$\% \text{ Corrected mortality} = \frac{\text{Observed treatment mortality} - \text{Control mortality}}{100 - \text{Control mortality}} \times 100$$

6.3.5 การวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell proliferation) โดย MTT assay

วิเคราะห์การเพิ่มจำนวนของเซลล์สายพันธุ์ myeloma (P3X63Ag8.653) ด้วยวิธี MTT assay (McAtee and Davis, 1994) ตรวจการเปลี่ยนสีของ tetrazolium bromide จากสีเหลืองเป็นสีม่วงของ formazan โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ succinate dehydrogenase ในไมโทคอนเดรียของเซลล์มีชีวิต (Hansen, Nielsen and Berg, 1989) เลี้ยง 5×10^4 เซลล์/100 μl /หลุม (96-well plates) เติมสารสกัด GPE / GWI / resveratrol ที่ความเข้มข้นระหว่าง 10-1000 $\mu\text{g/ml}$ บ่มเป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ที่ 37 °C, 5%CO₂ เติมสารละลาย 50 μl MTT (5mg/ml ใน phosphate-buffer saline, pH 7.4) และบ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง ดูดสารอาหารออก และเติม 100 μl DMSO เขย่าเบา ๆ จนตะกอน formazan ละลายหมด วัดสีที่ความยาวคลื่น 570 nm ค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงแสดงถึงการลดลงของเซลล์มีชีวิต ใช้ RPMI-1640 และ resveratrol เป็นสารควบคุม ทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหาค่า half maximal inhibitory

concentration (IC_{50}) จากค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของตัวอย่าง (ปริมาณน้อยที่สุดของตัวอย่างที่ลดค่าการดูดกลืนแสงได้ 50%)

6.3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างโดย Duncan's New Multiply Range Test (DMRT) ความน่าจะเป็น $p < 0.05$

6.4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

6.4.1 Cytotoxic effect

ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของสารสกัดจากองุ่น (GPE), ไวน์ (GWI) และ เรสเวอราทรอล (RES) ต่อ brine shrimp เปรียบเทียบ cytotoxicity เรียงระดับได้ดังนี้ $GPE < GWI < RES$ อย่างมีนัยสำคัญ และขึ้นกับความเข้มข้นและเวลาที่ได้รับสาร (dose and time dependent) (Table 6.1) จะเห็นได้ว่า RES ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์แสดงพิษสูงกว่า GPE มาก ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) ความเป็นพิษที่ทำให้ brine shrimp ตาย 50% หรือ lethal concentration 50% (LC_{50}) ของตัวอย่างทั้งสาม ดังปรากฏใน Table 6.2

ความเป็นพิษต่อเซลล์ของ GPE มีค่า LC_{50} ก่อนข้างสูงต้องใช้สารถึง 513 $\mu\text{g/ml}$ จึงทำให้ brine shrimp ตาย 50% ที่ 6 ชั่วโมง และความเป็นพิษต่อเซลล์ของ RES มีค่า LC_{50} ต่ำที่สุด แสดงว่า GPE สารสกัดหยาบมีความเป็นพิษน้อยกว่า RES จึงต้องใช้สารสกัดในปริมาณมากจึงแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่ GWI ที่มีสารปะปนน้อยกว่า แสดงความเป็นพิษมากกว่า GPE และ GWI แสดงพิษค่อนข้างคงที่หลัง 12 ชั่วโมง คือ LC_{50} ระหว่าง 12 $\mu\text{g/ml}$ (12 ชม) - 10 $\mu\text{g/ml}$ (24 ชม) ส่วน RES เป็นบริสุทธิ์ ปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถแสดงพิษต่อเซลล์ได้ในระดับเท่ากัน และทำให้ brine shrimp ตายหมดที่ 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารตัวอย่างทั้ง 3 เพิ่มขึ้นตามเวลาการสังเกต และที่ 24 ชั่วโมง ความเป็นพิษของ GPE เพิ่มขึ้น 18 เท่า และ 13 เท่า ที่ 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ และ GPE ที่ 24 ชั่วโมงมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า GWI ประมาณ 3 เท่า

Table 6.1 The cytotoxic effects of grape pomace extract, grape wine and resveratrol. The mortality (%) of *Aurelia salina* was obtained by BSLA.

Time (h)	Conc. (μ g/ml)	% Mortality			
		Control	Grape pomace extract	Grape wine	Resveratrol
6	0	0 a			
	10		3.34 ± 0.82 a	11.67 ± 0.98 bc	61.67 ± 0.89 f
	50		8.34 ± 1.21 ab	28.33 ± 0.75 d	66.67 ± 1.21 fg
	100		10 ± 1.10 bc	43.33 ± 0.82 e	76.67 ± 1.51 h
	200		20 ± 1.10 d	55 ± 0.55 e	99.8 ± 0.75 i
	500		31.67 ± 1.03 d	70 ± 0.89 g	100 ij
	1000		46.67 ± 1.37 e	78.33 ± 0.75 h	100 ij
12	0	7.27 ± 0.98 a			
	10		8.34 ± 1.38 a	51.09 ± 0.55 c	76.37 ± 0.75 e
	50		12.72 ± 1.26 a	67.39 ± 0.63 d	87.28 ± 0.75 f
	100		25.45 ± 1.60 b	76.45 ± 0.75 e	94.55 ± 0.55 g
	200		36.36 ± 1.33 bc	94.57 ± 0.55 g	100 h
	500		40.00 ± 1.05 c	96.38 ± 0.52 g	100 h
	1000		81.24 ± 0.75 f	98.18 ± 0.41 gh	100 h
24	0	27.65 ± 0.75 a			
	10		38.34 ± 1.05 a	51.35 ± 0.89 ab	100 g
	50		59.81 ± 0.55 bc	59.46 ± 0.84 bc	100 g
	100		81.24 ± 0.75 d	86.49 ± 0.75 de	100 g
	200		89.28 ± 0.52 e	100 g	100 g
	500		91.96 ± 0.55 f	100 g	100 g
	1000		97.32 ± 0.41 f	100 g	100 g

The corrected mortality (%) presented in this table was calculated by the Abbott's formula. Data was not estimated (n.a.). All values statistically different (mean $\pm$ SD, n = 6, p < 0.05, alphabets: a-j).

Table 6.2 The comparison of LC_{50} values of cytotoxicity of among grape pomace extract, grape wine and resveratrol on brine shrimp at 6, 12 and 24 hours ($p < 0.05$).

	LC_{50} (ug/ml)		
	6 H	12 H	24 H
Grape pomace extract	512.86	371.53	28.18
Grape wine	158.49	12.30	10.23
Resveratrol	2.40	1.41	n.a.

6.4.2 Cell proliferation effect

ความเป็นพิษของสารสกัด GPE และ GWI ต่อเซลล์ mouse myeloma (เซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาว) วิเคราะห์จากกิจกรรมการเผาผลาญของเซลล์ที่มีชีวิตสามารถเปลี่ยนของสารสีเหลือง tetrazolium salt ที่ละลายในน้ำ ให้เป็นสีม่วงของ formazan ที่ไม่ละลาย ซึ่งวัดได้ด้วยความยาวคลื่น 570 nm (Hansen, Nielsen and Berg, 1989) GPE, GWI และ RES ที่ความเข้มข้นระหว่าง 10-1000 $\mu\text{g/ml}$ บ่มกับเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาว myeloma เป็นเวลา 6 – 24 ชั่วโมง ที่ 37 °C แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์หรือต่อการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ในลักษณะขึ้นกับความเข้มข้น (dose-dependent fashion) ของสาร และ ขึ้นกับเวลาในการบ่ม (time-dependent fashion) (Table 6.3 และ Figure 6.2) ที่ความเข้มข้นสาร 1000 $\mu\text{g/ml}$ บ่มเซลล์กับสารที่ 6 ชั่วโมง เซลล์ myeloma เจริญได้เป็นลำดับดังนี้ 39% สำหรับ GPE (2.5 เท่า) น้อยกว่าไม่มีสาร), 23% สำหรับ GWI (4.3 เท่า) และ 5% สำหรับ RES (20 เท่า) บ่มเซลล์กับสารที่ 12 ชั่วโมง myeloma เจริญโดย 15% สำหรับ GPE (5 เท่า), 8% สำหรับ GWI (12 เท่า) และ 0% สำหรับ RES และ บ่มเซลล์กับสารที่ 24 ชั่วโมง เซลล์ myeloma เจริญโดย 10% สำหรับ GPE (9.5 เท่า), 4% สำหรับ GWI (24 เท่า) และ 0% สำหรับ RES

จะเห็นว่า ที่ความเข้มข้นสูง เป็นผลให้การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวต่ำลง และการบ่มระยะยาวทำให้ เซลล์รอดชีวิตน้อยลงเรื่อยๆ นั่นคือ เมื่อเปรียบเทียบ antiproliferation activity GPE และ GWI มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) สายพันธุ์ myeloma ทำให้ต้านต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ (antiproliferation) สายพันธุ์นี้จำนวนเซลล์ลดลงตามความเข้มข้นของ GPE, GWI, และ RES ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) antiproliferation activity ของสารต่อการเจริญของ myeloma cells เรียงลำดับได้ดังนี้ $RES > GWI > GPE$

Table 6.3 The toxic effects of grape pomace extract, grape wine, and resveratrol on cell proliferation activities of a mouse myeloma cell line by MTT assay

Time (H)	Conc. (ug/ml)	% Cell Proliferation			
		Untreated/ Control	Grape pomace extract	Grape wine	Resveratrol
6	0	99.92 $\pm$ 1.25 a			
	10		98.25 $\pm$ 1.23 a	95.36 $\pm$ 2.30 ab	92.86 $\pm$ 1.56 b
	50		80.12 $\pm$ 1.20 c	75.55 $\pm$ 1.26 cd	46.38 $\pm$ 2.35 e
	100		71.54 $\pm$ 2.25 d	63.87 $\pm$ 1.54 d	28.55 $\pm$ 2.42 f
	200		55.68 $\pm$ 2.63 e	47.20 $\pm$ 2.35 e	19.50 $\pm$ 2.66 gh
	500		45.26 $\pm$ 1.86 e	30.46 $\pm$ 2.41 f	11.12 $\pm$ 1.23 gh
	1000		38.78 $\pm$ 1.55 ef	22.56 $\pm$ 2.20 g	5.44 $\pm$ 1.45 g
12	0	96.32 $\pm$ 1.54 a			
	10		89.56 $\pm$ 1.23 ab	83.14 $\pm$ 2.35 b	63.24 $\pm$ 1.54 cde
	50		74.32 $\pm$ 1.45 c	65.32 $\pm$ 2.28 cd	34.44 $\pm$ 2.68 f
	100		63.25 $\pm$ 2.22 cde	58.56 $\pm$ 2.47 e	19.57 $\pm$ 2.66 gh
	200		31.45 $\pm$ 2.23 f	23.30 $\pm$ 1.85 g	16.57 $\pm$ 1.54 h
	500		20.48 $\pm$ 2.25 g	14.25 $\pm$ 1.54 hij	9.89 $\pm$ 1.23 jk
	1000		14.88 $\pm$ 1.54 hi	8.11 $\pm$ 1.26 jk	ND k
24	0	94.56 $\pm$ 1.28 a			
	10		80.46 $\pm$ 2.41 ab	72.16 $\pm$ 2.38 b	42.55 $\pm$ 2.84 d
	50		66.87 $\pm$ 1.58 b	57.84 $\pm$ 2.47 c	12.48 $\pm$ 1.25 e
	100		54.32 $\pm$ 1.45 c	40.23 $\pm$ 2.58 d	5.78 $\pm$ 1.98 h
	200		20.46 $\pm$ 2.32 e	15.20 $\pm$ 1.54 ef	2.33 $\pm$ 1.05 hi
	500		14.33 $\pm$ 2.21 ef	10.65 $\pm$ 1.34 g	ND i
	1000		9.56 $\pm$ 1.66 g	3.86 $\pm$ 1.68 h	ND i

All values statistically different (mean $\pm$ SD, n = 6, p < 0.05, alphabets: a-k).

ND, non detectable

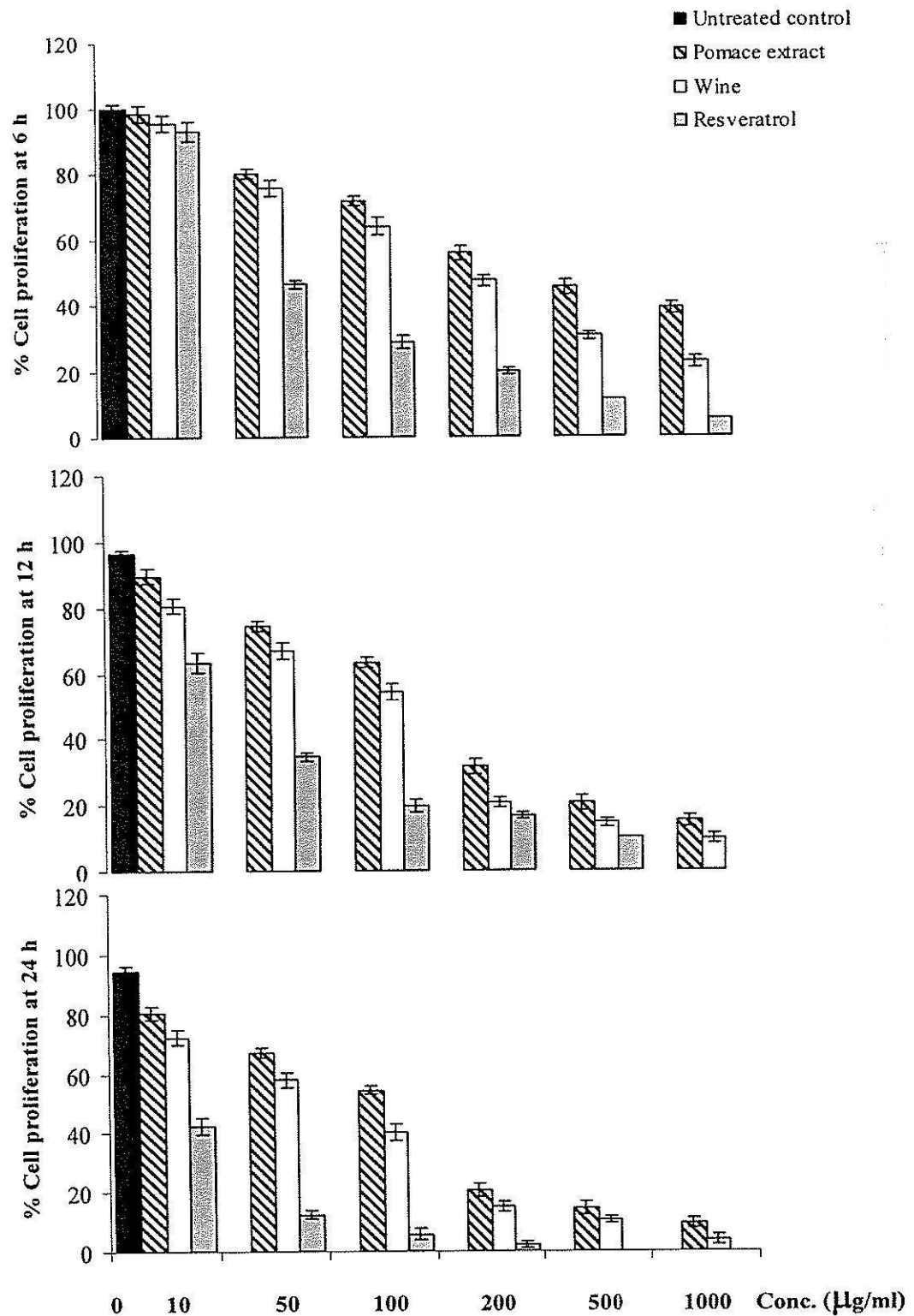


Figure 6.2 Antiproliferation effects of grape pomace extract, grape wine, and resveratrol (0-1,000 µg/ml) on mouse myeloma cell line at 6, 12, and 24 hours. Control cells were maintained in the vehicle for the indicated time periods. Data represent mean $\pm$ SD ($p < 0.05$) of three independent experiments.

ใน Table 6.4 เปรียบเทียบศักยภาพของฤทธิ์ต่อ antiproliferation activity ระหว่างสารต่อสาร โดยแสดงเป็นจำนวนเท่าของศักยภาพที่ความเข้มข้น 100 ug/ml เทียบกับเข้มข้น 200 ug/ml แสดงเปรียบเทียบให้เห็นว่าสารความเข้มข้นมากกว่า ทำให้เซลล์เจริญน้อยกว่า

Table 6.4 The efficacy of grape pomace extract, grape wine, and resveratrol on antiproliferation of myeloma cells was compared at the concentration at 100 ug/ml and 200 ug/ml.

Antiproliferation Activity				Antiproliferation Activity			
Concentration		Fold		Concentration		Fold	
100 ug/ml	6 H	12 H	24 H	200 ug/ml	6 H	12 H	24 H
RES > GPE	2.51	2.19	2.06	RES > GPE	1.82	1.22	1.23
RES > GWI	1.98	1.94	1.58	RES > GWI	1.52	1.09	1.15
GWI > GPE	1.27	1.13	1.31	GWI > GPE	1.19	1.12	1.07

Medial inhibitory concentration (IC_{50}) ความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ 50% เมื่อบ่มเซลล์กับสารนาน 6, 12, และ 24 ชั่วโมง พบว่า GWI สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ IC_{50} ความเข้มข้นน้อยกว่า GPE ส่วน IC_{50} ของ RES ซึ่งเป็นสารควบคุมใช้ความเข้มข้นน้อยที่สุด ค่า IC_{50} ของ GPE, GWI และ RES เปรียบเทียบใน Table 6.5 ได้ดังนี้

Table 6.5 The comparison of IC_{50} values of anti-proliferation of myeloma cells by grape pomace extract, grape wine and resveratrol at 6, 12 and 24 hours ($p < 0.05$).

	IC_{50} (ug/ml)		
	6 H	12 H	24 H
Grape pomace extract	371.54	131.83	75.86
Grape Wine	199.53	81.28	43.65
Resveratrol	63.10	21.38	6.03

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นชัดเจนว่า GPE และ GWI มีความเป็นพิษต่อ brine shrimp ซึ่งใช้เป็นสัตว์ตัวแทนสัตว์ปกติน้อยกว่า ความเป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ myeloma (Table 6.2 และ Table 6.4) และพิษต่อเซลล์ myeloma มากขึ้นตามเวลาที่เซลล์ได้รับสารอย่างมีนัยสำคัญ แต่พิษของ GPE แสดงออกน้อยกว่า RES ซึ่งเป็นสารสกัดบริสุทธิ์

มีหลักฐานการศึกษา ระบุว่าสาร phenolic compounds ในไวน์และสารสกัดจากองุ่น ความสามารถ ลดจำนวนของเซลล์สายพันธุ์/มะเร็งของมนุษย์หลายสายพันธุ์ (Yoshida et al., 1990; Bianchini and Vainio, 2003; Haider et al., 2003; Alkhalaf, 2007; Dechsupa et al., 2007;) องค์ประกอบสาร phenolic compounds และคุณสมบัติด้านการเกิดออกซิเดชันในสารสกัดองุ่นที่แตกต่างกันมีผลต่อการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งแตกต่างกัน (Mertens-Talcott, Percival and Talcott, 2008) ซึ่งก็สอดคล้องกับการวิจัยนี้ และการศึกษาเมื่อเร็ว ๆ นี้พบว่าสาร proanthocyanidin จากสารสกัดเมล็ดองุ่น (grape seed extract, GSE) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (CaCo2 cells) (Engelbrecht et al., 2007) และยับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer cells) (Jo, Mejia and Lila, 2006) proanthocyanidin และ catechin ในกากองุ่น ไวน์ และเมล็ด ประกอบด้วย condensed tannin monomer ซึ่งจับกับไอออนของเหล็ก (ferric) เพื่อยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระโดยการเปลี่ยนของธาตุโลหะ (transition metal-catalyzed free radical formation) (Rice-Evans, Miller, and Paganga, 1997; Khokhar and Owusu-Apenten, 2003) เนื่องจากการควบคุมการดูดซึมเหล็กเป็นวิกฤตต่อการมีชีวิตของเซลล์มนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่น ซึ่งไม่มีวิถีทางสรีระวิทยาในการขับออก (Andrews, 1999) และ free iron เป็น catalyzer ที่มีศักยภาพให้ oxygen free radicals (Fujita et al., 2007) ferric ions ในกระแสเลือดถูกรีดิวซ์โดย superoxide และผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ ferrous จะถูกออกซิไดส์อีกครั้งโดย peroxide ได้เป็น ferric ion และ hydroxyl radical ซึ่งไปทำลายชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ทุกชนิด (Weinberg, 1999) antioxidants ที่เพิ่มขึ้นโดยสาร tannin จึงอาจเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ (Khokhar and Owusu-Apenten, 2003).

Resveratrol เป็นสารในกลุ่ม stilbene และพบในไวน์ เปลือกของผลองุ่น และใบองุ่นซึ่งมีรายงานวิจัยคุณสมบัติทางชีววิทยาของ RES ที่มีหลากหลาย รวมถึง การต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง การป้องกันหลอดเลือดหัวใจ การต้านการเกิดออกซิเดชัน และการยับยั้งการเกาะตัวกันของเกล็ดเลือด รวมถึง คุณสมบัติในการต้านการอักเสบ (Padilla et al., 2005) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า RES ทำให้เซลล์หยุด cell cycle arrest ซึ่งเซลล์จะไม่แบ่งตัว (Bhat, Kosmeder, and Pezzuto, 2001) ในการทดลองนี้ได้ใช้ RES เป็น positive control เพื่อเปรียบเทียบกับสาร GPE และ GWI ก็พบเช่นเดียวกันว่า RES, GPE และ GWI ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากองุ่นของฟาร์ม มทส สามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์/การเพิ่มจำนวนเซลล์สายพันธุ์/มะเร็ง เม็ดเลือดขาว myeloma ได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสาร RES ในผลิตภัณฑ์องุ่นสามารถยับยั้งกิจกรรมของ DNA polymerase และ ยับยั้งการสังเคราะห์ deoxyribonucleotide ผ่านทางวิถี scavenge ของ อนุมูล tyrosine ของ ribonucleotide reductase เป็นเหตุให้หยุดการแบ่งเซลล์ (Bhat, Kosmeder and Pezzuto, 2001)

นอกจากนี้สาร phenolics ในผลิตภัณฑ์องุ่น (บทที่ 4) อาจแสดงถึงความแตกต่างของปริมาณสาร phenolics ใน กากองุ่น เมล็ดองุ่น และไวน์ ที่มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติ radical scavenging และ

อาจมีความสัมพันธ์สนับสนุนคุณสมบัติการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ myeloma ของสารสกัดจากกากองุ่นและไวน์ในการทดลองนี้ได้

6.5 สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้ประเมินผลได้ว่าสารสกัดกากองุ่นและไวน์สายพันธุ์ชिरาส ซึ่งเป็นผลิตผลจากฟาร์มมทส เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีววิทยา มีผลหยุดการแบ่งเซลล์/การเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว myeloma ซึ่งใช้เซลล์ต้นแบบในการทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญ ฤทธิ์ของสารสกัดกากองุ่นและไวน์วิเคราะห์ระหว่าง 6 – 24 ชั่วโมง โดยใช้เปรียบเทียบกับฤทธิ์ของเรสเวอราทรอล สารต้นแบบที่บริสุทธิ์ซึ่งเป็นที่ทราบแล้วว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์มะเร็งหลายชนิด อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ของสารสกัดกากองุ่นน้อยกว่าของไวน์และต้องใช้ในปริมาณมากในการทำให้เกิดพิษ ซึ่งเป็นปกติที่ bioactive compounds ในปริมาณมากจึงแสดงพิษ ในทางเภสัชวิทยา (pharmacology) สารแสดงพิษในปริมาณน้อย แต่ในทางพิษวิทยา (toxicology) สารแสดงพิษในปริมาณมาก การวิจัยนี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า กากองุ่นและไวน์ น่าจะสามารถใช้เป็นผลิตภัณฑ์ยับยั้งหรือป้องกันการเกิดมะเร็งเซลล์เม็ดเลือดขาวได้โดยมีพิษต่อเซลล์ปกติน้อย น่าจะได้ศึกษาสกัดแยกหาสารอื่นๆ ในกลุ่มสาร phenolics เพื่อแยกสาร active compound ต่างๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็ง ได้เมื่อใช้ในปริมาณไม่มาก และใช้ได้กับเซลล์มะเร็งอื่นๆ และน่าจะนำไปปรับปรุงรูปแบบผลิตภัณฑ์ให้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ เพื่อป้องกันหรือเป็นยารักษามะเร็งได้เป็นอย่างดี เช่น การบรรจุเป็นแคปซูลกากองุ่นและไวน์แห้งที่ปราศจากแอลกอฮอล์ ฯลฯ เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- Alkhalaf, M. (2007). Resveratrol-induced apoptosis is associated with activation of p53 and inhibition of protein translation in T47D human breast cancer cells. *Pharma*. 80:134-143.
- Andrews, N. (1999). Disorders of Iron Metabolism. *New Engl. J. Med.* 341:1986-1995.
- Bhat, K.P., and Pezzuto, J.M. (2001). Resveratrol exhibits cytostatic and antiestrogenic properties with human endometrial adenocarcinoma (Ishikawa) cells. *Cancer Res.* 61:6137-6144.
- Bianchini, F., and Vainio, H. (2003). Wine and resveratrol: Mechanisms of cancer prevention? *Eur. J. Cancer Prev.* 12:417-425.
- Brownson, D.M., Azios, N.G., Fuqua, B.K., Dharmawardhane, S.F., and Mabry, T.J. (2002). Flavonoid effects relevant to cancer. *J. Nutr.* 132:3482S-3489S.
- Clement, M.V., Hirpara, J.L., Chawdhury, S.H., and Pervaiz, S. (1998). Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood*. 92:996-1002.
- Davila, J.C. (1998) Predictive value of *in vitro* model systems in toxicology. *Annu. Rev. Pharma Toxicol.* 38:63-96.
- Dechsupa, S., Kothan, S., Vergote, J., Leger, G., Martineau, A., and Berangeo, S. (2007). Quercetin, Siamois 1 and Siamois 2 induce apoptosis in human breast cancer MDA-MB-435 cells xenograft in vivo. *Cancer Biol. Ther.* 6:56-61.
- Dong, Z. (2000). Effects of food factors on signal transduction pathways. *Biofactors*. 12:17-28.
- Engelbrecht, A.M., Mattheyse, M., Ellis, B., Loos, B., Thomas, M. Smith, R. Peters, S., Smith, C., and Myburgh, K. (2007). Proanthocyanidin from grape seeds inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces apoptosis in a coloncancer cell line. *Cancer Lett.* 258:144-153.
- Fulda, S., and Debatin, K.M. (2006). Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival. *Cancer Detect. Prev.* 30:217-223.
- Fujita, N., Horiike, S., Sugimoto, R., Tanaka, H., Iwasa, M., Kobayashi, Y., Hasegawa, K., Ma, N., Kawanishi, S., Adachi, Y., and Kaito, M. (2007). Hepatic oxidative DNA damage correlates with iron overload in chronic hepatitis C patients. *Free Radical Bio. Med.* 42:353-362.
- Haider, U.G., Sorescu, D., Griendling, K.K., Vollmar, A.M., and Dirsch, V.M. (2003). Resveratrol increases serine 15-phosphorylated but transcriptionally impaired p53 and induces a

reversible DNA replication block in serum-activated vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 63:925-932.

Hansen, M.B., Nielsen, S.E., and Berg, K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods.* 119:203-210.

Jo, J.Y., Mejia, E.G., and Lila, M.A. (2006). Cytotoxicity of bioactive polymeric fractions from grape cell culture on human hepatocellular carcinoma, murine leukemia and non-cancerous PK15 kidney cells. *Food Chem. Toxicol.* 44:1758-1767.

Katsuzaki, H., Hibasami, H., Ohwaki, S., Ishikawa, K., Imai, K., Date, K., Kimura, Y., and Komiya, T. (2003). Cyanidin 3-O-beta-D-glucoside isolated from skin of black Glycine max and other anthocyanins isolated from skin of red grape induce apoptosis in human lymphoid leukemia Molt 4B cells. *Oncol. Rep.* 10:297-300.

Khokhar S, and Owusu-Apenten, R. (2003). Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure-activity relations. *Food Chem.* 81:133-140.

McAtee, J. A., and Davis, J. (1994). Basic cell culture technique and maintenance of cell lines. In J. M. Davis (Ed.). *Basic cell culture: a practical approach* (pp. 126-130). Oxford: IRL Press.

Mertens-Talcott, S. U., Percival, S. S., and Talcott, S. T. (2008). Extracts from red muscadine and cabernet sauvignon wines induce cell death in MOLT-4 human leukemia cells. *Food Chem.* 108:824-832.

Padilla, E., Ruiz, E., Redondo, S., Moscoso, A.G., Slowing, K., and Tejerina, T. (2005). Relationship between vasodilation capacity and phenolic content of spanish wines. *Eur. J. Pharmacol.* 517:84-91.

Parra, A. L., Yhebra, R. S. Sardiñas, I. G., and Buela, L. I. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomed.* 8:395-400.

Rice-Evans, C., Miller, N., and Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2:152-159.

Potter, J. D. (1997). Cancer prevention: epidemiology and experiment. *Cancer Lett.* 114:7-9.

Solis, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P., and Phillipson, J.D. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *J. Med. Plant Res.* 59:250-252.

Weinberg, E. (1999). Iron loading and disease surveillance. *Emerg. Infect. Dis.* 5:346-52.

Yoshida, M., Sakai, T., Hosokawa, N., Marui, N., Matsumoto, K., and Fujioka, A. (1990). The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEBS Lett.* 260:10-13.

บทที่ 7

อิทธิพลของผลิตภัณฑ์จากองุ่นแดงต่อโปรแกรมการตายของเซลล์ไมอีโลมา

Effect of Red Grape Products on Myeloma Cell Apoptosis

7.1 คำนำ

Apoptosis (programmed cell death) เป็นตอบสนองทางสรีรวิทยาที่มีการควบคุมเชิงพันธุกรรม เพื่อให้เซลล์ฆ่าตัวตาย (commit suicide) ในสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ apoptosis เกิดขึ้นระหว่างพัฒนาการของตัวอ่อนเพื่อจัดรูปร่างของอวัยวะ และเกิดในผู้ใหญ่เพื่อทำลายเซลล์ที่มีปัญหาและรักษา homeostasis ให้จำนวนเซลล์คงที่ โดยเป็นสมดุลระหว่างการเพิ่มจำนวน (cell proliferation) และการตายของเซลล์ (cell death) apoptosis จึงมีความสำคัญทางชีววิทยาเกี่ยวกับระบบต่างๆ ของร่างกายในภาวะปกติ ได้แก่ development, differentiation, proliferation/homoeostasis, regulation, immune system และการกำจัดเซลล์ผิดปกติและเซลล์ร้าย (harmful cells) (Lockshin and Williams, 1964)

ลักษณะของ apoptosis คือเซลล์ที่เกิด apoptosis จะเกิดการยืดยหรือหลุดออกจากเซลล์ข้างเคียง chromatin ใน nucleus ควบแน่น ย้ายไปอยู่ข้างเยื่อ nuclear membrane และ chromatin ขาดสายเป็นสายสั้นๆ (fragments) ส่วนเยื่อเซลล์ (plasma membrane) แตกเป็นถุง (blebbing/budding) ห่อหุ้ม chromatin fragments และ cytosol ถุงเหล่านี้เรียกว่า “apoptotic bodies” (Hotz, Traganos and Darzynkiewicz, 1992) และในที่สุด apoptotic bodies จะถูกกินโดย macrophages เพื่อกำจัดทิ้งออกจากเนื้อเยื่อโดยไม่มีอาการบวม (inflammatory response) การตายแบบ apoptosis จึงไม่เหมือนการตายแบบ necrosis ซึ่งเป็นการตายของเซลล์อีกแบบหนึ่ง necrosis เกิดจากเซลล์ได้รับการรบกวน (insult) ทำให้เยื่อเซลล์เสียหาย เซลล์บวม และแตกกระจายพร้อมปล่อยส่วนประกอบภายในเซลล์ออกมาสู่สิ่งแวดล้อมเซลล์ เป็นผลให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์รอบๆ และเนื้อเยื่อเกิดการบวม (inflammatory response) (Leist and Jaattela, 2001)

กลไกระดับโมเลกุลของวิถีสัญญาณของ apoptosis: เป็นปฏิกิริยาโมเลกุลและชีวเคมีในเซลล์ โดยเฉพาะการกระตุ้นของ proteolytic enzymes ย่อยโปรตีนจำเพาะหลายชนิด อย่างเป็นขั้นตอน และในที่สุดทำให้เกิดการตัด DNA ออกเป็น oligonucleosome fragments และ ทำให้ mitochondria เสียหาย วิถีสัญญาณของ apoptosis เป็นโมเลกุลที่รับผิดชอบในการชักนำ (induction) และการประหาร (execution) ให้เซลล์ตาย โดยโมเลกุลสัญญาณทำหน้าที่เกี่ยวกับ initiation, mediation, execution และ regulation การตายแบบ apoptosis เป็นการแสดงบทบาทระหว่างปัจจัยส่งเสริม (promote) และกด (suppress) ซึ่งควบคุมเป็นเครือข่ายอย่างละเอียดอ่อนในการตัดสินใจชะตาของแต่ละ

เซลล์ (Ishizaki et al., 1995; Weil et al., 1996) การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เช่นนี้ จึงเป็นผลให้เปลี่ยนแปลงรูปร่างของ cytoplasm และ organelles (Saraste and Pulkki, 2000) apoptosis ถูกกระตุ้นให้เกิดได้โดยปัจจัยหลายชนิดทั้งจากภายในและภายนอกเซลล์ เช่น สัญญาณ (signal) จับกับตัวรับ (receptor) ที่ผิวเซลล์ DNA เสียหายที่ซ่อมไม่ได้ ได้รับสารพิษ ได้รับรังสี สัญญาณดำรงชีพบกพร่อง สัญญาณไม่ให้แบ่งเซลล์ หรือพัฒนาการของเซลล์ (Gosslau and Chen, 2004) เป็นต้น apoptosis เกิดได้ 2 วิธี คือ (1) extrinsic apoptosis pathway เกิดจากการตอบสนองจากสิ่งภายนอกกระทำที่ตัวรับที่ผิวเซลล์ และ (2) intrinsic apoptosis pathway เกิดจากสัญญาณที่ซับซ้อนภายในเซลล์และมีสารโปรตีนเกี่ยวข้องจำนวนมาก (Denault and Salvesen, 2002) สารโมเลกุลศูนย์กลางของ apoptosis ซึ่งมีทั้ง inhibitors และ executioners คือ caspases ซึ่งเป็นคำย่อของ cysteine-dependent aspartate-specific proteases ที่มี catalytic activity ขึ้นกับ critical cysteine-residue ภายใน active-site pentapeptide QACRG และย่อยโปรตีน ณ ตำแหน่งหลัง aspartate residues สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มี caspase family 14 ชนิด (Denault and Salvesen, 2002; Richardson and Kumar, 2002) caspase ในเซลล์ถูกสังเคราะห์ในรูป inactive zymogens เรียกว่า procaspases จากนั้นจึงถูก processed เป็น heterotetramer ของ 2 small subunit และ 2 large subunit proapoptotic caspases แบ่งเป็น (1) กลุ่ม initiator caspases ได้แก่ procaspases-2, -8, -9 และ -10, และ (2) กลุ่ม executioner caspases ได้แก่ procaspases-3, -6, และ -7 ในกรณีที่สัญญาณไม่แรงพอให้เกิด execution ให้เซลล์ตาย สัญญาณต้องถูกขยายใหญ่ (amplified) ขึ้นโดยผ่านทาง mitochondria-dependent apoptotic pathway เป็นวิธีเชื่อมต่อระหว่าง caspase signaling กับ Bid ซึ่งเป็นโปรตีนหนึ่งใน Bcl-2 family จาก mitochondria เป็นผลให้ mitochondria ปล่อย cytochrome c และ proapoptotic factors อื่นเข้าสู่ cytosol (Luo et al., 1998) จากนั้น cytochrome c จับกับ Apaf-1 แล้วไปกระตุ้น initiator procaspase-9 (Acehan et al., 2002) เกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องของ effector caspase-3, caspase-7 และ caspase-6 เป็นผลให้เซลล์ตายในที่สุด (Slee et al., 1999)

พบว่ากลไกการยับยั้งกระบวนการเกิดเนื้องอกจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมวิธีการส่งสัญญาณของเซลล์ (signal transduction pathway) นำไปสู่การปรับเปลี่ยนการแสดงออกของพันธุกรรม (gene expression) และหยุดวัฏจักรของเซลล์ หรือการตาย (apoptosis) (Mita, Mita and Tolcher, 2006) การตายแบบ apoptosis จึงเป็นรูปแบบการตายของเซลล์ที่พบในสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ เพื่อจำกัดเซลล์ที่มีกระบวนการทางสรีรวิทยาและพยาธิสภาพที่ผิดปกติ (Aggarwal and Shishodi, 2006) ดังนั้นความสามารถในการชักนำให้เกิด apoptosis จึงเป็นปัจจัยเบื้องต้นที่นำมาพิจารณาประสิทธิภาพของสารเคมีในการป้องกัน (chemopreventive agents) การเกิดเนื้องอก/มะเร็ง (Sun et al., 2002)

7.2 วัตถุประสงค์

ในการวิจัยนี้เพื่อประเมินฤทธิ์ของสารสกัดกากองุ่น (grape pomace extract – GPE) และไวน์องุ่น (grape wine – GWI) ต่อการตายของเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน (myeloma) ด้วยการสังเคราะห์รูปร่างเซลล์ที่ตาย การแตกหักของ DNA/chromosomes และวิเคราะห์ตรวจหาโปรตีนบางชนิดที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ apoptosis

7.3 อุปกรณ์และวิธีการ

7.3.1 สารเคมีและเครื่องมือ

RPMI-1640, fetal bovine serum (FBS), L-glutamin, 10000 U penicillin-streptomycin และ 0.4% trypan blue ซื้อจาก Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA., bovine serum albumin (BSA), sodium dodecyl sulphate (SDS), ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) และ Tris (hydroxymethyl) methylammonium chloride ซื้อจาก BHD Chemicals Ltd., Poole, England, protein dye reagent ซื้อจาก BIO-RAD, CA, USA., acrylamide, ribonuclease A (RNase A), Proteinase K, sodium deoxycholate (DOC), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), nonyl phenoxy polyethoxy ethanol (NP-40), Hoechst 33258 (bisBenzimide H33258 trihydrochloride), protein molecular standards และ sodium acetate ซื้อจาก Sigma Aldrich Chemicals, Inc., St. Louis, MO, USA., DNA ladder ซื้อจาก Biolabs Inc., New England, USA. ส่วน Anti-mouse caspase-3, caspase-8, p53, และ Bcl2 monoclonal antibodies และ conjugated-HRP antibody ซื้อจาก Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA., tetramethylbenzidine (TMB) ซื้อจาก Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK., chloroform และ formaldehyde ซื้อจาก Carlo Erba Reagent, MI, Italy. boric acid จาก Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA.

7.3.2 การเลี้ยงเซลล์

Mouse myeloma (P3X63Ag8.653, ATCC-CRL 1580) 5×10^5 cells/ml เลี้ยงในอาหาร 10 ml RPMI-1640 เสริมด้วย 1% L-glutamine, 10% heat-inactivated FBS และ 1% penicillin-streptomycin 10000 U/ml (Penicillin G sodium 10^4 µg/ml streptomycin sulfate in 0.85% saline) และบ่มที่ 37 °C, 5% CO₂ เปลี่ยนอาหารทุก 2 วัน เลี้ยงจนถึง log phase

7.3.3 Apoptotic cell morphology

เลี้ยง myeloma 10^6 cells/well, 24 well plates, ใน RPMI-1640, 24 ชั่วโมง ที่ 37 °C, 5% CO₂ ใส่สารละลายของ สกัดกากองุ่น (GPE) ไวน์ (GWI) และ resveratrol (RES) ซึ่งเป็น control) ความเข้มข้น

10, 50, 100, 200, 500 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ เก็บเซลล์ที่ 6, 12, และ 24 ชั่วโมงล้าง 2 ครั้งด้วย PBS, pH 7.4 ตรึงเซลล์ (fixed) ให้คงรูปด้วย 500 μl 10% formaldehyde นาน 5–10 นาที ล้างด้วย PBS และย้อมเซลล์ด้วย 0.2 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33258 นาน 5–10 นาที ศึกษารูปร่างของเซลล์ (cell morphology) ภายใต้อุปกรณ์ fluorescence microscope (Schmid and Sakamoto, 2001) นับจำนวน apoptotic cells คำนวณหา ค่า LC_{50}

7.3.4 DNA fragmentation

เลี้ยง 10^6 cells/well, 24-well plate ใน RPMI-1640, 24 ชั่วโมง ที่ 37°C , 5% CO_2 ใส่สารละลายของ GPE, GWI และ RES เป็น control ความเข้มข้น 10, 50, 100, 200, 500 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ บ่มเป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง เก็บเซลล์ ล้างด้วย PBS, pH 7.4 ทำให้เซลล์แตก ด้วย lysis buffer, pH 7.5 ซึ่งประกอบด้วย 0.5% SDS, 25 mM Tris-HCl, 0.5% mg/ml proteinase และ 5 mM EDTA ที่ 55°C เวลา 1 ชั่วโมง แยก lysate protein ด้วย phenol-chloroform-isoamyl acetate (25:24:1) จากนั้นแยก DNA ด้วย 3M sodium acetate (pH 5.2) และ absolute ethanol ล้าง DNA, ทำให้แห้ง แล้วละลายใน Tris-EDTA (TE) buffer ซึ่งประกอบด้วย 100 $\mu\text{g/ml}$ Ribonuclease A ที่ 37°C , 30 นาที นำ 15 μg DNA วิเคราะห์ด้วย electrophoresis ใน 1.5% agarose gel, ย้อมด้วย ethidium bromide, ตรวจสอบ DNA ladder ได้แสง UV (Lee et al., 2006)

7.3.5 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ Western blotting

เลี้ยง myeloma 10^6 cells/ml ใน 24-well plate ที่ 37°C , 5% CO_2 24 ชั่วโมง ใส่สารละลาย GPE, GWI และ RES ที่ 10, 100 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ บ่มเป็นเวลา 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง เก็บเซลล์ และล้างเซลล์ด้วย phosphate-buffer saline (PBS) จากนั้นใส่ 100 μl lysis buffer ซึ่งประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM HCl, 1% NP-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS และ 1 mM PMSF เป็นเวลา 40 นาที centrifuge ที่ 12 000 g เป็นเวลา 20 นาที เก็บ supernatant ของ lysate ใส่หลอดใหม่ วัดปริมาณโปรตีนโดย Bradford protein assay (Bradford, 1976) เก็บ lysate ที่ -80°C ก่อนวิเคราะห์ต่อไป

นำ 100 μg protein lysate ใส่ SDS-gel loading buffer ซึ่งประกอบด้วย 2.5 M Tris-base, 10% SDS, 0.5% bromophenol blue, 50% glycerol และ 20% mercapthoethanol ต้ม 5 นาที load ลงใน 12% SDS-polyacrylamide gel แยกด้วยไฟฟ้ากระแสตรงที่ 100 volts เป็นเวลา 45 นาที หลังหยุด SDS-PAGE แล้วถ่ายย้าย proteins บนแผ่น gel ไปบน immobilon-P membranes ด้วยไฟฟ้า (electrotransfer/electroblotting) ที่ 70 volts, 4°C , 1.5 ชั่วโมง แยก blotted membrane ออก แล้ว block ด้วย 5% (w/v) nonfat milk และ 0.1% Tween-20 ใน Tris buffered saline (TBST) 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง บ่ม blotted membrane ด้วย primary antibodies ต่อ caspase-3, caspase-8, p53 หรือ Bcl-

2 ซึ่งเป็น anti-mouse, monoclonal antibodies (1:1000 dilution) 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างใน TBST 5 นาที 3 ครั้ง บ่มต่อด้วย secondary antibody ต่อ horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse Ab (HRP) (1:2000 dilution) 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย TBST 5 นาที 3 ครั้ง detect ด้วย tetramethylbenzidine (TMB) substrate ในห้องมืด ถ่ายภาพเก็บหลักฐาน ใช้ actin เป็น quantitative control marker โดย strip blotted membrane ด้วย buffer ซึ่งมี 0.2 M glycine (pH 2.2), 150 mM NaCl และ 0.1% (v/v) Tween-20, 30 นาที ที่ 50 °C แล้ว block ด้วย 5% (w/v) nonfat dry milk และ 0.1% Tween-20 ใน Tris buffered saline (TBST) detect actin ด้วย anti-actin antibody และ horse radish peroxidase (HRP)

7.3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี ANOVA และ Duncan's New Multiply Range Test (DMRT) ความน่าจะเป็น $p < 0.05$

7.4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

7.4.1 Apoptotic cell morphology

สารสกัดกากองุ่น (GPE) ไวน์องุ่น (GWI) และ resveratrol (RES) แสดงฤทธิ์ทำให้เซลล์ myeloma ซึ่งเป็นเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาวคนตายแบบ apoptosis รูปร่างของเซลล์แสดงลักษณะการตายแบบ apoptosis อย่างชัดเจน (Figure 7.1 - 7.3) apoptosis ขึ้นกับปริมาณและเวลาที่ได้รับการ พัฒนาการการเปลี่ยนรูปร่างเซลล์มีทั้ง เซลล์แสดงการควบแน่นของโครโมโซม (chromatin condensation) เซลล์แยกเป็นถุง/พู่ (blebbing) และ แยกขาดออกเป็นถุงเล็กถุงน้อย (apoptotic bodies) และสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงได้ตั้งแต่ได้รับสารที่ 6 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสาร (Figure 7.3, A) ซึ่งเป็นการทดลองควบคุม

การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ เห็นได้ชัดเจนว่า GPE, GWI และ RES ชักนำให้เกิดเซลล์ตายแบบ apoptosis ในทำนองเดียวกันจำนวน apoptotic cells ขึ้นกับปริมาณและเวลาที่เซลล์ได้รับสาร (dose- and time- dependent fashion) (Table 7.1 และ Figure 7.4) เมื่อเซลล์ได้รับ GPE, GWI และ RES จำนวน apoptotic cells เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และพบว่า ผลการวิเคราะห์การตายของเซลล์ myeloma ด้วยการสังเกตจาก cell morphology นี้แสดงผลสอดคล้องกับผลการต้านการเจริญของเซลล์ (anti-proliferation) ในบทที่ 6 กล่าวคือประสิทธิภาพต่อการตายของเซลล์เรียงลำดับดังนี้ RES > GWI > GPE เช่นกัน ฤทธิ์ของสาร resveratrol สามารถ ทำให้เซลล์ apoptosis ได้สูงสุด อาจเป็นเพราะ resveratrol เป็น active compound ที่สารบริสุทธิ์ ในขณะที่ grape pomace extract และ grape wine เป็นสารสกัดหยาบที่มีสารอื่นๆ (impurities) ปะปนอยู่มาก อย่างไรก็ตาม ทุกระดับความ

เข้มข้นของสารสกัดหยาบและเวลาบ่มเซลล์กับสาร grape pomace extract และ grape wine เซลล์แสดง apoptosis น้อยกว่า resveratrol ประมาณ 1.2 – 1.6 เท่า

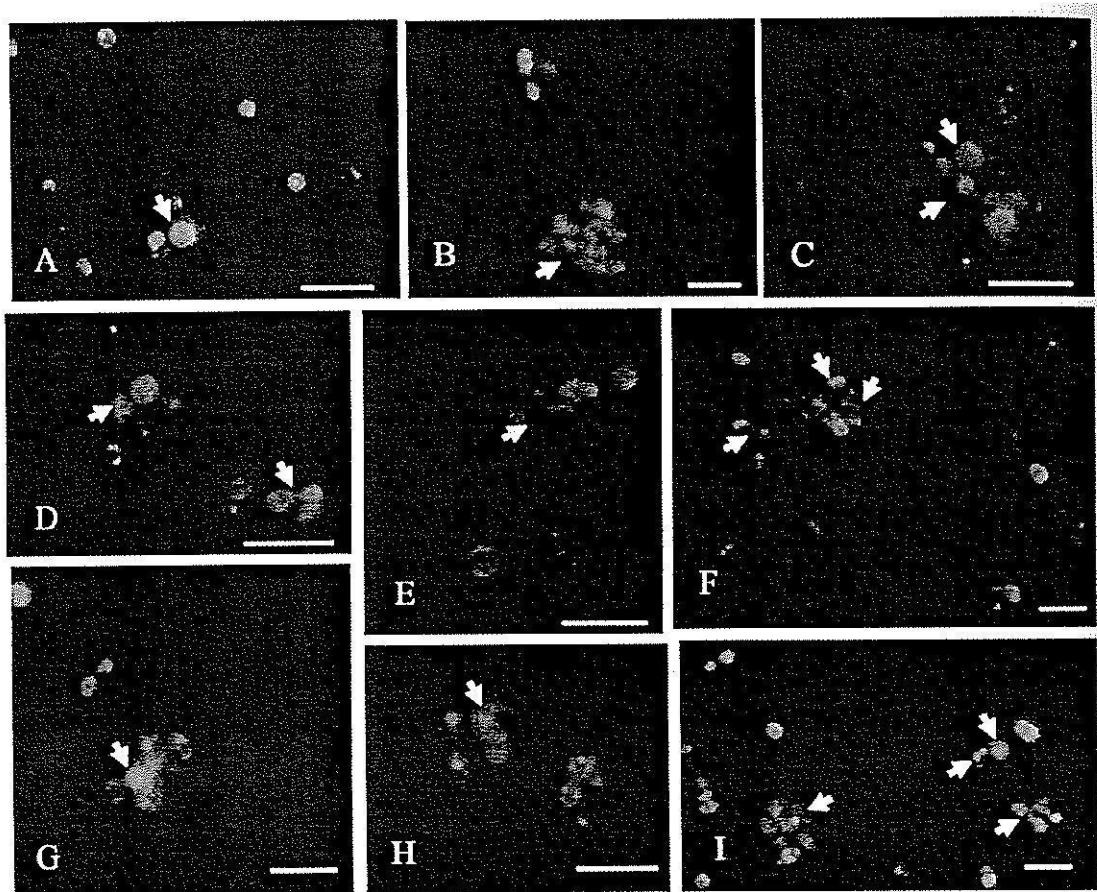


Figure 7.1 Apoptotic morphology of myeloma cells induced by grape pomace extracts (GPE) and stained with Heochst 33258: 10 $\mu\text{g/ml}$ -treated cells at 6 h (A, D and G); 100 $\mu\text{g/ml}$ -treated cells at 12 h (B, E and H); and 1000 $\mu\text{g/ml}$ -treated cells at 24 h (C, F, and I). The arrows indicated the apoptotic cells. Bar = 100 μm .

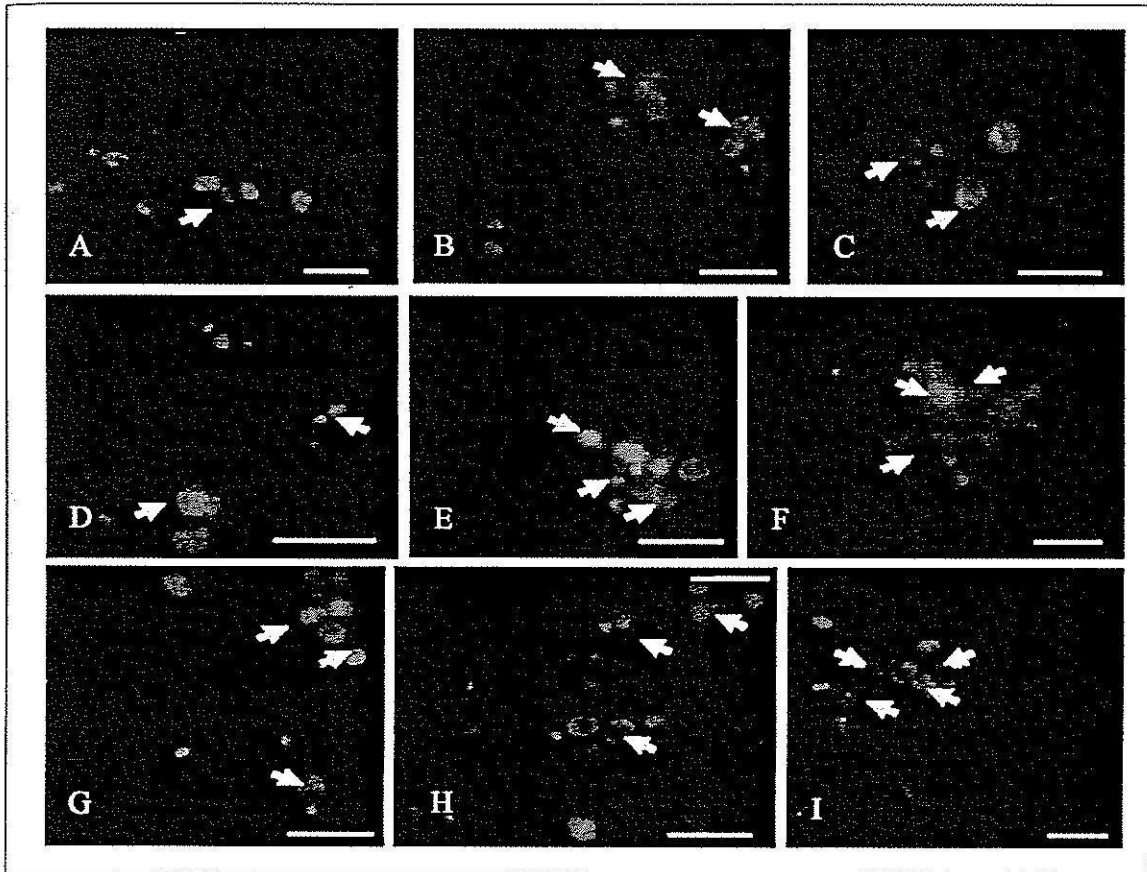


Figure 7.2 Apoptotic morphology of myeloma cell induced by grape wine (GWI) and stained with Heochst 33258: 10 $\mu\text{g/ml}$ -treated cells at 6 h (A, D and G); 100 $\mu\text{g/ml}$ -treated cells at 12 h (B, E and H); and 1000 $\mu\text{g/ml}$ -treated cells at 24 h (C, F, and I). The arrows indicated the apoptotic cells. Bar = 100 μm .

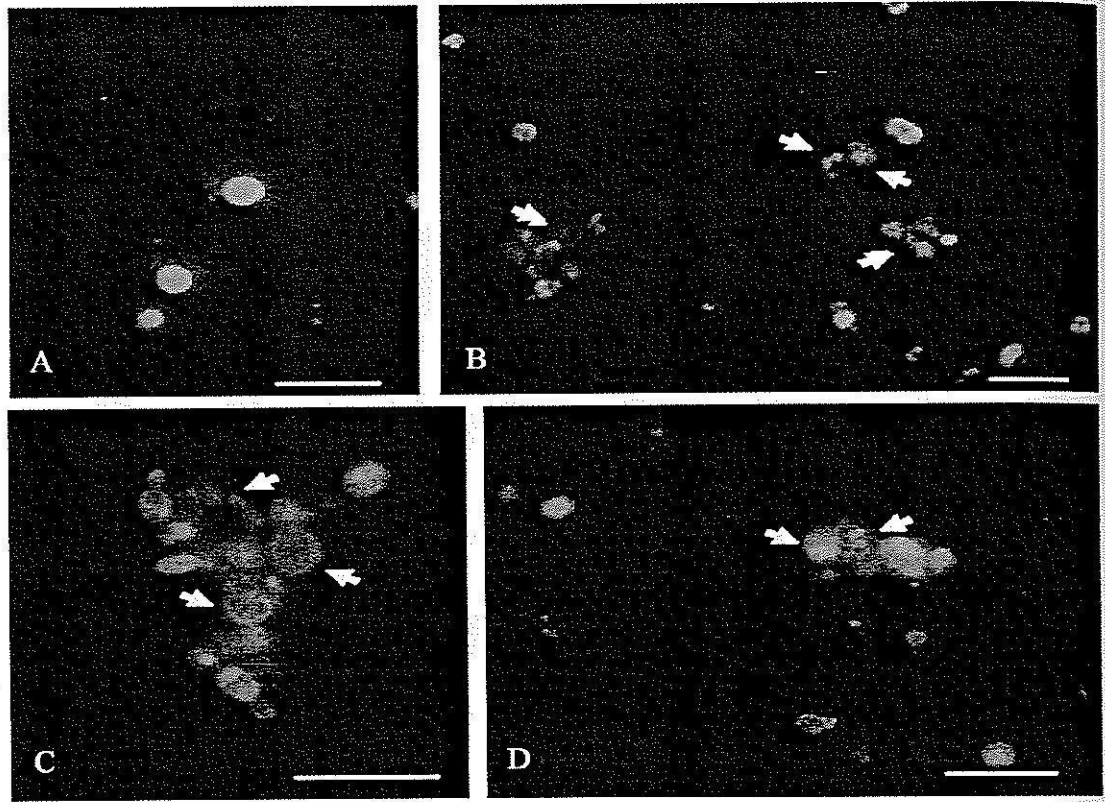


Figure 7.3 Apoptotic morphology of myeloma cell induced by 100 µg/ml resveratrol (RES) as positive control, stained with Hoechst 33258 for 6 hr, (B), 12 hr (C) and 24 hr (D). Panel A was untreated myeloma cells as control. The arrows indicated the apoptotic cells. Bar = 100 µm.

Table 7.1 The induction of myeloma cell apoptosis by grape pomace extract, grape wine and resveratrol at various concentration and duration of incubation. The numbers of apoptotic cells were detected and quantified by Hoechst 33258 staining after treatments.

Time (H)	Conc. (μ g/ml)	Apoptotic cells (%)		
		Grape Pomace Extract	Grape Wine	Resveratrol
6	10	4.39 ± 0.99 f	6.32 ± 1.33 f	8.69 ± 1.29 a
	50	10.11 ± 0.63 a	12.02 ± 1.27 a	15.13 ± 0.98 a
	100	18.23 ± 1.09 a	21.88 ± 0.79 e	28.75 ± 1.08 d
	200	22.51 ± 1.30 e	29.88 ± 0.58 d	39.54 ± 1.55 d
	500	29.05 ± 0.88 d	35.61 ± 1.14 d	49.11 ± 1.38 bc
	1000	45.67 ± 1.43 bc	54.12 ± 1.23 bc	68.23 ± 0.99 c
12	10	11.13 ± 1.13 a	18.44 ± 1.12 ab	21.87 ± 0.95 ab
	50	20.76 ± 1.11 ab	28.87 ± 0.99 f	43.58 ± 1.22 cd
	100	32.21 ± 0.97 f	45.36 ± 0.96 cd	50.98 ± 1.32 eg
	200	49.55 ± 0.68 de	56.75 ± 1.13 eg	67.54 ± 1.47 h
	500	54.23 ± 1.20 g	63.66 ± 1.42 h	80.32 ± 0.87 ij
	1000	61.86 ± 1.05 h	78.06 ± 0.95 j	96.12 ± 0.95 i
24	10	19.15 ± 1.47 e	29.21 ± 1.66 ef	34.54 ± 1.34 ef
	50	30.11 ± 1.28 ef	43.65 ± 1.54 b	53.24 ± 1.09 a
	100	41.54 ± 0.96 ab	50.22 ± 0.76 a	64.23 ± 1.43 g
	200	61.27 ± 0.56 g	72.89 ± 0.48 d	76.86 ± 0.69 cd
	500	69.87 ± 1.21 d	79.15 ± 1.05 c	94.12 ± 1.54 hi
	1000	76.12 ± 0.98 cd	89.97 ± 1.29 h	100 i

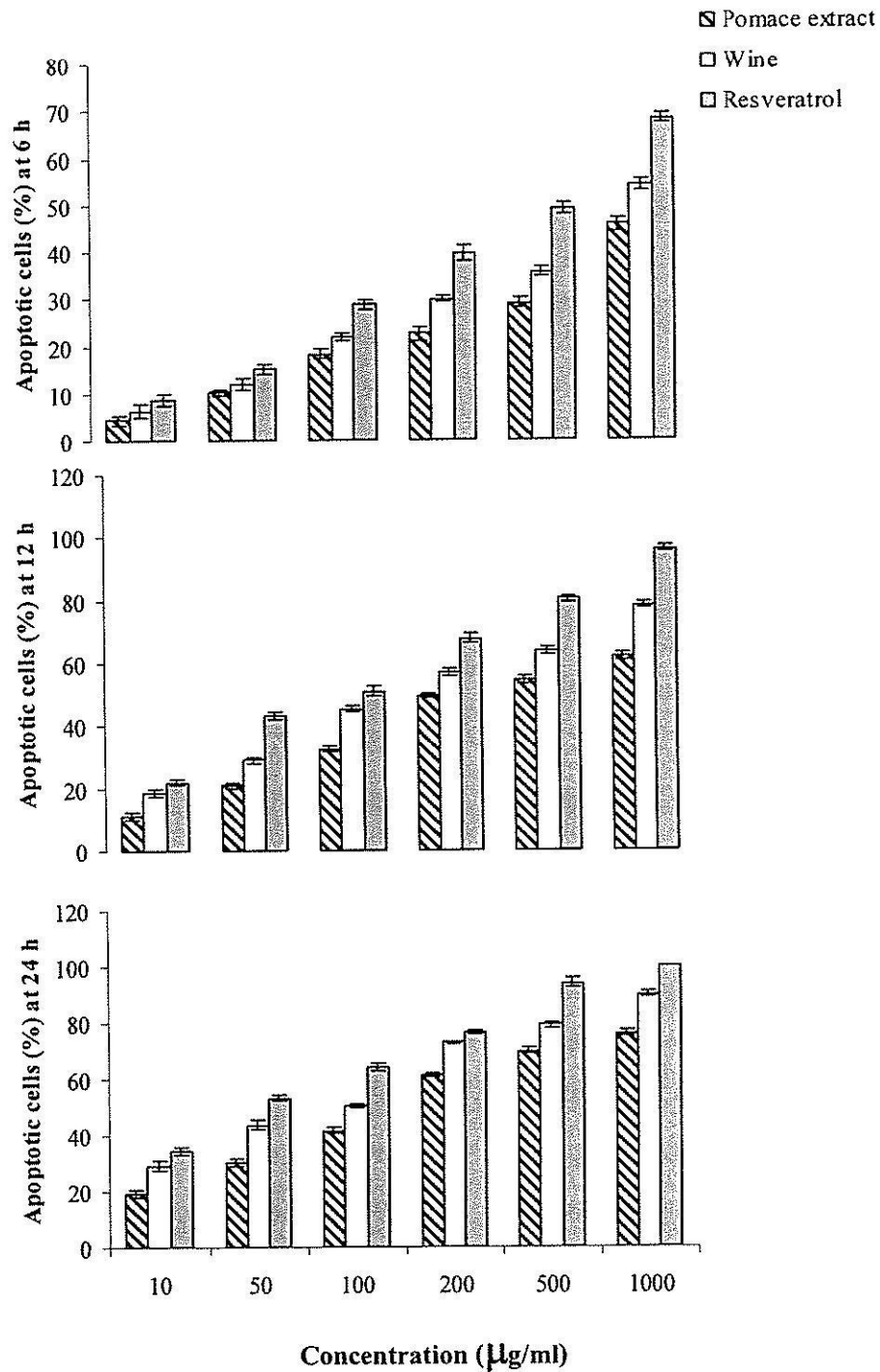


Figure 7.4 Comparison of mouse myeloma apoptosis induced by grape pomace extract (dash bars), grape wine (opened bars) and resveratrol (filled bars) at 10-1000 $\mu\text{g/ml}$ and 6, 12 and 24 hours. (mean $\pm$ SD, $n = 3$, $p < 0.05$).

ประสิทธิผล (efficacy) ของ grape pomace extract, grape wine และ resveratrol ต่อ cell apoptosis เมื่อวิเคราะห์จาก LC_{50} value ซึ่งบอกความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์ตายไป 50% (Table 7.2) grape pomace extract ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบที่สุด ให้ฤทธิ์น้อยที่สุด มีค่า LC_{50} เท่ากับ 2884.03 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 6 ชั่วโมง, 351.81 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 12 ชั่วโมง, และ 134.90 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 24 ชั่วโมง ส่วน grape wine ซึ่งเป็นสารหยาบน้อยกว่า มีค่า LC_{50} เท่ากับ 1148.15 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 6 ชั่วโมง, 141.25 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 12 ชั่วโมง, และ 56.23 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งใช้สารน้อยกว่า grape pomace extract ประมาณ 2.5 เท่า ส่วน resveratrol สารบริสุทธิ์ มีค่า LC_{50} เท่ากับ 407.38 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 6 ชั่วโมง, 67.61 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 12 ชั่วโมง และ 32.36 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งใช้สารน้อยกว่า grape pomace extract 7, 5 และ 4 เท่าตามลำดับ นั่นคือ สารสกัดหยาบแสดงฤทธิ์ทำให้เซลล์ตายมากขึ้น เมื่อเพิ่มเวลาให้เซลล์ได้รับสารนานมากขึ้น

Table 7.2 The LC_{50} values at different periods of treatments of the apoptotic effects of grape pomace extract, grape wine and resveratrol on mouse myeloma cells at designated duration.

Extract	Apoptotic Effect : LC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)		
	6 H	12 H	24 H
Grape Pomace extract	2884.03	351.81	134.90
Grape Wine	1148.15	141.25	56.23
Resveratrol	407.38	67.61	32.36

จะเห็นได้ชัดเจนว่า grape pomace extract และ grape wine สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวคน myeloma ตายแบบ apoptosis โดย สืบเนื่องจากลักษณะเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงตามหลักการ apoptosis (Hotz, Tragamos and Darzynkiewicz, 1992; Mita, Mita and Tolcher, 2006) เช่นเดียวกับ สารสกัดเมล็ดองุ่น (grape seed extract) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ human prostate tumor (Singh, et al., 2004) และทำให้เซลล์ DU145 (human prostate cancer cell) ตายแบบ apoptosis (Dhanalakshmi, Agarwal and Agarwal, 2003) โดยแสดงฤทธิ์เป็น dose- และ time-dependent fashion ที่ความเข้มข้น 50 – 200 $\mu\text{g/ml}$ เวลา 24 – 96 ชั่วโมง แม้ชักนำ apoptosis สูงสุดเพียง 16% ที่ 96 ชั่วโมงก็ตาม grape pomace extract ยังสามารถแสดงฤทธิ์ชักนำ apoptosis ของ CaCo2 cells เซลล์มะเร็งลำไส้ (Engelbrecht et al., (2007) นอกจากนี้ยังพบว่าในการศึกษาฤทธิ์ของผลผลิตขององุ่นสายพันธุ์ชีราส (shiraz grape) ต่อ apoptosis ของ myeloma นี้ ได้ผลสอดคล้องกับผลการศึกษาของสารสกัดเมล็ดองุ่นสายพันธุ์มัสคาดีน (muscadine grape) และ blueberry ต่อ apoptosis ของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 (Yi et al., 2006)

Grape pomace extract และ grape wine สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง myeloma เกิด apoptosis อาจเนื่องจากในตัวอย่างทั้งสองนี้มีสารพฤษเคมี (phytochemicals) ประเภท phenolic compounds บางชนิด โดยทั่วไปเปลือกของผลองุ่นและไวน์องุ่น พบว่ามีสาร tannin, anthocyanins และ stilbene ในปริมาณสูง (Sun et al., 2006; Briviba, Pan, and Rechkemmer, 2002; Souquet et al., 1996) และในเมล็ดองุ่นพบสาร phenolics ในรูป monomeric form มากกว่า polymerized form (Khokhar and Owusu-Apenten, 2003) ประสิทธิภาพการชักนำเซลล์ให้เกิด apoptosis ในระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน อาจเนื่องจากความผิดปกติที่กลไก apoptosis ของเซลล์ต่อสมดุลระหว่าง apoptotic inhibitor proteins กับ apoptotic activator proteins (Yang et al., 2003) ดังจะเห็นได้ว่า resveratrol เป็นสาร phenolic compound บริสุทธิ์ชักนำให้ myeloma cells เกิด apoptosis มากที่สุด และ resveratrol ชักนำ apoptosis ต่อ เซลล์มะเร็งเต้านมคน (MDA-MB-231 cells) (Scarlatti et al., 2003) เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากคน (LNCaP cells) (Aziz et al., 2006) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL-60 cells) (Su et al., 2005) ในการวิจัย resveratrol ต่อ myeloma cells นี้สอดคล้องกับการศึกษา resveratrol ต่อเซลล์สายพันธุ์ของคนหลายชนิด คือ เซลล์มะเร็งลำไส้ (human colon carcinoma) HT-29 และ SW-620 เซลล์มะเร็งผิวหนัง (human fibrosarcoma) และเซลล์จากสายสะดือ (human endothelial cells) HUV-ED-C ซึ่งเป็นต้นกำเนิดระดับ adult stem cells มีหลักฐานแสดงว่า ที่ความเข้มข้นต่ำ ($< 1 \text{ ug/ml}$) resveratrol เสริม cell proliferation แต่ที่ความเข้มข้นสูง ($> 10 \text{ ug/ml}$) resveratrol กลับชักนำ apoptosis ต่อเซลล์เหล่านี้ (Szende, Tyihák and Király-Véghely, 2000) และ resveratrol ชักนำให้เกิด apoptosis ได้มากกว่า ใน grape pomace extract และ grape wine ซึ่งเป็นสารหลายชนิดที่มี phenolic compounds หลายชนิด จึงอาจอนุมานได้ว่า grape pomace extract และ grape wine ผลิตผลขององุ่นสายพันธุ์ Shiraz ที่เพาะปลูกในฟาร์ม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี (มทส) มีสาร phenolic compounds ชนิด resveratrol ในปริมาณมากและมีคุณสมบัติในการชักนำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวให้ตายแบบ apoptosis

7.4.2 DNA fragmentation

คุณลักษณะของ apoptosis อีกประการคือการขาดหักของ chromosomes ใน nucleus จากปฏิกิริยาเอนไซม์ลูกโซ่ (cascade enzymatic reaction) ของโปรตีนที่เกี่ยวข้อง จนในที่สุดเอนไซม์กระตุ้น endogenous endonuclease ให้ตัด nucleosomes/DNAs ของ chromosomes ขาดเป็นชิ้นขนาดต่างๆ (Ueda and Shah, 1994; Gorman et al., 1994; Bortner, Oldenberg and Cidlowski, 1995; Mita, Mita, and Tolcher, 2006) ปรากฏเป็นขั้นบันได (DNA ladder) หรือ apoptotic ladder (Häcker, 2000) ในการวิเคราะห์นี้ grape pomace extract, grape wine และ resveratrol ชักนำให้เซลล์ myeloma เกิด DNA fragmentation อย่างชัดเจน และ fragments เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารและเวลาที่เซลล์ได้รับสาร (dose- and time-dependent fashion) (Figure 7.5 – 7.6) Chromosomes ในเซลล์หัก

เซลล์ได้รับสาร (dose- and time-dependent fashion) (Figure 7.5 – 7.6) Chromosomes ในเซลล์หักขาดได้ DNA fragment ขนาดประมาณ 180 – 200 bp เป็นคุณลักษณะของการตายแบบ apoptosis ซึ่งเป็นการตายเซลล์เดี่ยว (single programmed cell dead) (Ueda and Shah, 1994; Bortner, Oldenberg and Cidlowski, 1995) ต่างจากการตายแบบ necrosis ซึ่งเชื้อหุ้มเซลล์แตก เซลล์ปล่อยส่วนประกอบในเซลล์ออกสู่ภายนอก (Golstein and Kroemer, 2006) แล้วให้ผลต่อเซลล์ข้างเคียงและเนื้อเยื่อรวมเสียหายด้วย

DNA fragmentation ในเซลล์ myeloma ที่ชักนำด้วย grape pomace และ grape wine ผลผลิตของ มทส ฟาร์ม โดยใช้ resveratrol เป็นสารควบคุมในการศึกษานี้ สอดคล้องกับหลายรายงาน ซึ่งรายงานว่าสารสกัดธรรมชาติได้จากองุ่นและไวน์หลายสาร เช่น resveratrol, quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxy-flavon), catechin และ proanthocyanidin สามารถป้องกันการเกิดมะเร็งได้ โดยชักนำ DNA fragmentation ในเซลล์มะเร็ง resveratrol ทำให้เกิด DNA ladder ในเซลล์เม็ดเลือดขาว human promyelocytic leukemia HL-60 (Surh et al., 1999) quercetin ทำให้เกิด DNA ladder ในเซลล์เม็ดเลือดขาว human leukemia U37 (Lee et al., 2006) และยับยั้ง G₁/M phase transition ในวัฏจักรของเซลล์ ทำให้เซลล์หยุดที่ G₁ หรือ G₂ (Doherty et al., 2003) ในทางตรงข้าม ในเซลล์ปกติ สาร proanthocyanidin สกัดจากเมล็ดองุ่น (GSE) ลด DNA fragmentation และ ลด lipid peroxidation ในเนื้อเยื่อตับและสมองปกติ และ normal human oral keratinocytes (Bagchi et al., 1998; 2000) ใน การศึกษานี้ พบว่า grape pomace extract และ grape wine จากองุ่นแดง และ resveratrol มีฤทธิ์ทำให้ เซลล์ myeloma เกิด DNA fragmentation นั่นคือสารเหล่านี้ชักนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis เช่นเดียวกับสาร phenols อื่นๆ ที่สกัดจากองุ่นและเมล็ดองุ่น

7.4.3 Expression ของ apoptotic proteins: p53, Bcl-2, caspase-8, และ Caspase-3

การตายของเซลล์แบบ apoptosis เกิดจากบทบาทร่วมกัน (interplay role) ของโปรตีน (apoptotic proteins) หลายชนิด และโปรตีนเหล่านั้นถูกกำหนดด้วยคำสั่งของพันธุกรรม ในการวิจัยนี้ เน้นวิเคราะห์หาเฉพาะโปรตีน p53 (53 kDa), Bcl-2 (26 kDa), caspase-8 (20 kDa) และ caspase-3 (17 kDa) ซึ่งมีบทบาทใน apoptosis ทั้งวิถี intrinsic และ extrinsic บทบาทของ p53 มีบทบาทเป็น tumor suppressor โดยควบคุมหรือจำกัดจำนวนเซลล์ (cell proliferation) ให้หยุดวัฏจักรเซลล์และชักนำ apoptosis โดยวิธีผ่านทางโปรตีน bax (Shen and White, 2001; Schuler and Green, 2001; Amaral, 2010) ซึ่งไปทำให้ bcl-2 ที่เชื้อ mitochondria ชั้่นออกแล้ว ปล่อย cytochrome c ออกไปรวมกับ caspases และเซลล์ตายในที่สุด การแสดงออกของโปรตีนเหล่านี้สามารถตรวจหาได้ด้วย Western blotting

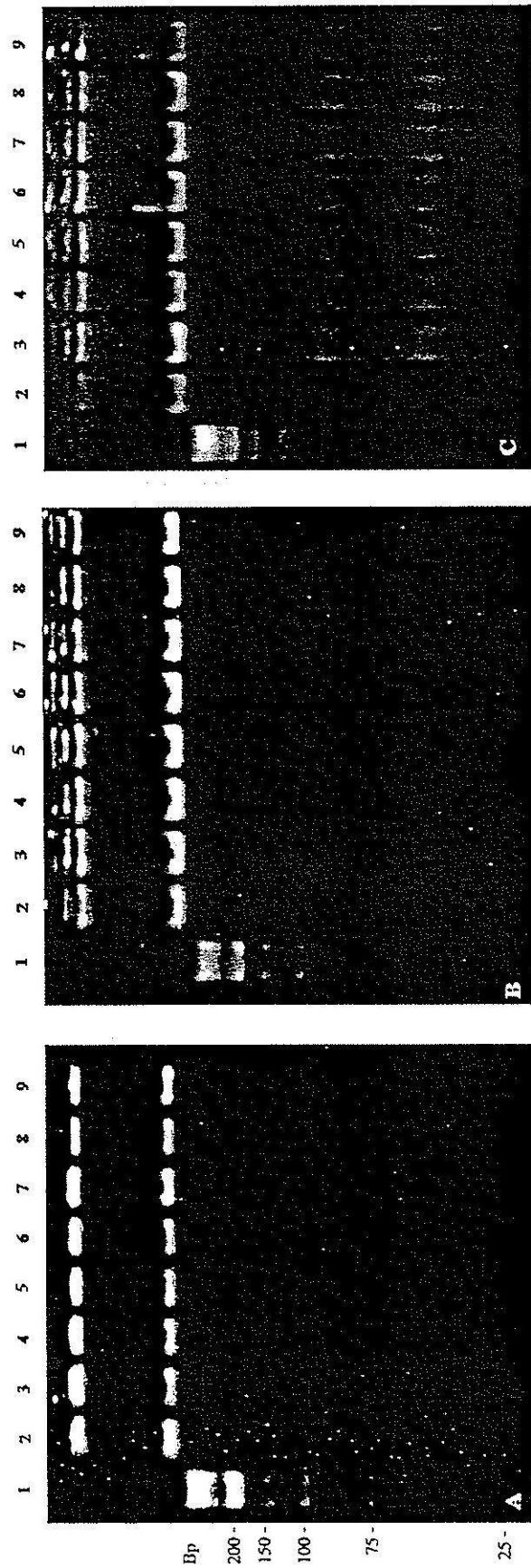


Figure 7.5 DNA fragmentation of myeloma cell line (P3X63, Ag8.653) induced by grape pomace extract (GPE) at various concentrations and incubation times on 1.5% agarose gel. Panels: A, 6 h; B, 12 h and C, 24 h. Lane 1, marker; lane 2, untreated cells; lane 3, resveratrol; lane 4, 10 ug/ml; lane 5, 50 ug/ml; lane 6, 100 ug/ml; lane 7, 200 ug/ml GPE; lane 8, 500 ug/ml; and lane 9, 1000 ug/ml.

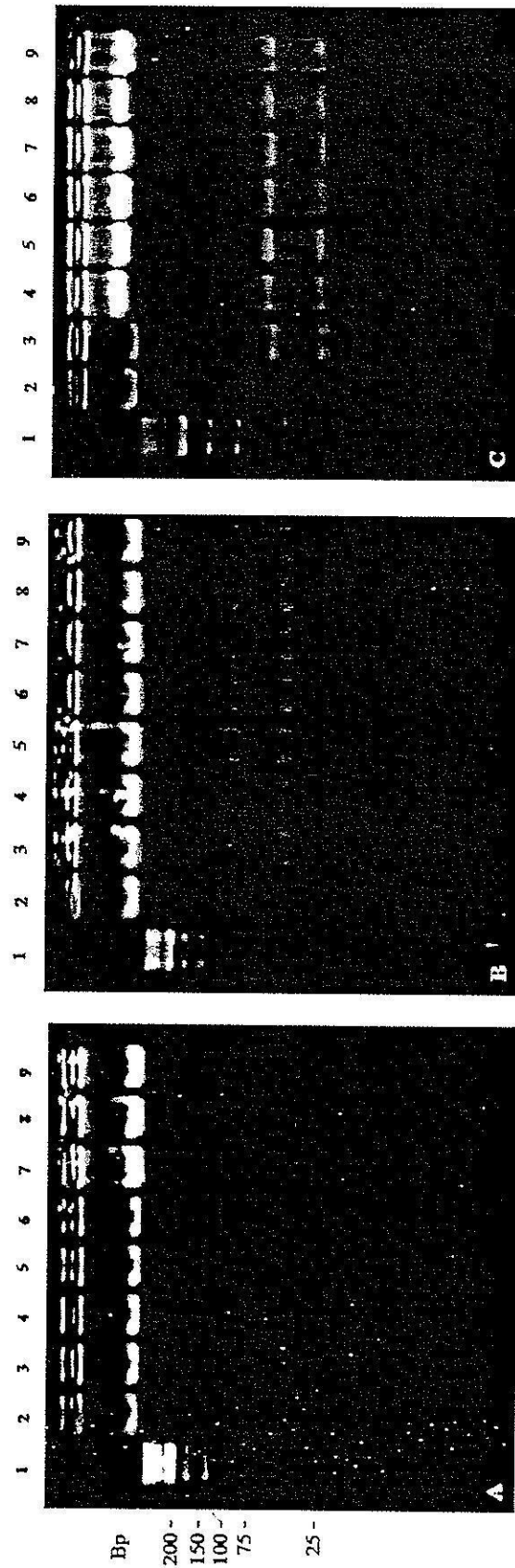


Figure 7.6 DNA fragmentation of myeloma cell line (P3X63, Ag8.653) induced by grape wine (GW) at various concentrations and incubation times on 1.5% agarose gel. Panels: A, 6 h; B, 12 h and C, 24 h. Lane 1, marker; lane 2, untreated cells; lane 3, resveratrol; lane 4, 10 ug/ml; lane 5, 50 ug/ml; lane 6, 100 ug/ml; lane 7, 200 ug/ml GWI; lane 8, 500 ug/ml; and lane 9, 1000 ug/ml.

พบว่าสารสกัด grape pomace (GPE), grape wine (GWI) และ resveratrol (RES) ชักนำให้เซลล์ myeloma เกิด apoptosis ซึ่งสามารถตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของ p53, Bcl-2, caspase-8 และ caspase-3 ได้อย่างมีนัยสำคัญ การเปลี่ยนแปลงเป็นแบบ dose และ time-dependent manner (Figure 7.7 - 7.9) และสอดคล้องกับ apoptotic morphology (Figure 7.1 - 7.3), DNA fragmentation (Figure 7.5 - 7.6) และฤทธิ์ของ RES, GWI แสดงฤทธิ์ชักนำ apoptotic proteins ได้ดีกว่าฤทธิ์ของ GPE อย่างมีนัยสำคัญ

GPE และ GWI ที่ความเข้มข้นต่ำ 10 ug/ml (Figure 7.7) สามารถชักนำ caspase-8 ได้หลัง 3 ชั่วโมง และชักนำ p53 และ caspase-3 ได้ชัดเจนมากขึ้นที่ 9 ชั่วโมง และมากที่สุดที่ 24 ชั่วโมง ในขณะที่ GWI ลดความเข้มของ Bcl2 ลงได้มากกว่าฤทธิ์ของ GPE อย่างไรก็ตาม Caspase-3 ซึ่งเป็น executioner protein ถูกชักนำ และถูก active ให้เป็น 17 subunit และ 11kDa subunit ได้อย่างชัดเจนเช่นเดียวกับฤทธิ์ของ resveratrol (Figure 7.8, lane Resv) ซึ่งให้เห็นว่าเซลล์ myeloma เกิด apoptosis ได้มากที่สุดที่ 24 ชั่วโมง

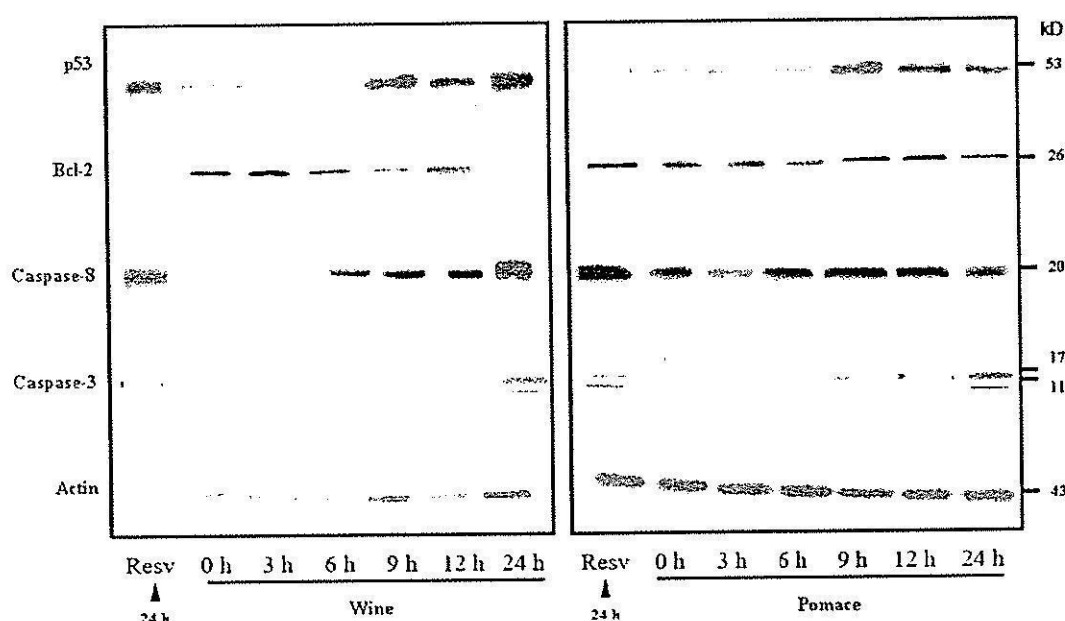


Figure 7.7 Western blot analysis for apoptotic proteins in myeloma cells induced by 10 ug/ml resveratrol (RES), grape wine (GWE) and grape pomace extract (GPE) at 0-24 h of incubations. The protein lysates were separated on 12% SDS-PAGE and the electrotransferred blots were detected by specific antibody probes and developed by HRP- TMB (Tetramethylbenzidine).

Myeloma cells ที่ได้รับ 100 ug/ml RES, GWI, และ GPE (Figure 7.8) แสดงการชักนำ p53, caspase-8 และ Bcl2 ได้เหมือนกับเซลล์ที่ได้รับ 10 ug/ml แต่ GWE ชักนำ caspase-3 ได้อย่างชัดเจน ที่ 3 ชั่วโมง ในขณะที่ GPE ชักนำ caspase-3 ได้ชัดเจนที่ 6 ชั่วโมง แสดงว่าฤทธิ์ของ GWE ทำให้เซลล์เกิด apoptosis ได้เร็วกว่าฤทธิ์ของ GPE

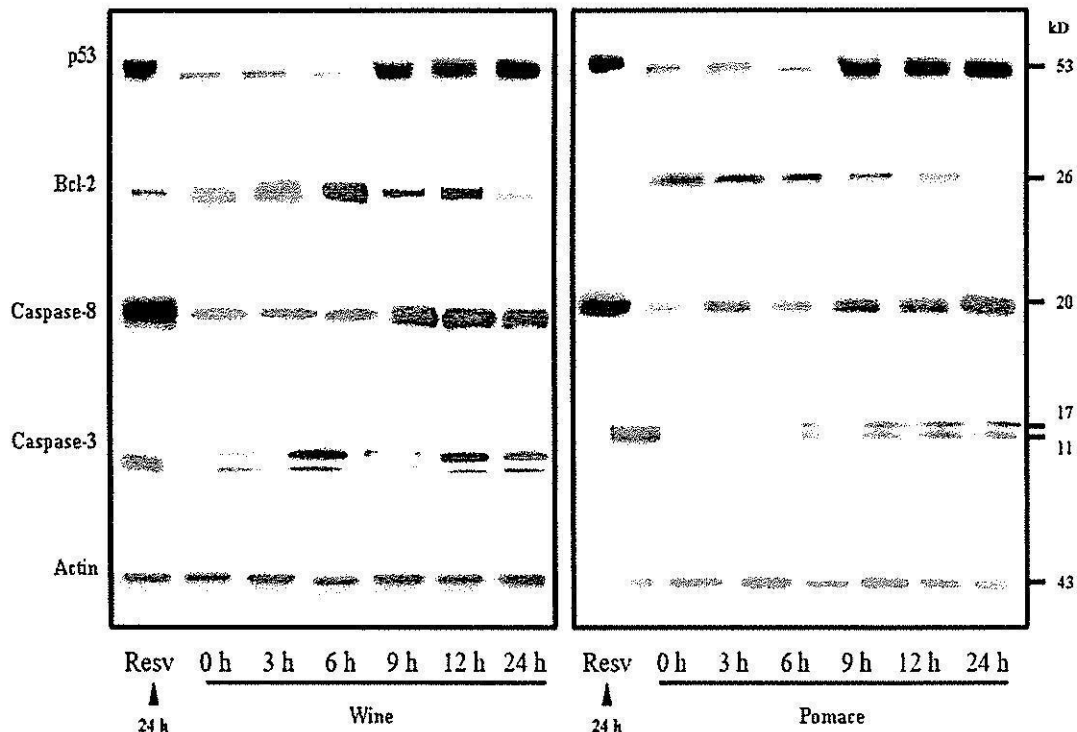


Figure 7.8 Western blot analysis for apoptotic proteins in myeloma cells induced by 100 ug/ml resveratrol (RES), grape wine (GWE) and grape pomace extract (GPE) at 0-24 h of incubations. The protein lysates were separated on 12% SDS-PAGE and the electrotransferred blots were detected by specific antibody probes and developed by HRP- TMB (Tetramethylbenzidine).

Myeloma cells ที่ได้รับสารที่ 1000 ug/ml (Figure 7.9) ชักนำ p53 ที่ 6 ชั่วโมง Bcl2 ลดลงที่ 12 ชั่วโมงและไม่สามารถตรวจหาได้ที่ 24 ชั่วโมง ส่วน caspase-8 และ caspase-3 ปรากฏที่ 3 ชั่วโมง แสดงว่าที่สารความเข้มข้นสูงชักนำ apoptosis หลัง 3 ชั่วโมง และเกิดได้มาก

สารประกอบในองุ่นเช่น quercetin, ellagic acid, resveratrol, และ gallic acid ได้มีการแสดงให้เห็นว่าสารเหล่านี้สามารถชักนำ apoptosis ใน cell line หลายชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ (She et al., 2001; Liesveld et al., 2003; Mertens-Talcott and Percival, 2005; Fjaeraa and Nanberg, 2009) ความสามารถชักนำ apoptosis แตกต่างกันขึ้นกับองค์ประกอบ polyphenol ของสารสกัด สารสกัดที่มี

สาร flavonols และ procyanidin oligomers ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูงมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิด apoptosis ได้ดีกว่า (Matito et al., 2003) และมีหลักฐานเป็นที่ยอมรับแล้วว่าเปลือกองุ่นมี resveratrol ที่มีคุณสมบัติชักนำให้เซลล์มะเร็งตายแต่ไม่มีพิษต่อเซลล์ปกติ (Jang et al., 1997; Jo, de Mejia and Lita, 2006)

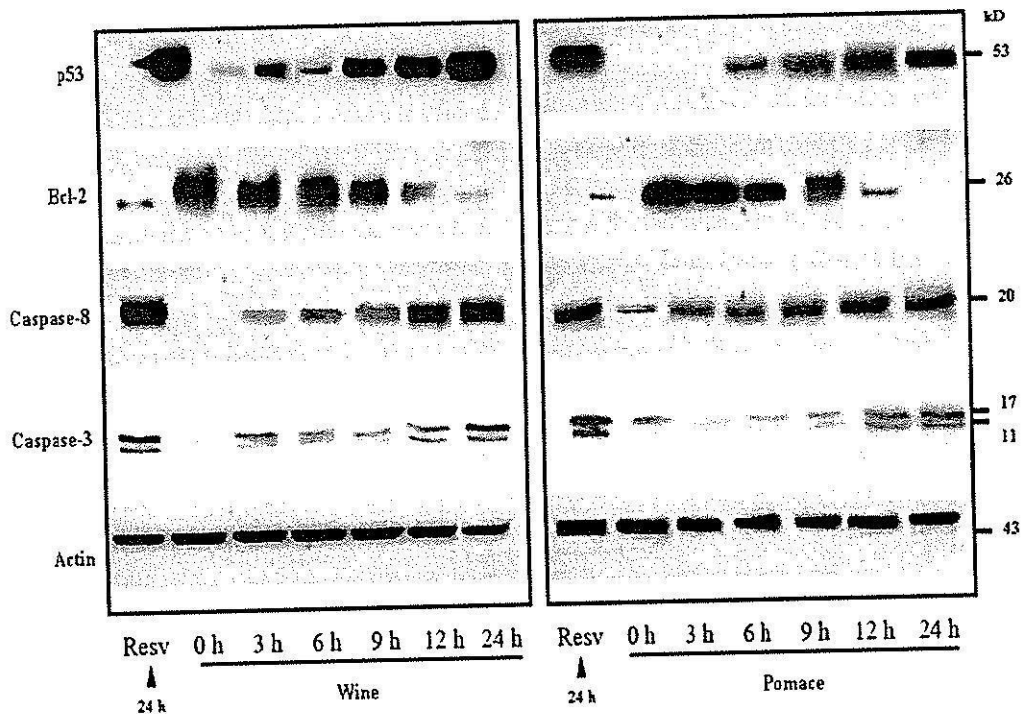


Figure 7.9 Western blot analysis for apoptotic proteins in myeloma cells induced by 1000 µg/ml resveratrol (RES), grape wine (GWE) and grape pomace extract (GPE) at 0-24 h of incubations. The protein lysates were separated on 12% SDS-PAGE and the electrotransferred blots were detected by specific antibody probes and developed by HRP- TMB (Tetramethylbenzidine).

Resveratrol สกัดจากองุ่นชักนำโปรตีน p53 และ p21 ซึ่งเป็นโปรตีนยับยั้ง cell proliferation และ ส่งเสริม apoptosis เซลล์มะเร็งหลายชนิด p53 และ p21 ยับยั้งเซลล์ที่ G₁/S transition (Mnjoyan and Fujise, 2003; Fulda and Debatin, 2004) โดยไปควบคุมที่ CDKs และ cyclins ทั้งในระดับ transcription และ posttranscription นำไปสู่ cell cycle arrest ยับยั้ง endothelial cell proliferation และ angiogenesis ในการเจริญของเนื้องอก (Haider et al., 2003) และ เกิด apoptosis โดยสัญญาณผ่าน p300/CBP, Apaf1 และ BAK และลดการแสดงออกของ PSA (tumor-associated antigen), NF-κB/p65 และ Bcl2 (Narayanan et al., 2003) resveratrol ไม่เพียงแต่เพิ่มปริมาณ p53 แต่ยังชักนำให้เกิด

posttranslational modification (phosphorylation และ acetylation) ในการควบคุมการถอดรหัสของยีน p21 induction (Zhang et al., 2004) นอกจากนี้ผงองุ่นแห้ง (freeze-dried grape powder) สามารถชักนำ apoptosis ผ่านไมโทคอนเดรียซึ่งเป็นวิถีภายในเซลล์ (intrinsic pathway) ด้วยการชักนำการแสดงออกของ p53, caspase-3, caspase-7, caspase-9 และ Bax (Logue and Martin, 2008) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอิทธิพลของ grape wine และ grape pomace extract จากองุ่นชีราสครั้งนี้ต่อ apoptosis ของเซลล์ myeloma ชักนำโดย p53 และ caspase-3 เช่นเดียวกับอิทธิพลของ resveratrol

สาร catechin, proanthocyanidin และ resveratrol สกัดจากองุ่น ให้ผล up-regulation ของ Bax, caspase-3 และ caspase-9 (Du and Lou, 2008) แต่ down-regulation ของ Bcl-2 ซึ่งเป็นโปรตีนใน outer membrane ของ mitochondria มีบทบาทป้องกันการรั่วของ cytochrome c โดย Bcl-2 ที่ลดลง (Surh et al., 1999) ทำให้ Bax แทรกเข้าไปเป็นช่องใน outer membrane ของ mitochondria เป็นผลให้ cytochrome c รั่วออกจาก mitochondria ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จนเซลล์ apoptosis ในที่สุด ใน rat heart cell line (H9C2) (Du and Lou, 2008), cardiomyocyte *in vivo* (Sato et al., 2001), human promyelocytic leukemia cells (HL-60) (Surh et al., 1999) HUV-EC-C และ HT-29, SW-620, HT-1080 (Szende, Tyihák and Király-Véghely, 2000) ในลักษณะ dose- and time-dependent fashion เช่นเดียวกับผลการศึกษา resveratrol สารสกัดจากองุ่น grape wine และ grape pomace ขององุ่นสายพันธุ์ชีราสจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

7.5 สรุปผลการทดลอง

ผลผลิตขององุ่นพันธุ์ชีราสปลูกในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี wine และ pomace extract สามารถชักนำให้เซลล์ mouse myeloma (P3X63Ag8.653) ซึ่งเป็นเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาวให้ตายแบบ apoptosis เช่นเดียวกับสาร resveratrol บริสุทธิ์ซึ่งพบมีมากในเปลือกและก้านองุ่น จากหลักฐานการตายของเซลล์ myeloma สอดคล้องกันทั้งลักษณะรูปแบบการตายของเซลล์ DNA fragmentation และ apoptotic proteins ที่เกี่ยวข้องบางชนิดที่ตรวจสอบได้ จึงสามารถสรุปได้ว่า grape wine, grape pomace extract และ resveratrol ชักนำให้เซลล์มะเร็ง myeloma ตาย และอาจเป็นได้ว่า grape wine และ grape pomace extract ชักนำ apoptosis ผ่าน signaling pathway ทั้ง 2 pathway คือ extrinsic pathway และ intrinsic pathway ในการตายผ่าน extrinsic pathway นั้น grape wine, grape pomace extract และ resveratrol น่าจะควบคุม apoptosis ทาง caspase-8 และ caspase-3 แล้วให้ผลเกิด DNA fragment ในที่สุด ส่วนการควบคุมผ่าน intrinsic pathway น่าจะเป็นผลจาก up-regulation ของ p53 ซึ่งจะไปทำให้ outer membrane ของ mitochondria เสีย impermeability ทำให้ Bcl-2 หลุดจาก membrane และถูกย่อยสลายไปในเซลล์ และโปรตีนในวิถีการตายหลุดออกจาก

mitochondria ไปย่อย procaspase-3 ให้ได้ caspase-3 และไปย่อย nucleosomes ของ chromosome ให้ DNA fragmentation และเซลล์ตายในที่สุด

ปัจจุบัน resveratrol สกัดจากองุ่นเชิงพาณิชย์ จำหน่ายเป็นสารอาหารเสริมป้องกันการก่อมะเร็ง ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่า wine และ pomace extract จากองุ่นพันธุ์ชีราสมิ่คุณสมบัติชักนำให้เซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาว myeloma ตายแบบ apoptosis ที่เทียบได้กับคุณสมบัติของ resveratrol หรืออนุมานได้ว่า wine และ pomace extract จากองุ่นสายพันธุ์ชีราสมิ่จากฟาร์ม มทส มี resveratrol เป็นส่วนองค์ประกอบในปริมาณที่สามารถทำให้เซลล์มะเร็งตายหรือป้องกันการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ ดังนั้นจากงานวิจัยนี้ควรมีการวิจัยต่อยอดเชิงประยุกต์ เช่น วิจัยกับ primary cells จากเนื้องอกหรือมะเร็งของคน ทำ dried wine และ dried pomace extract บรรจุ capsules เพื่อให้เป็นผลิตภัณฑ์ cancer natural chemoprevention agent เชิงพาณิชย์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X., and Akey, C.W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell.* 9:423-32.
- Aggarwal, B.B., and Shishodi, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem. Pharmacol.* 71:1397-1421.
- Amaral, J.D. (2010). The Role of p53 in apoptosis. *Discovery Med.* 9:145-152.
- Aziz, M.H., Nihal, M., Fu, V.X., Jarrard, D.F., and Ahmad, M. (2006). Resveratrol-caused apoptosis of human prostate carcinoma LNCaP cells is mediated via modulation of phosphatidylinositol-3'kinase/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. *Mol Cancer Ther.* 5:1335-1341.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S.J., Das, D.K., Ray, S.D., Kuszynski, C.A., Joshi, S.S., and Pruess, H.G. (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicol.* 148:187-97.
- Bagchi, D., Garg, A., Krohn, R.L., Bagchi, M. and Bagchi, D., Balmoori, J.J., and Stohs, S.J. (1998). Protective Effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *Gen. Pharma.* 30:771-776.
- Bortner, C.D., Oldenberg, N.B.E., and Cidlowski, J.A. (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Bio.* 5:21-26.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Briviba, K., Pan, L., and Rechkemmer, G. (2002). Red wine polyphenols inhibit the growth of colon carcinoma cells and modulate the activation pattern of mitogen-activated protein kinases. *J. Nutr.* 132:2814-2818.
- Denault, J.B., and Salvesen, G.S. (2002). Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem. Rev.* 102:4489-500.
- Dhanalakshmi, S., Agarwal, R., and Agarwal, C. (2003). Inhibition of NF-kappaB pathway in grape seed extract-induced apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells. *Int. J. Oncol.* 23:721-727.

- Doherty, S.C., McKeown, S.R., McKelvey-Martin, V., Downes, C.S., Atala, A., and Yoo, J.J. (2003). Cell cycle checkpoint function in bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 95:1859-1868.
- Du, Y., and Lou, H. (2008). Catechin and proanthocyanidin B4 from grape seeds prevent doxorubicin-induced toxicity in cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 591:96-101.
- Engelbrecht, A.M., Mattheyse, M., Ellis, B., Loos, B., Thomas, M. Smith, R. Peters, S., Smith, C., and Myburgh, K. (2007). Proanthocyanidin from grape seeds inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces apoptosis in a colon cancer cell line. *Cancer Lett.* 258:144-153.
- Fjaeraa, C., and Nanberg, E. (2009). Effect of ellagic acid on proliferation, cell adhesion and apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Biomed. Pharma.* 63:254-261.
- Fulda, S., and Debatin, K.M. (2004). Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Oncogene.* 23:6702-6711.
- Golstein, P., and Kroemer, G. (2006). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* 32:37-43.
- Gorman, A., McCarthy, J., Finucane, D., Reville, W., and Cotter, T. (1994). Morphological assesment of apoptosis. In T. G. Cotter and S. J. Martin (Eds). *Techniques in Apoptosis. A user's guide.* New York: Portland Press. pp1-20.
- Gossiau, A., and Chen, K.Y. (2004). Nutraceuticals, apoptosis, and disease prevention. *Nutr.* 20:95-102.
- Häcker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 301:5-17.
- Haider, U.G., Sorescu, D., Griendling, K.K., Vollmar, A.M., and Dirsch, V.M. (2003). Resveratrol increases serine15-phosphorylated but transcriptionally impaired p53 and induces a reversible DNA replication block in serum-activated vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharma.* 63:925-932.
- Hotz, M.A., Traganos, F., and Darzynkiewicz, Z. (1992). Changes in nuclear chromatin related to apoptosis or necrosis induced by the DNA topoisomerase II inhibitor fostriecin in MOLT-4 and HL-60 cells are revealed by altered DNA sensitivity to denaturation. *Exp. Cell Res.* 201:184-191.
- Ishizaki, Y., Cheng, L., Mudge, A.W., and Raff, M.C. (1995). Programmed cell death by default in embryonic cells, fibroblasts, and cancer cells. *Mol. Biol. Cell.* 6:1443-58.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W.W., Fong, H.H.S., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C., and Pezzuto, J.M. (1997).

- Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275:218-220.
- Jo, J.Y., de Mejia, E.G., and Lila, M.A. (2006). Cytotoxicity of bioactive polymeric fractions from grape cell culture on human hepatocellular carcinoma, murine leukemia and non-cancerous PK15 kidney cells. *Food Chem. Toxicol.* 44:1758-1767.
- Khokhar S., and Owusu-Apenten, R. (2003). Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure-activity relations. *Food Chem.* 81:133-140.
- Lee, T.J., Kim, O.H., Kim, Y.H., Lim, J.H., Kim, S., Park, J.W., and Kwon, T.K. (2006). Quercetin arrests G2/M phase and induces caspase-dependent cell death in U937 cells. *Cancer Lett.* 240:234-242.
- Leist, M., and Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(8):589-98. In A. Gewies (2003), *ApoReviw-Introduction to Apoptosis*, pp 26.
- Liesveld, J.L., Abboud, C.N., Lu, C., McNair, C., Menon, A., and Smith, A. (2003). Flavonoid effects on normal and leukemic cells. *Leukemia Res.* 27:517-527.
- Lockshin, R.A., and Williams, C.M. (1964). Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol* 10: 643-649. In A. Gewies (2003), *ApoReviw-Introduction to Apoptosis*, pp 26.
- Logue, S.E., and Martin, S.J. (2008). Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem. Soc. Transac.*, part 1, 36:1-9.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-90.
- Matito, C., Mastorakou, F., Centelles, J.J., Torres, J.L., and Cascante, M. (2003). Antiproliferative effect of antioxidant polyphenols from grape in murine Hepa-1c1c7. *Eur. J. Nutr.* 42:43-49.
- Mertens-Talcott, S.U., and Percival, S.S. (2005). Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Letters*, 218:141-151.
- Mita, M.M., Mita, A.C., and Tolcher, A.W. (2006). Apoptosis: mechanisms and implications for cancer therapeutics. *Targ Oncol*, 1:197-214.

- Mnjoyan, Z.H., and Fujise, K. (2003). Profound negative regulatory effects by resveratrol on vascular smooth muscle cells: a role of p53-p21 (WAF1/CIP1) pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311:546-552.
- Narayanan, B.A., Narayanan, N.K., Re, G.G., and Nixon, D.W. (2003). Differential expression of genes induced by resveratrol in LNCaP cells: p53-mediated molecular targets. *Int. J. Cancer.* 104:204-212.
- Richardson, H., and Kumar, S (2002). Death to flies: *Drosophila* as a model system to study programmed cell death. *J. Immunol. Methods.* 265:21-38.
- Saraste, A., and Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc. Res.* 45:528-37.
- Sato, M., Bagchi, D., Tosaki, A., and Das, D.K. (2001). Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia/reperfusion-induced activation of JNK-1 and c-JUN. *Free Radical Biol. Med.* 31:729-737.
- Scarlatti, F., Sala, G., Somenzi, G., Signorelli, P., Sacchi, N., and Ghidoni, R. (2003). Resveratrol induces growth inhibition and apoptosis in metastatic breast cancer cells via de novo ceramide signaling. *The FASEB J.* 17:2339-2341
- Schmid, I., and Sakamoto, K.M. (2001) Analysis of DNA content and green fluorescent protein expression. *Current Protocols in Flow Cytometry.* 7.16.1-7.16.10.
- Schuler, M., and Green, D.R. (2001). Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem. Soc. Transac.* 29:684-688.
- She, Q-B., Bode, A.M., Ma, W-Y., Chen, N-Y., and Dong, Z. (2001). Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Res.* 61:1604-1610.
- Shen, Y., and White, E. (2001). p53-dependent apoptosis pathways. *Adv. Cancer Res.* 82:55-84.
- Singh, R.P., Tyagi, A.K., Dhanalakshmi, S., Agarwal, R., and Agarwal, C. (2004). Grape seed extract inhibits advanced human prostate tumor growth and angiogenesis and upregulates insulin-like growth factor binding protein-3. *Int. J. Cancer.* 108:733-740.
- Slee, E.A., Harte, M.T, Kluck, R.M, Wolf, B.B, Casiano, C.A, Newmeyer, D.D, Wang, H.G, Reed, J.C, Nicholson, D.W, Alnemri, E.S, Green, D.R., and Martin, S.J. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.* 144:281-92.

- Souquet, J.M., Cheynier, V., Brossaud, F., and Moutounet, M. (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochem.* 43:509-512.
- Su, J.-L., Lin, M.-T., Hong, C.-C., Chang, C.-C., Shiah, S.-G., Wu, C.-W., Chen, S.-T., Chau, Y.-P., and Kuo, M.-L. (2005). Resveratrol induces FasL-related apoptosis through Cdc42 activation of ASK1/JNK-dependent signaling pathway in human leukemia HL-60 cells. *Carcinogenesis*. 26:1-10.
- Sun, B., Ribes, A.M., Leandro, M.C., Belchior, A.P., and Spranger, M.I., (2006). Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Anal. Chim. Acta.* 563:382-390.
- Sun, J., Chu, Y.F., Wu, X.Z., and Liu, R.H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agric. Food Chem.* 50:7449-7454.
- Surh, Y-J., Hurh, Y-J., Kang, J-Y., Lee, E., Kong, G., and Lee, S.J. (1999). Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Letters*, 140:1-10.
- Szende. B., Tyihák, E., and Király-Véghely, Z. (2000). Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures. *Exper. Mol. Med.* 32:88-92.
- Ueda, N., and Shah, S.V. (1994). Apoptosis. *J. Lab Clin. Med.* 124:69.
- Weil, M., Jacobson, M.D., Coles, H.S., Davies, T.J., Gardner, R.L., Raff, K.D. and Raff, M.C. (1996). Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J. Cell Biol.* 133:1053-1059.
- Yang, L., Mashima, T., Sato, S., Mochizuki, M., Sakamoto, H., and Yamori, T. (2003). Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: Therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide. *Cancer Res.* 63:831-837.
- Yi, W., Akoh, C.C., Fischer, J., and Krewer, G. (2006). Effects of phenolic compounds in blueberries and muscadine grapes on HepG2 cell viability and apoptosis. *Food Res. Int.* 39:628-638.
- Zhang, S., Cao, H.J., Davis, F.B., Tang, H.Y., Davis, P.J., and Lin, H.Y. (2004). Oestrogen inhibits resveratrol-induced post-translational modification of p53 and apoptosis in breast cancer cells. *Br. J. Cancer.* 91:178-185.

บทที่ 8

สรุปผลการทดลอง

8.1 สารประกอบฟีนอลิกและคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของไวน์ผลิตจากฟาร์ม มทส.

การวิเคราะห์ปริมาณ total phenolic compounds (TPC) ประสิทธิภาพการเป็น antioxidant (antioxidant activity - AA) ของไวน์ผลิตในภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยเน้นชนิดที่ผลิตในฟาร์ม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประกอบด้วยไวน์แดง 5 สายพันธุ์ คือ Shiraz, Muscat Hamburg (China), Zinfandel, Barbera (vintage year 2003 and 2004), and Muscat Hamburg (vintage year 2004) ไวน์ขาว 3 สายพันธุ์ คือ Italia, Chasselar Dore (year 2003), and Chenin Blanc (year 2004) และไวน์แดง คงพญาเย็น จากร้านค้าในจังหวัดนครราชสีมา ผลการวิเคราะห์ TPC ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method และสาร phenolic ที่สำคัญบางชนิด และ *trans-resveratrol* ด้วยวิธี Capillary electrophoresis วิเคราะห์ประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH และ FRAP

ผลการวิเคราะห์พบว่า ไวน์แดงมี TPC ระหว่าง 1498 - 2432 mgGAE/l และไวน์ขาวมีน้อยกว่า ระหว่าง 306 - 846 mg GAE/l และพบว่า Gallic acid เป็นสารหลักในไวน์แดง แต่ไม่พบสารนี้ในไวน์ขาว ตรวจพบ *trans-resveratrol* เฉพาะในไวน์ Shiraz, Zinfandel และ ไวน์ คงพญาเย็น ระหว่าง 1.21 - 2.76 mg/l

8.2 การเปลี่ยนแปลงของ Phenolic Compounds ระหว่างการหมักไวน์แดงด้วยยีสต์ต่างสายพันธุ์

การประเมินอิทธิพลของยีสต์ที่มีต่อ phenolic compounds ระหว่างการผลิตไวน์ โดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* 2 สายพันธุ์ คือ K1V1116, CY3079 และ *S. bayanus* สายพันธุ์ EC1118 สำหรับหมักองุ่น 2 สายพันธุ์ คือ Exotic และ Shiraz ติดตามการเปลี่ยนแปลงของ phenolic compounds และติดตามสารฤทธิ์ชีวภาพต่อการบริโภค เฉพาะ *trans-resveratrol* โดยเดิมก่อนการหมักปริมาณ 0, 5 และ 10 ppm ทำการติดตามระหว่างการหมักขึ้นตอน alcoholic fermentation (ALF) และการหมักขึ้นตอน malolactic acid fermentation (MLF) ด้วย lactic acid bacteria สายพันธุ์ *Oenococcus oeni* และขณะบ่มไวน์ วิเคราะห์ปริมาณ alcohol, total phenolic content (TPC) และวิเคราะห์ชนิดสาร phenolic compounds ด้วยวิธี capillary electrophoresis เปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไวน์ที่ผลิตด้วยการเติม *trans-resveratrol* ใน must ปริมาณ 0 และ 10 ppm ด้วยวิธี QDA ใช้ผู้ประเมินที่คุ้นเคยและบริโภคไวน์อยู่เป็นประจำ

ระหว่างการหมักแอลกอฮอล์ (ALF) สายพันธุ์ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่ทำให้ไวน์ที่ได้มีปริมาณ phenolic compounds แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ในช่วงสุดท้ายของการหมัก แต่ปริมาณ *trans-resveratrol* เพิ่มขึ้นใน 3 วันแรก และลดลงหลังการหมักได้ 6 วัน พบว่า เมื่อเสร็จสิ้นการหมักแอลกอฮอล์ ปริมาณของสารนี้ในไวน์ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ส่วน TPC ในไวน์เพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 3 ของการหมัก และคงที่หรือลดลงเล็กน้อยจนเสร็จสิ้นการหมัก ปริมาณสาร flavonoids และ phenolic compound โมเลกุลต่ำจะเพิ่มขึ้นเช่นกันในช่วง 2-6 วันแรก และลดลงในช่วงสุดท้ายของการหมัก และการเติม *trans-resveratrol* ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสาร flavonoids และ phenolic acid

ระหว่างการหมัก malolactic fermentation (MLF) ปริมาณ *trans-resveratrol* ถูกปล่อยเข้ามาในไวน์มากขึ้น และพบมากที่สุดเมื่อเติม *trans-resveratrol* บริสุทธิ์สูงมากถึง 10 ppm ใน must ทำให้มีปริมาณ *trans-resveratrol* ที่แตกต่างกัน ($p < 0.05$) ขณะที่ TPC ลดลงเล็กน้อย และมีสาร phenolic ที่พบว่ามีปรากฏขึ้นในช่วง MLF อาทิ gentisic, *p*-hydroxybenzoic, salicylic, protocatechuic and caffeic acid

ระหว่างการบ่มไวน์ ปริมาณ TPC และ phenolic อื่น ๆ คือ *trans-resveratrol*, epicatechin, catechin และ quercetin ลดลงตามเวลาบ่มแต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ syringic, hydroxybenzoic, salicylic และ gallic acid ในไวน์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ทั้งนี้พบว่าปริมาณ protocatechuic acid เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) หลังบ่มได้ 4 เดือน ส่วน cinnamic acid มีปริมาณลดลงตามเวลาการบ่ม ขณะที่ ปริมาณของ *p*-coumaric และ caffeic acid ไม่เปลี่ยนแปลง

พบว่าสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้หมักในการทดลองนี้ มีอิทธิพลต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไวน์ สายพันธุ์ EC1118 ให้คุณลักษณะที่ดีกว่าสายพันธุ์ K1V1116 และ CY3079 ขณะที่การเติมหรือไม่เติมสารบริสุทธิ์ของ *trans-resveratrol* ในการผลิตไวน์ มีอิทธิพลน้อยหรืออาจไม่มีเลยต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไวน์

8.3 การดูดซึมและอิทธิพลของ เรสเวอราทรอลและผลิตผลองุ่นแดงต่อโครงสร้างจุลภาคเซลล์ตับหนู

ทดลองผลการดูดซึม สาร phenolic compounds (total phenolic compounds, TPC) ในน้ำองุ่น (GIU) สารสกัดองุ่นแดง (grape pomace extract, GPE) ไวน์แดง (GWI) สายพันธุ์ Zinfandel (เดิมและไม่เติม *trans-resveratrol*) และ *trans-resveratrol* (RES) ใช้หนูเม้าส์สายพันธุ์จาก Institute cancer research (ICR) เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ น้ำหนัก 25-27 กรัม ให้สารตัวอย่างแก่หนูทางปาก (oral gavage) วันละครั้ง เก็บตัวอย่างเลือดเป็นเวลา 0, 15, 30, 60 นาที 3, 6, 12, และ 24 ชั่วโมง และ control ไม่ให้สาร วิเคราะห์หา total phenolic compounds โดย Folin-Ciocalteu's method และวิเคราะห์หา *trans-resveratrol* ด้วย capillary electrophoresis ผลการทดลองพบว่า ที่ 0 นาทีการดูดซึม (*in vivo*) ของ TPC ใน GIU และ GPE เข้าสู่ plasma ไม่แตกต่างกับการดูดซึมของ DMSO vehicle baseline ซึ่งมี

การดูดซึมของ TPC ใน plasma น้อยมาก TPC จาก GPE ใน plasma เริ่มแตกต่างชัดเจนจาก GJU ซึ่งคงเท่ากับ baseline หลัง 30 นาที absorption ของ TPC จาก GJU สูงสุดเท่ากับ 0.2152 ± 0.01 g/l ที่ 12 ชั่วโมง และ จาก GPE ดูดซึมได้เร็วกว่าที่ 6 ชั่วโมง เท่ากับ 0.2157 ± 0.01 g/l และ TPC recovery สูงสุดเท่ากับ 22.93% เท่ากัน อย่างไรก็ตามปริมาณ TPC จาก GJU และ GPE มีแนวโน้มลดลงในระดับเท่ากันที่ 24 ชั่วโมง

การดูดซึม resveratrol และไวน์เดิม resveratrol (resveratrol-spiked wine) ใน plasma หนูเมาส์ พบว่า resveratrol ถูกดูดซึมและอาจถูกย่อยในทางเดินอาหารไปเป็นอนุพันธ์ จึงวิเคราะห์ไม่พบมี resveratrol ด้วย capillary electrophoresis (CE) ใน plasma ของหนูทดลอง และไม่พบมีใน plasma ของหนูที่ได้รับ 20 mg/l resveratrol-spiked wine แต่วิเคราะห์พบมี resveratrol ใน resveratrol-spiked plasma นอกตัวหนู (*ex vivo*) การศึกษาการดูดซึม resveratrol เข้าสู่ร่างกายโดยใช้หนูเมาส์เป็นต้นแบบครั้งนี้ ไม่สามารถตรวจหา resveratrol ด้วย capillary electrophoresis (CE) เทคนิคอาจเป็นเพราะ resveratrol ถูกเปลี่ยนเป็นสารอนุพันธ์อื่นที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี CE

ทดลองให้สารทดสอบแก่หนูทางปาก (oral gavage) วันละครึ่ง ๆ ละ 0.5 ml โดยให้ 20 mg/kg trans-resveratrol (ใน 12% ethanol, v/v), 0.5 ml/day GJU, 0.5 ml/day GWI (12% ethanol), และ 0.15 g/kg (b.w.) GPE (ใน 10% DMSO) เป็นเวลา 2, 4 และ 6 เดือน และให้ 12% ethanol และ 10% DMSO เป็น vehicle control หลังจากฆ่าหนูแล้งเก็บตัวอย่างตับ เตรียมและตรวจ ultrastructure ของเซลล์ตับด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่อง (transmission electron microscopy, TEM)

น้ำองุ่น (grape juice, GJU) ไวน์ (wine, GWI) และ สารสกัดกากองุ่น (pomace ethanolic extract, GPE) และ resveratrol ไม่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างส่วนประกอบ ultrastructure ของเซลล์ตับ หนูเมาส์ ส่วน 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO) ซึ่งใช้เป็นสารทำละลายสารสกัดกากองุ่นและเป็น vehicle control เปลี่ยนแปลง ultrastructure ของเซลล์ตับเล็กน้อยโดยสะสม glycogen granules และ 12% ethanol ซึ่งความเข้มข้นเท่ากับ ethanol ในไวน์และใช้เป็น vehicle control โครงสร้างเซลล์ตับเปลี่ยนแปลง มี storage lipid droplet, endoplasmic reticulum เรียงตัวผิดปกติ และ chromatin ใน nucleus จัดตัวแน่นกว่าปกติ

สรุปได้ว่าผลผลิตองุ่นสายพันธุ์ Zinfandel ที่เพาะปลูกในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ผลิตสาร phenolics ที่เป็นประโยชน์และเมื่อรับเข้าร่างกายแล้ว ร่างกายสามารถดูดซึมเข้ากระแสเลือดได้ ไม่มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบภายในเซลล์ตับและใช้เพื่อประโยชน์ในการลดไขมันและป้องกันการก่อมะเร็ง

8.4 อิทธิพลผลิตผลองุ่นแดงต่อความเป็นพิษและการเพิ่มจำนวนของเซลล์

การศึกษาฤทธิ์ของไวน์ (GWI) สารสกัดหยาบจากกากองุ่น (grape pomace extract, GPE) สายพันธุ์ Shiraz และสารละลายเรสเวอราทรอล (resveratrol – RES) ด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ด้วยวิธี Brine Shrimp Lethal Assay (BSLA) และต่อการเพิ่มจำนวน (cell proliferation) ของเซลล์สายพันธุ์/เซลล์มะเร็ง myeloma (P3X63Ag8.653, ATCC-CRL 1580) ของหนูเม้าส์ BALB/c

ผลการเลี้ยง nauplii ด้วยสารสกัดกากองุ่น (GPE) ไวน์ (GWI) และเรสเวอราทรอล (RES) ซึ่งละลายใน 0.01% DMSO ที่ 10 - 1000 ug/ml และนับจำนวน nauplii ตาย ที่ 6, 12, และ 24 ชั่วโมง คำนวณหา % corrected mortality เปรียบเทียบ cytotoxicity เรียงระดับได้ดังนี้ $GPE < GWI < RES$ อย่างมีนัยสำคัญ และขึ้นกับความเข้มข้นและเวลาที่ได้รับสาร (dose and time dependent) และค่า LC_{50} (ug/ml) จากมากไปน้อย คือ $GPE > GWI > RES$ ตลอดเวลาการทดลอง

การวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell proliferation) โดย MTT assay พบว่าความเป็นพิษต่อเซลล์หรือต่อการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ในลักษณะขึ้นกับความเข้มข้น (dose-dependent fashion) ของสาร และ ขึ้นกับเวลาในการบ่ม ที่ความเข้มข้นสูง เป็นผลให้การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวต่ำลง และการบ่มระยะยาวทำให้ เซลล์รอดชีวิตน้อยลงเรื่อยๆ เมื่อเปรียบเทียบ Antiproliferation พบว่า Activity GPE และ GWI มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) สายพันธุ์ myeloma ทำให้ต้านต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ (antiproliferation) สายพันธุ์นี้จำนวนเซลล์ลดลงตามความเข้มข้นของ GPE, GWI, และ RES ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) Antiproliferation activity ของสารต่อการเจริญของ myeloma cells เรียงลำดับได้ดังนี้ $RES > GWI > GPE$

8.5 อิทธิพลของผลิตผลจากองุ่นแดงต่อโปรแกรมการตายของเซลล์ไมอีโอดมา

การวิจัยเพื่อประเมินฤทธิ์ของสารสกัดกากองุ่น (grape pomace extract – GPE) และไวน์องุ่น (grape wine – GWI) ต่อการตายของเซลล์สายพันธุ์/มะเร็งเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน (myeloma) ด้วยการสังเคราะห์รูปร่างเซลล์ที่ตาย การแตกหักของ DNA/chromosomes และวิเคราะห์ตรวจหาโปรตีนบางชนิดที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ apoptosis โดยใช้ resveratrol (RES) เป็นการทดลองควบคุม

ผลการทดลองพบว่า GPE, GWI) และ RES แสดงฤทธิ์ทำให้เซลล์ myeloma ซึ่งเป็นเซลล์สายพันธุ์/มะเร็งเม็ดเลือดขาวคนตายแบบ apoptosis รูปร่างของเซลล์แสดงลักษณะการตายแบบ apoptosis อย่างชัดเจน apoptosis ขึ้นกับปริมาณและเวลาที่ได้รับสาร เมื่อเซลล์ได้รับ GPE, GWI และ RES จำนวน apoptotic cells เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และพบว่า ผลการวิเคราะห์การตายของเซลล์ myeloma ด้วยการสังเกตจาก cell morphology นี้แสดงผลสอดคล้องกับผลการด้านการเจริญ

ของเซลล์ (anti-proliferation) ในบทที่ 6 กล่าวคือประสิทธิภาพต่อการตายของเซลล์เรียงลำดับดังนี้ RES > GWI > GPE เช่นกันฤทธิ์ของสาร resveratrol สามารถทำให้เซลล์ apoptosis ได้สูงสุด และผลวิเคราะห์ LC₅₀ value พบว่ามีลำดับจากมากไปน้อยคือ GPE > GWI > RES ทั้งนี้สามารถกล่าวได้ว่า grape pomace extract และ grape wine สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวคน myeloma ตายแบบ apoptosis โดยสังเกตจากลักษณะเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงตามหลักการ apoptosis

คุณลักษณะของ apoptosis อีกประการคือการขาดหักของ chromosomes ใน nucleus จากปฏิกิริยาเอนไซม์ลูกโซ่ (cascade enzymatic reaction) ของโปรตีนที่เกี่ยวข้อง จนในที่สุดเอนไซม์กระตุ้น endogenous endonuclease ให้ตัด nucleosomes/DNAs ของ chromosomes ขาดเป็นชิ้นขนาดต่างๆ ปรากฏเป็นขั้นบันได (DNA ladder) หรือ apoptotic ladder ผลการวิเคราะห์นี้พบว่า GPE, GWI และ RES ชักนำให้เซลล์ myeloma เกิด DNA fragmentation อย่างชัดเจน และ fragments เพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารและเวลาที่เซลล์ได้รับสาร (dose- and time-dependent fashion) Chromosomes ในเซลล์หักขาดได้ DNA fragment ขนาดประมาณ 180 – 200 bp เป็นคุณลักษณะของการตายแบบ apoptosis ซึ่งเป็นการตายเซลล์เดี่ยว (single programmed cell death) ต่างจากการตายแบบ necrosis ซึ่งเชื้อหุ้มเซลล์แตก เซลล์ปล่อยส่วนประกอบในเซลล์ออกสู่ภายนอก แล้วให้ผลต่อเซลล์ข้างเคียงและเนื้อเยื่อวามเสียหายด้วย

การตายของเซลล์แบบ apoptosis เกิดจากบทบาทร่วมกัน (interplay role) ของโปรตีน (apoptotic proteins) หลายชนิด และโปรตีนเหล่านี้ถูกกำหนดด้วยคำสั่งของพันธุกรรม ในการวิจัยนี้เน้นวิเคราะห์หาเฉพาะโปรตีน p53 (53 kDa), Bcl-2 (26 kDa), caspase-8 (20 kDa) และ caspase-3 (17 kDa) ซึ่งมีบทบาทใน apoptosis ทั้งวิถี intrinsic และ extrinsic บทบาทของ p53 มีบทบาทเป็น tumor suppressor โดยควบคุมหรือจำกัดจำนวนเซลล์ (cell proliferation) ให้หยุดวัฏจักรเซลล์และชักนำ apoptosis โดยวิถีผ่านทางโปรตีน bax ซึ่งไปทำให้ bcl-2 ที่เยื่อ mitochondria ชั่นจนกร้าว ปล่อย cytochrome c ออกไปรวมกับ caspases และเซลล์ตายในที่สุด การแสดงออกของโปรตีนเหล่านี้สามารถตรวจหาได้ด้วย Western blotting พบว่าสาร GPE, GWI และ RES ชักนำให้เซลล์ myeloma เกิด apoptosis ซึ่งสามารถตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของ p53, Bcl-2, caspase-8 และ caspase-3 ได้ อย่างมีนัยสำคัญ การเปลี่ยนแปลงเป็นแบบ dose และ time-dependent manner และสอดคล้องกับ apoptotic morphology และ DNA fragmentation และฤทธิ์ของ RES, GWI แสดงฤทธิ์ชักนำ apoptotic proteins ได้ดีกว่าฤทธิ์ของ GPE อย่างมีนัยสำคัญ

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ ดร. กนกอร นามสกุล อินทราพิเชฐ
2. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 044 22 4265

โทรสาร 044 22 4387

4. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2515 ปริญญาตรี วทบ. (วิทยาศาสตร์การอาหาร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2518 ปริญญาโท MS (Food Science) California State University, Fresno, USA

พ.ศ. 2533 ปริญญาเอก Ph.D. (Food Science) University of Missouri, Columbia, USA

5. สาขาวิชาที่มีความชำนาญการ

Food Chemistry (Food Flavors), Meat Science and Technology