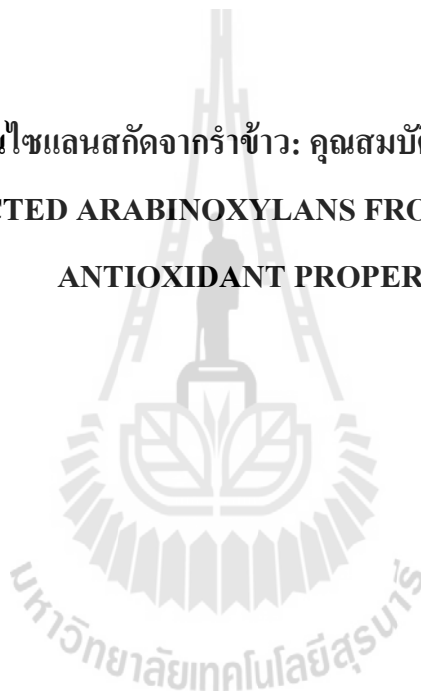




## รายงานการวิจัย

อะราบินอกไซด์สกัดจากรำข้าว: คุณสมบัติต้านออกซิเดชัน  
EXTRACTED ARABINOXYLANS FROM RICE BRAN:  
ANTIOXIDANT PROPERTY



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



## รายงานการวิจัย

อะราบินอกซ์แลนสกัดจากรำข้าว: คุณสมบัติต้านออกซิเดชัน  
EXTRACTED ARABINOXYLANS FROM RICE BRAN:  
ANTIOXIDANT PROPERTY

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันทา ทองทา

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์

สาขาวิชาสาขาวิชาเภสัชวิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2555-2556

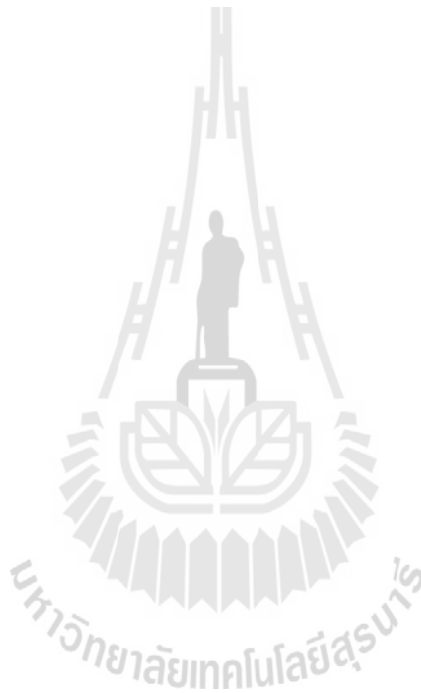
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

**กิตติกรรมประกาศ**

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้งบประมาณทุนอุดหนุนวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2555-2556 ทำให้ผลงานวิจัยโครงการนี้เกิดขึ้นได้ ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับอาคาร สถานที่ และเครื่องมือในการวิจัย และงานวิจัยนี้คงไม่สำเร็จหากขาดผู้ช่วยวิจัย นางประจิต อยู่หว่าง

จึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย



## บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสกัดอะราบีโนไซแลนส่วนที่สกัดไม่ได้ด้วยน้ำ (water unextractable arabinoxylan, WUAX) จากรำข้าวและศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระในอะราบีโนไซแลนที่สกัดได้

อะราบีโนไซแลนส่วนที่สกัดไม่ได้ด้วยน้ำ ทำการสกัดจากรำข้าวปราศจากไขมัน จากนั้นทำการกำจัดสตาร์ชและโปรตีนออกด้วยเอนไซม์เอนโดไซแลเนส (endoxylanase) จาก *Bacillus subtilis* จากการศึกษาปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการสกัด คือ การให้ความร้อนภายใต้แรงดัน (autoclave) ปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อย พบว่า การให้ความร้อนภายใต้แรงดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนนำมาย่อยด้วยไซแลเนสจำนวน 5 ยูนิตต่อกรัม เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เป็นวิธีการเบื้องต้นที่เหมาะสมในการสกัดอะราบีโนไซแลน โดยให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงเท่ากับ 9.14 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสจะเพิ่มปริมาณฟีนอลิกชนิดเหนียวรวมและลดปริมาณฟีนอลิกอิสระในรำข้าว และกรดฟีนอลิกหลักที่พบคือกรดเฟอร์ูลิกรูปแบบฟีนอลิกชนิดเหนียว

อะราบีโนไซแลนจาก WUAX สามารถตกตะกอนด้วยเอทานอลออกเป็น 3 ส่วน ตามความเข้มข้นของเอทานอล ได้แก่ สารสกัดที่ตกตะกอนด้วยเอทานอลเข้มข้น 0-60 เปอร์เซ็นต์ (F60) สารสกัดที่ตกตะกอนด้วยเอทานอลเข้มข้น 60-90 เปอร์เซ็นต์ (F6090) และสารสกัดที่ตกตะกอนด้วยเอทานอลเข้มข้นมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (F90) การวิเคราะห์องค์ประกอบสารฟีนอลิกในอะราบีโนไซแลนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอทานอล พบว่า สารสกัด F60 และ F6090 มีกรดฟีนอลิกชนิดเหนียวมากกว่ากรดฟีนอลิกชนิดอิสระ โดยสารสกัด F60 และ F6090 มีกรดเฟอร์ูลิกที่อยู่ในรูปฟีนอลิกชนิดเหนียวเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนสารสกัด F90 มีปริมาณกรดเฟอร์ูลิกและกรดคูมาริกอยู่ในรูปฟีนอลิกชนิดเหนียวใกล้เคียงกัน น้ำหนักโมเลกุลของสารสกัด F60 F6090 และ F90 วิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแยกขนาด พบว่า มีค่าเท่ากับ  $5.786 \times 10^4$ ,  $4.137 \times 10^4$  และ  $1.525 \times 10^3$  กรัมต่อโมล ตามลำดับ การวิเคราะห์น้ำตาลด้วยวิธีเมทาโนไลซิส (methanolysis) พบว่า น้ำตาลหลักในสารสกัด F60 และ F6090 คือไซโลสและอะราบีโนส โดยปริมาณอะราบีโนไซแลนของสารสกัดทั้งสองส่วนมีค่าเท่ากับ 70.3 และ 73.8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนน้ำตาลหลักที่พบในสารสกัด F90 คือกลูโคสและไซโลส จากการศึกษาโครงสร้างของอะราบีโนไซแลนพบอะราบีโนสที่ส่วนกิ่งเชื่อมกับไซโลสด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,3 เป็นส่วนใหญ่และมีปริมาณ 29-33 เปอร์เซ็นต์โมล การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) พบว่า สารสกัด F6090 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 389.5 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร อันดับรองลงมาคือ สารสกัด F60 และ F90 การทดสอบคุณสมบัติรีดักชันด้วยวิธี Ferric reducing ability power assay (FRAP) แสดงผลที่มีแนวโน้มเดียวกันคือ สารสกัด F6090 และ F60 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัด F90



## Abstract

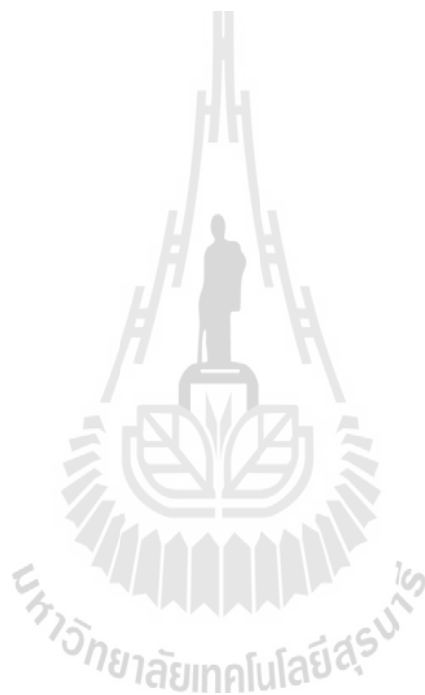
The objective of this research was to optimize the preparation conditions of the water extractable arabinoxylan (WUAX) from rice bran and the composition structure, phenolic compound and antioxidant effect of arabinoxylan hydrolysates were investigated.

The WUAX was extracted from defatted rice bran. Removal of starch and proteins from defatted rice bran was performed by enzymatic treatment with *Bacillus subtilis* endoxylanase. The important factors affecting extraction such as autoclave condition, enzyme concentration and hydrolysis time were optimized. Autoclaving at 121 °C for 4 h before enzymatic hydrolysis with 5 unit/g of xylanase for 4 h was a suitable method for the extraction of WUAX, a high yield of 9.14% total sugar was observed on an enzymatic hydrolysate. In addition, an autoclaving at 121 °C allowed increasing total phenolic content of bound-form but decreasing phenolic content of free-form. The major phenolic acid found in WUAX was ferulic in the bound-form.

The WUAX was further fractionated into 3 fractions by ethanol precipitation: 0-60% ethanol (F60), 60-90% ethanol (F6090), and above 90% ethanol (F90). The analysis of ethanol-fractionation of WUAX showed that F60 and F6090 had the higher phenolic acid content in the bound-form than that the free-form. F60 and F6090 fractions contained mostly bound ferulic acid, while F90 had comparable amounts of ferulic acid and coumaric acid. The molecular weights of F60, F6090 and F90, determined by HPSEC-MALLS, were  $5.786 \times 10^4$ ,  $4.137 \times 10^4$ , and  $1.525 \times 10^3$  g/mol, respectively. The sugar analysis by methanolysis method showed that the major monosaccharides of F60 and F6090 fractions were xylose and arabinose in which arabinoxylans of both fractions were 70.3 and 73.8%, respectively. For F90, the major monosaccharides were glucose and xylose. Structural characterization of all three fractions of WUAX indicated that the majority of the arabinose residues were  $\alpha$ -1, 3-linked to monosubstituted xylose and was about 29-33 % molar ratio.

The free radical scavenging activity of antioxidants in WUAX was studied. The F6090 showed highest radical scavenging effect in the 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay, with an  $EC_{50}$  value of 389.5  $\mu$ g/mL, followed by F60 and F90. However, the F60 and F6090 fractions had higher total reducing power in the FRAP assay than that of F90. In the cell-based antioxidant assay with HepG2 using DCFH DA probe, the effective concentrations of F60, F6090

and F90 in scavenging intracellular ROS were 5, 10 and 10  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The cytotoxicity against HepG2 of these fractions was varied. F60 fraction only slightly induced cell death (12-35%) at the concentration range of 50-2,500  $\mu\text{g/mL}$ . At 500 to 12,500  $\mu\text{g/mL}$ , F6090 fraction had no cytotoxic effect but could slightly enhance the growth of HepG2 cells. F90 fraction exhibited the most potent cytotoxic activity against the HepG2 with the  $\text{IC}_{50}$  value of 8,132  $\mu\text{g/mL}$ .



## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อ.....	ข
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฉ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	1
1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	2
<b>บทที่ 2 วรรณกรรมและทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>3</b>
2.1. โครงสร้างของอะราบิโนไซแลน.....	3
2.2. สารประกอบกรดฟีนอลิก.....	5
2.3. ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและภาวะเครียด ออกซิเดชัน.....	9
2.4. ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิก และอะราบิโนไซแลน.....	12
<b>บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....</b>	<b>15</b>
3.1. วัตถุดิบและสารเคมี.....	15
3.2. การเตรียมตัวอย่างเบื้องต้น.....	15
3.3. การเตรียมอะราบิโนไซแลนที่ไม่ละลายน้ำจากรำข้าวสาคัดไขมัน.....	15
3.3.1. การเตรียมสารสกัดอะราบิโนไซแลนที่ไม่ละลายน้ำโดยการกำจัด สตาร์ชและโปรตีน และการให้ความร้อนภายใต้ความดัน.....	15
3.3.2. การเตรียมสารสกัดอะราบิโนไซแลนที่ไม่ละลายน้ำโดยการตกตะกอน ด้วยเอทานอล.....	16
3.3.2.1. การย่อยด้วยเอนไซม์.....	16
3.3.2.2. การแยกส่วนโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล.....	17
3.4. การตรวจสอบสมบัติทางเคมีและกายภาพของรำข้าวและอะราบิโนไซแลนจาก รำข้าว.....	18



3.4.1. การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น.....	18
3.4.2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน.....	18
3.4.3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด.....	18
3.4.4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....	19
3.4.5. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก.....	19
3.4.5.1. การเตรียมตัวอย่าง.....	19
3.4.5.2. การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด.....	20
3.4.5.3. การวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกโดยเทคนิคด้วยวิธีการทาง โครมาโตกราฟีเหลวความดันสูง.....	20
3.4.6. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล.....	21
3.4.7. การวิเคราะห์น้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์และ linkage.....	21
3.4.7.1. การวิเคราะห์น้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์.....	21
3.4.7.2. การวิเคราะห์น้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์และโครงสร้างโมเลกุล ของอะราบิโนไซแลนด้วยเทคนิค Methylation และ Silylation.....	22
3.4.7.2.1. Methylation.....	22
3.4.7.2.2. Silylation.....	22
3.4.8. การวิเคราะห์คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ.....	23
3.4.8.1 การวิเคราะห์ Ferric reducing antioxidant power (FRAP).....	23
3.4.8.2 การวิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity.....	24
3.4.8.3 การทดสอบทางพิษวิทยาของ WUAX ในการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) โดยวิธีทดสอบ MTT reduction assay.....	24
3.4.8.4 การต้านออกซิเดชันภายในเซลล์ (Cellular Antioxidant Activity, CAA assay).....	25
3.5. การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	26
<b>บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและการอภิปรายผล.....</b>	<b>27</b>
4.1. การสกัดอะราบิโนไซแลนที่ไม่ละลายน้ำจากรำข้าว.....	27
4.2. องค์ประกอบทางเคมี สมบัติทางเคมีและกายภาพของรำข้าวและอะราบิโนไซ แลนจากรำข้าว.....	31
4.2.1. องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวและอะราบิโนไซแลนจากรำข้าว.....	31

4.2.2. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก.....	34
4.2.2.1 สารประกอบฟีนอลิกอิสระทั้งหมดและสารประกอบฟีนอลิกยึด เหนี่ยวทั้งหมด.....	34
4.2.2.2. องค์ประกอบและปริมาณกรดฟีนอลิกอิสระและกรดฟีนอลิกยึด เหนี่ยวทั้งหมด.....	35
4.2.2.3. โครงสร้างของอะราบิโนไซแลน.....	37
4.3 คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity).....	39
4.3.1 ปริมาณและการจำแนกชนิดของสารประกอบฟีนอลิกโดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography.....	39
4.3.1.1 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและสารประกอบฟีนอลิกของอะราบิ โนไซแลนจากรำข้าวด้วยกระบวนการตกตะกอนด้วยเอทา นอล.....	39
4.3.1.2 โครงสร้างน้ำหนักโมเลกุลของอะราบิโนไซแลนจากรำข้าว สกัดด้วยกระบวนการตกตะกอนด้วยเอทานอล.....	43
4.3.1.3 ปริมาณน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์โปรตีนและคุณสมบัติทาง โครงสร้างของรำข้าวที่สกัดด้วยกระบวนการตกตะกอนด้วยเอ ทานอล.....	45
4.4.1 การยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ Diphenenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) และ Ferric reducing antioxidant power.....	49
4.4.2. ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระประเมินภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต (Antioxidant capacity as evaluated within a life cell).....	54
4.4.2.1. ผลของ WUAX ของรำข้าวที่ผ่านการแยกส่วนด้วยเอทานอล ต่อการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) HepG2 ประเมิน โดย วิธี MTT.....	54
4.4.2.2. การลดปริมาณ ROS ภายในเซลล์ (Intracellular ROS scavenging activity).....	56
<b>บทที่ 5 บทสรุป.....</b>	<b>64</b>
บรรณานุกรม.....	66
ภาคผนวก.....	77
ประวัติผู้วิจัย.....	80

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1	7
1.2	8
3.1	28
3.2	29
3.3	33
3.4	35
3.5	36
3.6	37
3.7	

1.1 สารประกอบกรดไฮดรอกซีซินนามิกและอนุพันธ์ที่พบในธัญพืชชนิดต่างๆ.....

1.2 ปริมาณกรดเฟอรูลิกในส่วนต่างๆของเมล็ดธัญพืช.....

3.1 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังการบ่มด้วยเอนไซม์ *Bacillus subtilis* endoxylanase ของตัวอย่าง rice bran WUAX ที่กำจัดสตาร์ชและโปรตีน.....

3.2 องค์ประกอบทางเคมีของ WUAX จากการเตรียมด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์เปรียบเทียบกับทำให้ความร้อนภายใต้แรงดันร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์ใน DSDPB.....

3.3 องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวสีกัดไขมัน (rice bran), รำข้าวที่สีกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้ว (DSDPB) และรำข้าวที่สีกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้วและผ่านการสีกัดร่วมด้วยการใช้ความร้อนภายใต้แรงดัน (ADSDPB).....

3.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอิสระทั้งหมดและสารประกอบฟีนอลิกยึดเหนี่ยวทั้งหมดของรำข้าวสีกัดไขมัน (rice bran), รำข้าวที่สีกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้ว (DSDPB) และรำข้าวที่สีกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้วและผ่านการสีกัดร่วมด้วยการใช้ความร้อนภายใต้แรงดัน (ADSDPB).....

3.5 องค์ประกอบของกรดฟีนอลิกอิสระ (free phenolic acid) ของรำข้าวสีกัดไขมัน (rice bran), รำข้าวที่สีกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้ว (DSDPB) และรำข้าวที่สีกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้วและผ่านการสีกัดร่วมด้วยการใช้ความร้อนภายใต้แรงดัน (ADSDPB).....

3.6 องค์ประกอบของกรดฟีนอลิกยึดเหนี่ยว (bound phenolic acid) ของรำข้าวสีกัดไขมัน (rice bran), รำข้าวที่สีกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้ว (DSDPB) และรำข้าวที่สีกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้วและผ่านการสีกัดร่วมด้วยการใช้ความร้อนภายใต้แรงดัน (ADSDPB).....

3.7 พันธะที่พบในอะราบีโนไซด์ที่ได้จากปฏิกิริยา methylation ในรำข้าวสีกัดไขมัน (rice bran), รำข้าวที่สีกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้ว (DSDPB) และรำข้าวที่สีกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้วและผ่านการสีกัด

	ร่วมด้วยการใช้ความร้อนภายใต้แรงดัน (ADSDPB).....	38
3.8	ปริมาณฟีนอลิกอิสระ (free phenolic) ฟีนอลิกยึดเหนี่ยว (bound phenolic) และฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic) ของอะราบิโนไซแลนที่สกัดจากการแยกส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเอทานอลออกเป็น 3 ส่วน.....	40
3.9	ปริมาณกรดฟีนอลิกอิสระ (free phenolic acids) ของอะราบิโนไซแลนที่สกัดจากการแยกส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเอทานอลออกเป็น 3 ส่วน.....	41
3.10	ปริมาณกรดฟีนอลิกยึดเหนี่ยว (bound phenolic acids) ของอะราบิโนไซแลนที่สกัดจากการแยกส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเอทานอลออกเป็น 3 ส่วน.....	41
3.11	น้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยโดยน้ำหนัก น้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยโดยจำนวน และดัชนีการกระจาย ของอะราบิโนไซแลนที่สกัดจากการแยกส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเอทานอลออกเป็น 3 ส่วน.....	44
3.12	องค์ประกอบของ rice bran WUAX ที่สกัดด้วยกระบวนการตกตะกอนด้วยเอทานอล.....	46
3.13	พันธะที่พบในอะราบิโนไซแลนที่ได้จากปฏิกิริยา methylation ใน rice bran WUAX ที่สกัดด้วยกระบวนการตกตะกอนด้วยเอทานอล.....	48
3.14	ความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระของ rice bran WUAX ที่สกัดด้วยกระบวนการตกตะกอนด้วยเอทานอล วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH และ FRAP.....	52

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1.1 โครงสร้างของหน่วยย่อยที่พบในอะราบิโนไซแกลน.....	4
1.2 โครงสร้างของ hydroxycinnamic acids และอนุพันธ์.....	6
1.3 โครงสร้างของ dehydrodimers และ dehydrotrimers ของกรดเฟอร์ูลิกที่พบในเมล็ด ธัญพืช.....	9
3.1 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดหลังการให้ความร้อนภายใต้แรงดันที่ระยะเวลา 1 ถึง 8 ชั่วโมงร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์ endoxylanase 2 Unit เป็นเวลา 30 นาที.....	30
3.2 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้รับจากการย่อย autoclaved- destarched, deproteinised bran (ADSDPB) ด้วย <i>Bacillus subtilis</i> endoxylanase 5 และ 10 ยูนิต เป็นเวลา 0.5 ถึง 12 ชั่วโมง.....	31
3.3 ผลของ WUAX จากรำข้าวที่ผ่านการแยกส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเอทานอลต่อ การรอดชีวิต (% cell viability) ของเซลล์ HepG2 เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT assay....	55
3.4 ผลของ WUAX จากรำข้าวที่ผ่านการแยกส่วนด้วยเอทานอล ต่อระดับของ ROS ภายในเซลล์ HepG2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด ROS ด้วย <i>t</i> -BuOOH.....	57

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

รำข้าว (rice bran) เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่ได้มาระหว่างกระบวนการกะเทาะเปลือกและการขัดสีข้าวเปลือกให้ได้ข้าวสาร มีประมาณร้อยละ 10.5 ของข้าวทั้งเมล็ด รำข้าวจัดเป็นวัตถุดิบราคาสูงที่ส่วนใหญ่拿去ไปใช้เลี้ยงสัตว์ และบางส่วนนำไปสกัดเป็นน้ำมันแต่การนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นยังไม่มากนัก รำข้าวประกอบด้วยชั้นเยื่อหุ้มเมล็ด (kernel) ชั้นต่างๆ และจมูกข้าว (germ) เป็นส่วนใหญ่ซึ่งเป็นส่วนที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงที่สุดของข้าว (Rohrer และ Siebenmorgen, 2004) รำข้าวประกอบไปด้วยสารอาหารต่างๆ ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ได้แก่ คาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลัก (ร้อยละ 31.1-52.3) ไขมัน (ร้อยละ 15.0-19.7) โปรตีน (ร้อยละ 12.0-15.0) เยื่อใยหยาบ (ร้อยละ 7.0-11.4) จากองค์ประกอบดังกล่าวทำให้รำข้าวมักจะถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดเป็นน้ำมันรำข้าว หรือถูกนำไปผลิตเป็นอาหารสัตว์ และในบางครั้งก็มีการผลิตโปรตีนเข้มข้นจากกากรำข้าวที่เหลือจากการสกัดน้ำมัน อย่างไรก็ตาม กากรำข้าวที่เหลือยังมีคาร์โบไฮเดรตและเยื่อใยอยู่มากที่ประกอบไปด้วยอะราบิโนไซแลน เฮมิเซลลูโลส (Arabinoxylan Hemicellulose) ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์และผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงได้ นอกจากนี้ รำข้าวยังอุดมไปด้วยวิตามินซึ่งได้แก่ วิตามินอี ไทอามิน ไนอาซิน รวมไปถึงเกลือแร่ เช่น อะลูมิเนียม แคลเซียม คลอรีน เหล็ก แมงกานีส แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม โซเดียม และสังกะสี อีกด้วย (Sunders (1990) และ Ryan (2011) ได้รายงานเพิ่มเติมไว้ด้วยว่ารำข้าวยังประกอบไปด้วยสารออกฤทธิ์สำคัญในปริมาณสูง เช่น Ferulic acid, g-oryzanol, Inositol hexaphosphate, Campesterol, b-sitosterol, Linoleic acid,  $\alpha$ -tocopherol, Tocotrienol, Salicylic acid, Caffeic acid, Coumaric acid และ Tricin เป็นต้น โดยสารดังกล่าวมีประโยชน์ต่อร่างกายอย่างยิ่งในกิจกรรมด้านการป้องกันโรค ร้ายต่าง ๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจและโรคมะเร็ง

สารไฟโตเคมิคอลที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่พบในรำข้าวคือสารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอล ที่พบมากที่สุดคือกรดฟีนอลิก (phenolic acids) โดยเฉพาะกรดเฟอร์ูลิก (ferulic acid) ซึ่งเป็นเกาะติดอยู่กับอะราบิโนไซแลน (arabinoxylans; AX) และลิกนินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช กรดเฟอร์ูลิกเป็นสารที่มีคุณค่าสูงเนื่องจากมีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดออกซิเดชัน ยับยั้งแบคทีเรีย มีผลควบคุมการงอก และสามารถดูดซับรังสีอัลตราไวโอเล็ตได้ จึงมีการนำไปใช้ทั้งในอุตสาหกรรมอาหารและอื่นๆ (Rohrer และ Siebenmorgen, 2004; Ergun, Coban, Onurdag, และ Banoglu, 2012) นอกจากนี้สารสกัดจากรำข้าวมีผลด้าน anti-complementary activity และมีผลให้

เซลล์มะเร็งเกิดกระบวนการ apoptosis และยังส่งผลช่วยเสริมฤทธิ์ของยารักษามะเร็งต้านมะเร็งด้วย (Ghoneum และ Gollapudi, 2003; Ghoneum, Halminton, และ Gollapudi, 2004; Gollapudi และ Ghoneum, 2008) การศึกษาการต้านทานการเกิดออกซิเดชันของรำส่วนใหญ่เป็นการศึกษาจากสารสกัดจากรำข้าวสาลี พบว่าสารสกัดอะราบิโนไซแลนที่มีกรดเฟอร์ูลิก (feruloyl arabinoxylans) เป็นองค์ประกอบอยู่ในโมเลกุลช่วยให้ผลในการต้านออกซิเดชันได้ดีกว่ากรดเฟอร์ูลิกอิสระ และความสามารถนี้เพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนน้ำตาลในสายโพลิเมอร์อะราบิโนไซแลนเพิ่มขึ้น (Ishii, 1997; Ohta, Yamasaki, Egashira, และ Sanada, 1994; Ohta, Semboku, Kuchii, Egashira, และ Sanada, 1997; Wang, Zhang, และ Chen, 2008)

ในปัจจุบันประเทศไทยยังครองความเป็นหนึ่งของการส่งออกข้าวในตลาดโลก ประมาณ 30% ของตลาดส่งออกทั้งหมด ตามมาด้วยเวียดนาม สหรัฐอเมริกา ปากีสถาน จีน และอินเดีย ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสถานการณ์ของการส่งออกข้าวโดยรวมของประเทศไทย ยังมีภาวะถดถอยราคาข้าวยังไม่เป็นที่น่าพอใจของเกษตรกร เนื่องจากมีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้องทั้งในด้านการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร ระบบชลประทานที่ส่งเสริมปริมาณผลผลิต การแปรรูปข้าวในเชิงอุตสาหกรรม และรวมไปกับการค้าข้าวภายใต้องค์การการค้าโลก (WTO) (กรมวิชาการเกษตร, 2543) การใช้ประโยชน์จากรำข้าวมีค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับคุณค่าและปริมาณที่เกิดในอุตสาหกรรม (Moongngarm, Daomukda, และ Khumpika, 2012) ซึ่งในปีหนึ่งๆ ประเทศไทยมีผลพลอยได้รำข้าวจากกระบวนการขัดสีข้าวประมาณ 3 ล้านตันต่อปี (official of Agricultural Economics, 2010) การคิดค้นพัฒนาและวิจัยด้านข้าวจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะสร้างผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มทางการเกษตร โดยกากรำข้าวจัดเป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีราคาถูก แต่มีปริมาณสารไฟโตเคมีคอลสูง ดังนั้น การนำส่วนของกากรำข้าวมาสกัดสารอะราบิโนไซแลน (feruloyl arabinoxylans) จึงมีความคุ้มค่าในเชิงเศรษฐกิจ และทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของรำข้าวอีกด้วย

## 1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1.2.1. เพื่อศึกษาการสกัดอะราบิโนไซแลนในรำข้าวด้วยเอนไซม์
- 1.2.2. เพื่อเตรียมอะราบิโนไซแลนที่สกัดให้มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน
- 1.2.3. เพื่อประเมินผลการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของอะราบิโนไซแลนที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน

## บทที่ 2

### วรรณกรรมและทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง (Literature Reviews)

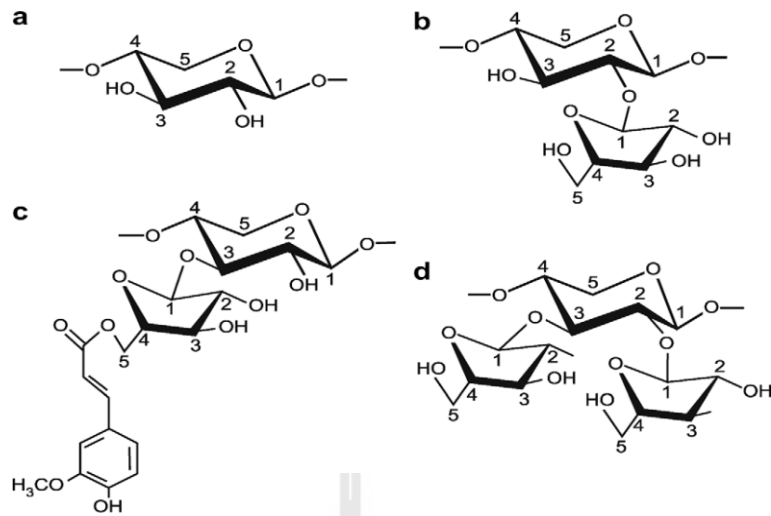
#### 2.1. โครงสร้างของอะราบิโนไซแลน (Arabinoxylan structure)

จากการศึกษาในระดับ โครงสร้างของรำข้าว อะราบิโนไซแลนเป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ประเภทเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์พืช ส่วนของผนังบางๆที่ห่อหุ้มเซลล์เมล็ดแป้ง (starchy endosperm) และส่วนของเนื้อเยื่อชั้น aleurone ของข้าวประกอบไปด้วยอะราบิโนไซแลน 40% (Izydorczyk และ Biliaderi, 1995) อะราบิโนไซแลนจากรำข้าวมีโครงสร้างซับซ้อนกว่าที่พบในรำข้าวสาลี (Shibuya และ Iwasaki, 1985)

โครงสร้างของอะราบิโนไซแลนที่พบในธัญพืชประกอบด้วยสายหลักของไซแลน (xylan) ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลไซโลส (D-xylopyranosyl residues; Xylp) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$  (1, 4) โดยมี  $\alpha$ -L-arabinofuranose (น้ำตาลอะราบิโนส; Araf) มาจับเป็นกิ่งก้านของสายหลักไซแลน โดยเข้าจับที่พันธะตรงตำแหน่ง O-2 และ/หรือ O-3 ของน้ำตาลไซโลส อัตราส่วนของอะราบิโนสต่อไซโลส (arabinose to xylose ratio; A/X) ในโมเลกุลอะราบิโนไซแลนมักถูกนำมาใช้อธิบายคุณลักษณะ โครงสร้างอย่างคร่าวๆ ของอะราบิโนไซแลนในลักษณะการเข้าแทนที่น้ำตาลไซโลสในสายหลักด้วยน้ำตาลอะราบิโนส (substitution pattern) อย่างไรก็ตามการระบุความซับซ้อนของโครงสร้างอะราบิโนไซแลนอย่างละเอียดและถูกต้องจำเป็นต้องอาศัยวิธีการอื่นที่มีความแม่นยำและถูกต้องสูง เช่น การตรวจสอบด้วยวิธี  $^1\text{H NMR}$  (Ordaz-Ortiz, Devaux, และ Saulnier, 2005)

จากการเข้าแทนที่ข้างต้นทำให้เกิดโครงสร้างหลักแบบ 4 ส่วนย่อยในโมเลกุลอะราบิโนไซแลน ดังรูปที่ 1.1 คือ (a) ส่วนของไซโลสที่ไม่ถูกแทนที่เลย (unsubstituted Xylp; uXylp) (b) และ (c) ส่วนของไซโลสที่ถูกแทนที่ด้วยอะราบิโนส (monosubstituted Xylp; mXyl) ที่ตำแหน่ง O-2 หรือ O-3 ตามลำดับ และ (d) ส่วนของไซโลสที่ถูกแทนที่ด้วยอะราบิโนสทั้งที่ตำแหน่ง O-2 และ O-3 (disubstituted Xylp; dXylp) โดยที่ตำแหน่ง O-5 ของอะราบิโนสบางโมเลกุลจับกับกรดเพอรูติกด้วยพันธะโควาเลนต์ของเอสเทอร์ ทั้งนี้แบบแผนการเข้าจับที่สายไซแลนของน้ำตาลอะราบิโนสจะแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดของพืช (Izydorczyk และ Biliaderi, 1995; Izydorczyk และ Dexter, 2008; Saulnier, Sado, Branlard, Charmet และ Guillon, 2007; Zhou และคณะ, 2010; Zhang, Li, Smith, และ Musa, 2015)





**รูปที่ 1.1** โครงสร้างของหน่วยย่อยที่พบในอะราบินโนไซแลน (a) unsubstituted Xylp; (b) monosubstituted Xylp at O-2; (c) monosubstituted Xylp at O-3; (d) disubstituted Xylp at O-2,3 (Izydorczyk และ Dexter, 2008)

อะราบินโนไซแลนในรัฐพืชพบได้ 2 รูปแบบ คือ อะราบินโนไซแลนที่สกัดได้ด้วยน้ำ (water-extractable AX; WEAX) และส่วนที่สกัดไม่ได้ด้วยน้ำ (water-unextractable AX; WUAX) ที่พบเป็นส่วนใหญ่ในรัฐพืชคือส่วนที่ไม่สามารถสกัดได้ด้วยน้ำ ความแตกต่างในเรื่องสมบัติในการละลายน้ำหรือสมบัติการละลายในสารประกอบแอลคาไลน์ของพอลิแซคคาไรด์เหล่านี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างในด้านแบบแผนของการจัดวางโมเลกุลของอะราบินโนสและโมเลกุลอื่นที่พบในโครงสร้างนั้นๆ ที่ส่งผลต่อการการขัดขวางหรือส่งเสริมการเข้าทำปฏิกิริยาของสารต่างๆ หรือแม้แต่การเกิดพันธะโควาเลนต์ของเอสเทอร์ระหว่างหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลของกรดฟีนอลิกกับหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิลของสายอะราบินโนไซแลนเอง รวมถึงการเกิด diferulic acid bridges ระหว่างสายอะราบินโนไซแลนข้างเคียงด้วยกันเองก็อาจส่งผลถึงความแตกต่างเรื่องสมบัติในการละลายน้ำของอะราบินโนไซแลนได้ด้วยเช่นกัน กล่าวได้ว่าลักษณะการกระจายตัวของ arabinose side chains บนสายหลัก xylan ก่อให้เกิดลักษณะการวางตัวของโครงสร้างอะราบินโนไซแลนที่ต่างกัน ส่งผลให้เกิดสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกันออกไปด้วย (Izydorczyk และ Biliaderi, 1995; Zhang, Li, Smith, และ Musa, 2015)

การศึกษาส่วน WUAX ของแป้งสาลี หลังจากผ่านการสกัดด้วยด่าง พบว่าโครงสร้างพื้นฐานของอะราบินโนไซแลนส่วนที่สกัดได้ด้วยด่าง (Alkaline-extractable arabinoxylan; AEAX) นั้นเหมือนกับโครงสร้างของ WEAX เพียงแต่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยสูงกว่า WEAX เล็กน้อย

นอกจากนี้ AEAX ยังมีสัดส่วน A/X ที่สูงกว่าเล็กน้อยเนื่องมาจากโมเลกุลประกอบไปด้วยส่วนของกิ่งอะราบิโนสที่มากกว่านั่นเอง (Ordaz-Ortiz, Devaux, และ Saulnier, 2005)

Pastell และคณะ ทำการสกัดอะราบิโนไซแลนจากแกลบข้าว แกลบข้าวบาร์เลย์ ช้าง ข้าวโพด และ oat spelts โดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ endoxylanase ทางการค้า (Shearzyme® GH10 eno-1,4-β-D-xylanase) พบว่าอะราบิโนไซแลนที่ได้ประกอบไปด้วยส่วนของโซ่ข้าง 2-O-β-Xylp-α-L-Araf ซึ่งต่างจากอะราบิโนไซแลนที่สกัดได้ด้วยวิธีอื่น (Pastell, Virkki, Harju, Tuomainen, และ Tenkenen, 2009) โดยทั่วไปอะราบิโนไซแลนที่พบในข้าวและข้าวฟ่างมักจะประกอบไปด้วยสายหลักของไซแลนที่มีกิ่งก้านจำนวนมากเมื่อเปรียบเทียบกับที่พบในข้าวสาลี ข้าวไรย์ และข้าวบาร์เลย์ นอกจากนี้ในโมเลกุลอาจจะพบน้ำตาลกาแลคโตส กรดกลูโคนิก และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคาร์บอน 5 อะตอมชนิดอื่นรวมอยู่ด้วย ทั้งนี้ค่า Ara/Xyl ratio ของอะราบิโนไซแลนที่พบในเอนโดสเปิร์มของธัญพืชแต่ละชนิดยังแตกต่างกันอีกด้วย แต่ปริมาณอะราบิโนไซแลนที่พบยังน้อยกว่าที่พบในส่วนของรำ (Izydorczyk และ Biliaderi, 1995)

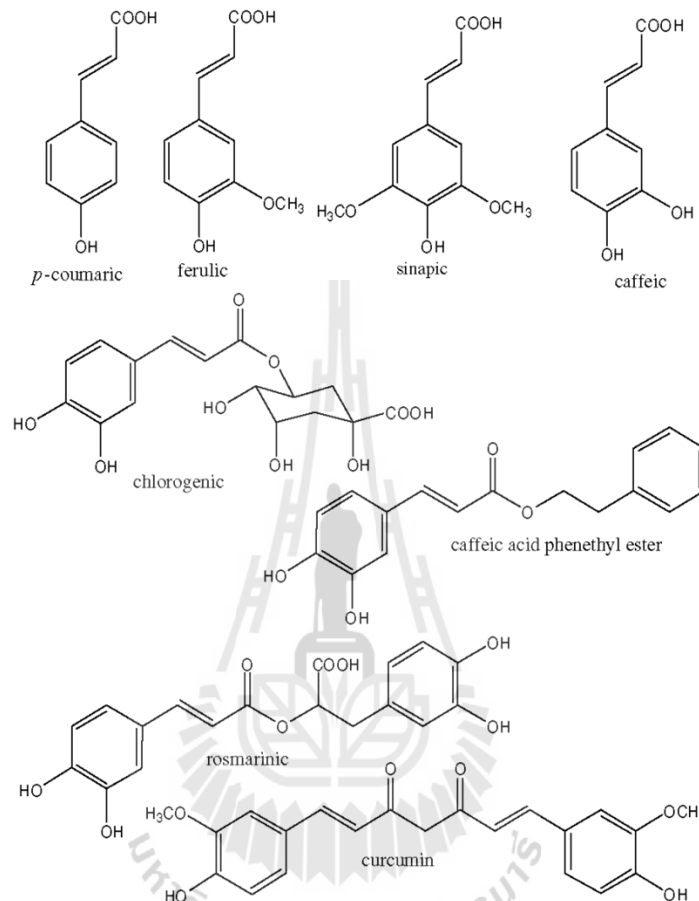
## 2.2. สารประกอบกรดฟีนอลิก (Phenolic acids)

สารประกอบฟีนอลิก (Phenolics หรือ Phenolic compounds) เป็นสารไฟโตเคมีคอลที่สำคัญที่พบพืชที่เป็นอาหารเพราะทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารสำคัญต่างๆของพืช ทั้งยังมีคุณสมบัติที่มีประโยชน์ในเชิงสุขภาพและการแพทย์อีกด้วย สารประกอบในกลุ่มนี้สามารถจำแนกได้เป็นหลายกลุ่ม ที่พบทั่วไปในพืชคือ กลุ่มสารประกอบกรดฟีนอลิก (Phenolic acids) กลุ่มสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) กลุ่มสารประกอบแทนนิน (Tannins) และกลุ่มสารประกอบลิกแนน (Lignans) (Nazck และ Shahidi, 2006)

สารประกอบกรดฟีนอลิกที่พบในพืชโดยธรรมชาติมี 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (Hydroxybenzoic acids) และกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิก (Hydroxycinnamic acids) ซึ่งกลุ่มที่พบมากในธัญพืช พืชตระกูลถั่ว พืชที่ให้น้ำมัน ผัก ผลไม้ และเครื่องดื่มนั้น คือกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิกและอนุพันธ์ เช่น กรดคูมาริก กรดคาเฟอิก กรดเฟอร์ูลิก และกรดไซแนปติก โดยมีโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูปที่ 1.2 พบได้ทั้งในรูปแบบที่เกาะตรึง (insoluble-bound form) อยู่กับสารประกอบสำคัญในผนังเซลล์ของพืช เช่น เซลลูโลส ลิกนิน และในรูปแบบ soluble form ซึ่งพบในส่วนของไซโทพลาสซึมของเซลล์ สารประกอบไฮดรอกซีซินนามิกมีฤทธิ์ในเชิงการแพทย์มากมาย เช่น มีความสามารถต้าน anti-inflammatory, antibacterial, antiproliferative, anticarcinogenic และมีความสามารถในการต้านทานการเกิดออกซิเดชัน เป็นต้น (Cheng และคณะ, 2007) ปริมาณ

สารประกอบกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิกและอนุพันธ์ที่พบในธัญพืชชนิดต่างดังแสดงในตารางที่

1.1



รูปที่ 1.2

โครงสร้างของ hydroxycinnamic acids และอนุพันธ์ (Shahidi และ Chและ rasekara, 2010)

กรดเฟอร์ูลิก (Ferulic acid หรือ 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid) เป็นสารประกอบไฮดรอกซีซินนามิกที่พบมากที่สุดธัญพืช เนื่องจากเป็น โมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระหว่างสายโพลีแซคคาไรด์ด้วยกันเองหรือเป็นตัวเชื่อมระหว่างสายโพลีแซคคาไรด์กับลิกนิน ทำให้เกิดโครงข่ายของผนังเซลล์ที่แข็งแรงซึ่งช่วยเสริมการยึดเกาะระหว่างเซลล์เนื้อเยื่อของพืชและช่วยยับยั้งการขยายตัวของเซลล์ที่มากเกินไป เฟอร์ูลิกถูกจัดให้เป็นสารเติมแต่งในอาหารที่มีฤทธิ์ในการถนอมอาหารและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ พบมากในส่วนของรำของเมล็ดธัญพืช เปลือกของผักผลไม้ และราก ทั้งในรูปอิสระ, soluble ester หรือ conjugate form และ insoluble-bound form โดยเกาะตรึงกับสายพอลิเมอร์อื่น เช่น ลิกนิน และอะราบีโนไซแลน ปริมาณของเฟอร์ูลิกอิสระที่พบใน

รัฐพีชมีเพียง 0.1-0.5% เท่านั้น ซึ่งส่วนมากที่พบในเมล็ดรัฐพีชจะอยู่ในรูปของ insoluble-bound form มีรายงานการตรวจวัดปริมาณกรดฟีลิกในข้าวและข้าวโพด พบว่าประกอบไปด้วยส่วนของ insoluble-bound form 74% และ 69% ของปริมาณฟีนอลิกรวม ตามลำดับ (Ishii, 1997; Zhao และ Moghadasian, 2008) ปริมาณกรดเฟอร์ูลิกที่พบในส่วนต่างๆของเมล็ดรัฐพีชแสดงในตารางที่ 1.2

**ตารางที่ 1.1** สารประกอบกรดไฮดรอกซีซินนามิกและอนุพันธ์ที่พบในรัฐพีชชนิดต่างๆ

รัฐพีช	Hydroxycinnamates
บาร์เลย์ (barley)	Ferulic, <i>p</i> -coumaric, caffeic, chlorogenic acids, 8-O-4 diFA, 5-5 diFA, 8-5 diFA (benzofuran) 8-5 diFA
ข้าวโพด (corn)	Ferulic, <i>p</i> -coumaric, 8-5 diFA, 8-8 diFA (cyclic), 8-O-4diFA
ข้าวโอ๊ต (oat)	Ferulic, caffeic, <i>p</i> -coumaric, sinapic, <i>o</i> -coumaric acids, Avenanthramides
ข้าว (rice)	Ferulic, <i>p</i> -coumaric, caffeic acids, 5-5 diFA, 5-8 diFA (benzofuran form), 8-5 diFA, 8-8 diFA, 8-O-4 diFA, 4-O-5 diFA, 6-O-(E)-feruloylsucrose, 6-O-(E)-sinapoylsucrose, feruloyl esters of triterpene alcohols และ sterols, <i>o</i> -methoxycinnamic acid, arabinoxylanferulate, disinapates
ข้าวไรย์ (rye)	Ferulic, caffeic, <i>p</i> -coumaric, sinapic acids, 8-O-4 diFA
ข้าวสาลี (wheat)	Ferulic, caffeic, <i>p</i> -coumaric, sinapic acids, campestanil, sitostanyl (steryl ferulates), 8-8 diFA (cyclic), 5-8 diFA, 5-5 diFA, 8-O-4 diFA, 8-5 diFA (benzofuran)

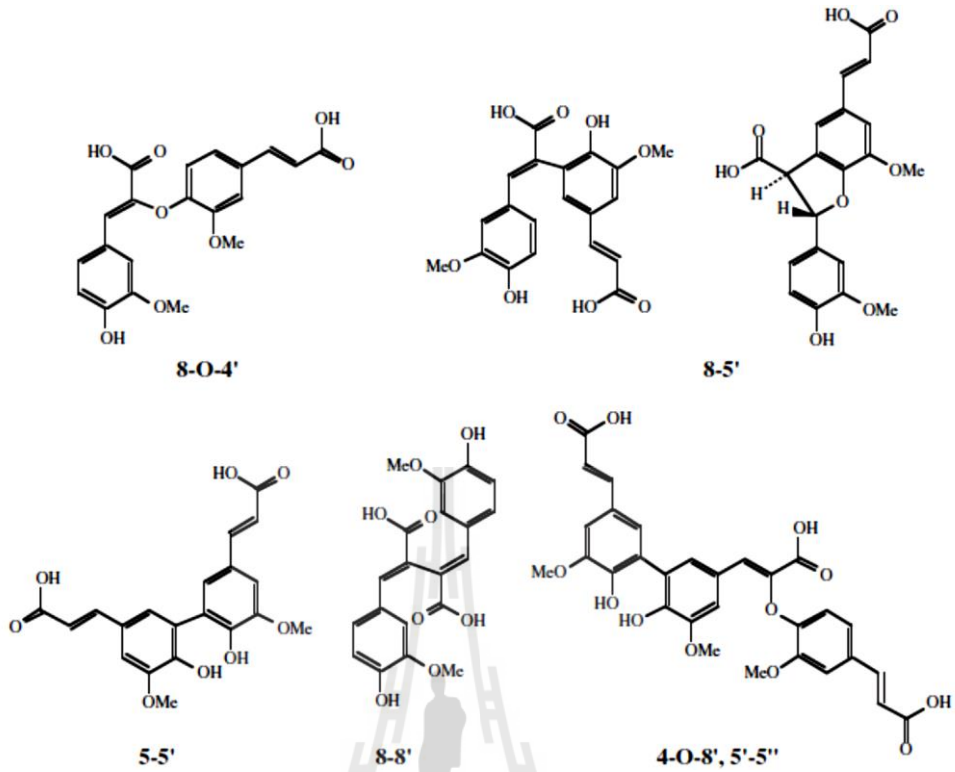
(ดัดแปลงจาก Shahidi และ rasekara, 2010)

ลักษณะโครงสร้างของเฟอร์ูลิกในรูป dehydrodimer และ dehydrotrimer ของเฟอร์ูลิกที่พบในเซลล์พืชแสดงดังรูปที่ 1.3 ปริมาณของสารประกอบไฮดรอกซีซินนามิกจะแตกต่างกันไปตามชนิดของเนื้อเยื่อและชนิดของรัฐพีช กรดเฟอร์ูลิกและ dehydrodimer ของเฟอร์ูลิกพบมากในส่วน เนื้อเยื่อชั้นนอกของเปลือก (outer layer of kernel) และ เนื้อเยื่อชั้น aleurone ของผนังเซลล์พืช ซึ่งเป็นส่วนที่มีอะราบิโนไซแลนปริมาณมาก ในขณะที่ dehydrotrimer ของเฟอร์ูลิกพบได้เฉพาะส่วนเนื้อเยื่อชั้นเพอริคาร์พของข้าวสาลี (Saulnier, Sado, Branlard, Charmet และ Guillon, 2007) การเข้าจับของเฟอร์ูลิกกับ โพลีแซคคาไรด์ด้วยพันธะเอสเทอร์เกิดเป็น Feruloyl polysaccharide และ แม้แต่การจับกันเองของกรดเฟอร์ูลิกเกิดเป็น acid dimer/trimer มีส่วนสำคัญในการเกิดโครงข่ายสารประกอบของผนังเซลล์ที่แข็งแรงที่ช่วยป้องกันการเสื่อมสลายทางชีวภาพของผนังเซลล์อันเกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์ได้ดี (Ishii, 1997)

ตารางที่ 1.2 ปริมาณกรดเฟอร์ูลิกในส่วนต่างๆของเมล็ดธัญพืช

Grain	Ferulic acid content (mg/100 g)
Refined corn bran	2,610-3,300
Barley extracts	1,358-2,293
Soft และ hard wheat bran	1,351-1,456
Rice endosperm cell wall	910
Fine wheat bran	530-540
Rye bran	280
Corn dehull kernels	174
Whole wheat kernels	64-127
Whole wheat flour	89
Whole grain rye flour	86
Whole brown rice	42
Corn flour	38
Whole oats	25-35
Whole grain barley flour	25-34
Oat bran	33

(ดัดแปลงจาก Zhao และ Moghadasian, 2008)



**รูปที่ 1.3** โครงสร้างของ dehydrodimers และ dehydrotrimers ของกรดเฟอร์ูลิกที่พบใน เมล็ดคัษฎูพีช (ดัดแปลงจาก Saulnier, Sadao, Branlard, Charmet, และ Guillon, 2007)

### 2.3. ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและภาวะเครียดออกซิเดชัน (Antioxidant activity และ Oxidative stress)

อนุมูลอิสระ (free radicals) คือ สารที่มีอิเล็กตรอนที่ขาดคู่อยู่ในวงรอบนอกของอะตอม ทำให้โมเลกุลไม่มีความเสถียร จึงจำเป็นต้องหาอิเล็กตรอนมาเข้าคู่เพื่อก่อให้เกิดความเสถียรขึ้นในโมเลกุล จึงเกิดการเข้าแย่งอิเล็กตรอนจากสารอื่นมาเข้าคู่กับอิเล็กตรอนอิสระของมันเอง ซึ่งสารที่ถูกแย่งอิเล็กตรอนไปก็กลายเป็น โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนขาดคู่ เป็น โมเลกุลที่ไม่มีความเสถียรหรือกลายเป็นอนุมูลอิสระนั่นเองกระบวนการนี้เกิดขึ้นเป็นลูกโซ่ต่อเนื่องไปเรื่อยๆ จึงก่อให้เกิดการสะสมของอนุมูลอิสระในระบบมากขึ้นเรื่อยๆ หากไม่มีการกำจัดออกไปจะก่อให้เกิดปัญหาต่อระบบได้ การผลิตอนุมูลอิสระเช่นนี้เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตทั่วไป เช่น ของเสียที่เกิดจากกระบวนการย่อยอาหาร และร่างกายอาจรับมาจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น การสูบบุหรี่ อากาศที่เป็นพิษ และรังสีต่างๆ อนุมูลอิสระสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ในร่างกายได้อย่างง่ายดาย เช่น DNA ไขมัน โปรตีน จนก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ได้

อนุมูลอิสระมีอายุสั้นและไวต่อการเข้าทำปฏิกิริยาเคมีมาก นอกจากนี้ยังมีสารกระตุ้นอีกหนึ่งตัวที่สำคัญ เรียกว่า reactive oxygen species (ROS) คือโมเลกุลที่มีความไวต่อการทำปฏิกิริยา โดย ROS อาจจะเป็นอนุมูลอิสระหรือไม่ใช่อนุมูลอิสระ (nonradicals) ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ และ ROS ได้แก่ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide anion radical) อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) อนุมูลเพอร์ออกไซด์ (peroxide radical) อนุมูลเพอร์ออกซิล (peroxyl radical) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) โอโซน (ozone) ออกซิเจนอะตอมเดี่ยว (singlet oxygen) อนุมูลไฮโดรเจน (hydrogen radical) และอนุมูลเมทิล (methyl radical) เป็นต้น (อนันต์ สฤตภูมิ, 2551)

อนุมูลอิสระมีความจำเป็นต่อร่างกายของคนเราเพื่อรักษาสมดุลภายในร่างกายแต่ต้องการเพียงในระดับต่ำมาก หากมีการสะสมของอนุมูลอิสระในร่างกายมากเกินไปจะก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อถูกทำลายจนเสียหาย อันก่อให้เกิดความเสื่อมถอยของวัย (aging) โรคเรื้อรังต่างๆ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันทำวานผิดปกติ โรคไขข้ออักเสบ โรคอัลไซเมอร์และโรคพาร์กินสัน เป็นต้น เซลล์ที่เสียหายอาจเกิดการกลายพันธุ์ของเซลล์จนกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ในที่สุด (Klaunig และ Kamendulis, 2004) สารแอนติออกซิแดนซ์ช่วยยับยั้งการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์โดยเข้าไปแทรกแซงในขั้นต่างๆของปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทั้งนี้วิธีการยับยั้งออกซิเดชันอาจเกิดจากหลายกลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ (Halliwell, 2007)

สารต้านอนุมูลอิสระอาจจะมาจากแหล่งธรรมชาติหรือเป็นสารสังเคราะห์ขึ้นซึ่งมีฤทธิ์เป็นสารชะลอหรือสารป้องกันการเกิดออกซิเดชันของสารเริ่มต้นหรือซับซ้อนนั้นๆได้ สารต้านอนุมูลอิสระยับยั้งการทำงานของอนุมูลอิสระโดยการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระนั้นเพื่อให้เปลี่ยนไปเป็นโมเลกุลสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่ถูกทำลายจากอนุมูลอิสระของออกซิเจน (Bagchi และคณะ, 2000) สารอาหารหลายชนิดมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินอี วิตามินซี แมงกานีส กลูต้าไธโอน โคนเอนไซม์ควินเทน ซิลิเนียม แคโรทีนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิก เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ป้องกันหรือยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน โดยเข้ากำจัด carbon-centered radicals และ peroxyl radical ที่เกิดขึ้นในระบบ (Groppe และคณะ, 2005) มีการศึกษาทางการแพทย์และระบาดวิทยามากมายพบว่า การบริโภคผักและผลไม้ในปริมาณมากมีส่วนช่วยป้องกันการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ ได้มากมาย รวมทั้งช่วยในเรื่องปัญหาต่างๆ ที่มาพร้อมกับวัยที่เพิ่มขึ้น เพราะในผักและผลไม้มีสารไฟโตเคมิคอลที่มีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันจำนวนมาก สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์เกิดความเสียหายอันเกิดจากอนุมูลอิสระได้ เป็นผลให้มีการยับยั้งหรือป้องกันการเกิดโรคมะเร็งหรือโรคเกี่ยวกับหัวใจได้ (Babich

และคณะ, 2011) สารต้านอนุมูลอิสระพบได้ตามธรรมชาติในผัก ผลไม้ พืชสมุนไพรและเครื่องเทศ ัญชู่พืช หรือแม้แต่เปลือกไม้ต่างๆ เป็นต้น มีการศึกษาว่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันของ พืชสมุนไพรที่ใช้ในอาหารมากมาย พบว่าพืชสมุนไพรแห้งมีความสามารถในการเป็นต้านอนุมูล ออิสระได้สูงถึง  $465 \text{ nmol Fe}^{2+}/100 \text{ g}$  น้ำหนักแห้งของสมุนไพร (Dragl และคณะ, 2003) การบริโภค สารไฟโตเคมิคอลหลายชนิดพร้อมกัน ถึงแม้จะปริมาณน้อยในแต่ละชนิดอาจจะส่งผลที่ดีต่อ สุขภาพมากกว่าการได้รับสารไฟโตเคมิคอลชนิดเดียวหรือน้อยชนิดในปริมาณมากในครั้งเดียว มี การศึกษามากมายพบว่าสารไฟโตเคมิคอลจากพืชที่มีสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งอาจช่วย ลดความเสี่ยงของการเป็นมะเร็งและโรคเกี่ยวกับหัวใจ (Babich และคณะ, 2011)

สารต้านอนุมูลอิสระมีคุณสมบัติในการทำให้อนุมูลอิสระเหล่านี้กลับสู่สภาวะเสถียรโดย ทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ โดยที่ตัวมันเองไม่เปลี่ยนตัวเองไปอยู่ในสถานะอนุมูลอิสระ จึงช่วยป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหายภายในเซลล์ได้ เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระมีความเสถียร ของโมเลกุลทั้งก่อนและหลังการเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามสมบัติการยับยั้งหรือ ป้องกันออกซิเดชันของตัวมันก็หมดไปด้วยหลังจากจ่ายอิเล็กตรอนใหแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว กระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์เกิดขึ้นตลอดเวลาทำให้มีการผลิตสารอนุมูลอิสระอยู่ ตลอดเวลาเช่นกัน ดังนั้นความเสี่ยงที่อนุมูลอิสระในร่างกายคนเราจะก่อให้เกิดโรคต่างๆ มีอยู่เสมอ และจะเพิ่มขึ้นไปตามอายุ จึงเป็นเหตุผลว่าทำไมเราจึงควรบริโภคหรือรับสารต้านอนุมูลอิสระเข้าสู่ ร่างกายไปอย่างต่อเนื่องเพื่อเสริมสร้างระบบการต่อต้านการเกิดออกซิเดชันภายในร่างกายให้มี ประสิทธิภาพมากขึ้น

ในระบบของสิ่งมีชีวิต สารต้านอนุมูลอิสระอาจหมายถึงสารใดๆที่เมื่ออยู่ร่วมกับสารตั้งต้น ที่สามารถเกิดออกซิเดชันได้ง่าย แล้วสามารถช่วยชะลอหรือป้องกันการเกิดออกซิเดชันของสารตั้ง ต้นนั้นแม้จะพบความเข้มข้นต่ำก็ตาม สารตั้งต้นของปฏิกิริยาออกซิเดชันที่พบในสิ่งมีชีวิตมักเป็น สารประกอบไขมัน โปรตีน DNA หรืออาจเป็นคาร์โบไฮเดรต หากสารตั้งต้นของการเกิด ออกซิเดชันคือไขมัน กลไกหลักในการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระคือเข้าไปทำลายส่วนของ ปฏิกิริยาถูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ หรือแม้แต่ขัดขวางการเกิด pro-oxidant effects โดยการเข้า ไปจับกับโมเลกุลโปรตีนที่มีส่วนของ catalytic metal sites ก็เป็นอีกหนึ่งกลไกการทำงานของสาร ต้านอนุมูลอิสระในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันเช่นกัน ความซับซ้อนของกลไกการทำงานของสาร ต้านอนุมูลอิสระจึงจำเป็นต้องนำมาเป็นปัจจัยในการเลือกใช้วิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารนั้นๆ เพื่อการระบุความสามารถอย่างถูกต้อง และน่าเชื่อถือ ส่วนใหญ่การทดสอบความสามารถการต้านออกซิเดชันมักทำขึ้นในสภาวะที่มีสาร ตั้งต้นที่ไวต่อการเกิดออกซิเดชันเพียงประเภทเดียวคือสารประกอบไขมันในระบบการทดลองนั้น



อาจเป็นเพราะว่าสารประกอบไขมันจัดเป็นสารตั้งต้นที่มีผลต่อการเกิดออกซิเดชันมากและง่ายที่สุด อย่างไรก็ตามในความเป็นจริงระบบของสิ่งมีชีวิตมีความซับซ้อนมากกว่านั้นเพราะมีการอยู่ร่วมกันของสารตั้งต้นที่ไวต่อการเกิดออกซิเดชันหลายชนิดในระบบเดียวกัน วิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับหลักหรือกลไกในการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ หากวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ใช้หลักการเรื่องความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการเข้าจับกับอนุมูลอิสระ (Radical scavenging test) ก็ควรกล่าวอธิบายความสามารถอย่างเจาะจงว่าเป็นความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยการเข้าจับอนุมูลอิสระซึ่งไม่ได้หมายถึงความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยการเข้าจับกับโลหะ (Metal chelating mechanism) ทั้งนี้จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าในระบบของสิ่งมีชีวิตหรือแม้แต่ระบบของอาหารนั้นมีความซับซ้อนของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันมาก ดังนั้นในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันในระบบที่ซับซ้อนดังกล่าวจึงต้องเกิดจากกลไกในการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระหลายกลไก จึงจะก่อให้เกิดการต้านออกซิเดชันนั้นสัมฤทธิ์ผล (Frankel และ Meyer, 2000)

#### 2.4. ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกและอะราบิโนไซแลน (Antioxidant activity of phenolics และ arabinoxylan)

จากงานวิจัยมากมายพบว่าสารประกอบฟีนอลิกและอะราบิโนไซแลนที่พบมากในธัญพืชมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยสารฟีนอลิกในส่วนที่เป็น insoluble-bound phenolics คือส่วนที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด รองมาคือ soluble-conjugated phenolics และ สารฟีนอลิกในรูปอิสระตามลำดับ (Madhujith และ Shahidi, 2009) จากการศึกษาในระบบการเกิดออกซิเดชัน Ethyl linoleate ที่มีการสร้าง peroxide radicals 4 ชนิด กรดเฟอรูลิก (ในรูป methyl ester) ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยอาศัยกลไกการเข้าจับยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยกลไก free radical scavenging reaction ซึ่งเกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 3'-ของ ferulate radical ทำให้อนุมูลอิสระ peroxides ดำเนินเข้าสู่กระบวนการ Diels-Alder reaction เพื่อที่อนุมูลอิสระนั้นนั้นจะได้เปลี่ยนรูปไปเป็น tricyclics peroxides ที่มีความเสถียร (Yamada, Maekawa, Takeda, และ Yamaguchi, 2006)

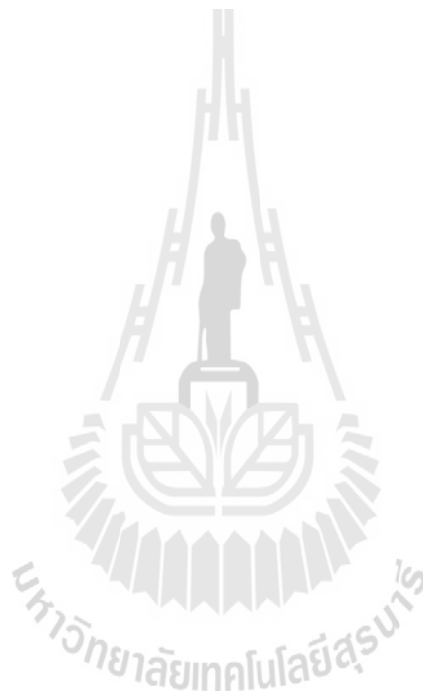
การศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ Ferulic acid-arabinoxylan ester ที่สกัดจากรำข้าวโพด (Ohta, Semboku, Kuchii, Egashira และ Sanada, 1997; Zhao, Egashira และ Sanada, 2003) ด้วยวิธีการย่อยด้วยออกซาลิทและตามด้วยการแยกส่วน โดยเทคนิค Gel filtration พบว่ากรดเฟอรูลิกในรูปที่จับกับสารอื่น (Ferulic acid sugar esters) เช่น 5-*o*-feruloyl-L-arabinofuranose และ Ferulic acid-arabinoxylan ester มีประสิทธิภาพในการต้านการเกิดออกซิเดชันของสารประกอบไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ (Low density lipoprotein; LDL) ได้

มากกว่ากรดเฟอร์ูลิกอิสระ แสดงว่าความแตกต่างของความสามารถในการเข้าจับกับโมเลกุลของ LDL ระกวางกรดเฟอร์ูลิกในรูปอิสระ กับ รูปที่เกาะพ่วงกับสารอื่นมีผลต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชันเป็นอย่างยิ่ง

Katapodis และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตโพลิโกแซคคาไรด์ที่เกาะเชื่อมกับกรดเฟอร์ูลิก ด้วยพันธะเอสเทอร์ (Feruloylated oligosaccharides) จากส่วนของอะราบีโนไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ ในแป้งสาลี (insoluble wheat flour arabinoxylan) โดยวิธีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ *Thermoascus aurantiacus* family 10 Endoxylanase และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Anion-exchange และ Size-exclusion chromatography จากการระบุองค์ประกอบ พบว่า โพลิโกแซคคาไรด์ที่ได้ประกอบด้วย อะราบีโนสและไซโลส ในอัตราส่วนโมเลกุล 1:3 จึงระบุว่าโพลิโกแซคคาไรด์นี้ คือ Feruloyl arabinoxylotrisaccharide (FAX) การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยการเป็น free radical scavenger ด้วยวิธี DPPH reduction assay ซึ่งเป็นวิธีที่ตรวจวัดโดยอาศัยความสามารถในการให้อนุมูล H• ของตัวสารต้านอนุมูลอิสระเองให้กับ DPPH radical ก่อให้เกิดโมเลกุลของ DPPH radical ใหม่ที่มีความเสถียรสูงพอที่จะไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระเป็นลูกโซ่ต่อเนื่องไปเรื่อยๆ นั้นพบว่า FAX มีความสามารถในการจับกับ DPPH radical ต่ำกว่ากรดเฟอร์ูลิกอิสระ โดยมีค่า EC<sub>50</sub> มากกว่าของกรดเฟอร์ูลิกถึงเกือบ 6 เท่า แต่เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันในระบบการเกิดออกซิเดชันแบบ Copper-mediate oxidation ของ LDL กลับพบว่า FAX มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันมากกว่ากรดเฟอร์ูลิกอิสระ โดยวัดจากความเข้มข้นของสารประกอบ conjugated lipid hydroperoxides (conjugates dienes) ที่เกิดขึ้นในระบบตามระยะเวลาของการเกิดออกซิเดชันที่กำหนดไว้ 60 นาที ปริมาณ conjugated dienes ที่ตรวจพบในระบบที่ใช้ FAX เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมีน้อยกว่าที่พบในระบบที่มีกรดเฟอร์ูลิกอิสระเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ระดับความเข้มข้นที่ศึกษาเท่ากัน และพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 32  $\mu$ M FAX สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้เกือบสมบูรณ์

จากการศึกษาข้างต้น กล่าวได้ว่าลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของสารต้านอนุมูลอิสระมีผลต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ทั้งนี้ขึ้นกับกลไกของการเข้าทำปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระและลักษณะการเกิดออกซิเดชันในระบบนั้นๆ เป็นสำคัญ ในกรณีของ Feruloyl arabinoxylotrisaccharide ที่พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของ LDL ได้มากกว่ากรดเฟอร์ูลิกอิสระ ถึงแม้ว่าความสามารถในการเป็น DPPH radical scavenger จะต่ำกว่าก็ตาม นั้นเนื่องมาจากในระบบการเกิดออกซิเดชันของ LDL ที่ศึกษาประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นทั้ง hydrophilic (aqueous) phase และ lipophilic phase ดังนั้นความสามารถของโมเลกุลสารต้านอนุมูลอิสระในการเข้าถึง radicals หรือเข้าไปทำปฏิกิริยากับส่วนต่างๆ ในระบบย่อมเกี่ยวข้องกับ partition

coefficientcy ระหว่าง aqueous phase และ lipophilic phase ของสารต้านอนุมูลอิสระนั้นๆ จาก โครงสร้างโมเลกุล Feruloyl arabinoxylotrisaccharide ที่ประกอบด้วยส่วนของน้ำตาลทำให้โมเลกุล มีความเป็น hydrophilic สูงกว่ากรดเฟอร์ูลิกอิสระ ทั้งยังมีส่วนของโมเลกุลที่เกิดจาก ethyl esterification ระหว่าง arabinoxylan กับกรดเฟอร์ูลิกที่มีสมบัติความเป็น lipophilic ดังนั้นการทำหน้าที่ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ Feruloyl arabinoxylotrisaccharide ในระบบดังกล่าวจึง เกิดจากความสามารถในการเข้าทำงานทั้งสองเฟสในระบบ ต่างจากกรดเฟอร์ูลิกอิสระที่เข้าทำ หน้าที่สารต้านอนุมูลอิสระได้เพียงในส่วน aqueous phase ของระบบเท่านั้น (Katapodis และคณะ, 2003; Ishii, 1997; Kikuzaki และคณะ, 2002; Ohta, Yamasaki, Egaehira, และ Sanada, 1994)



### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### 3.1. วัตถุดิบและสารเคมี

รำข้าวสาคัดไข่มันได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท น้ำมันรำข้าวสุรินทร์ จำกัด สารเคมี ได้แก่ Ascorbic acid, 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH), 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP), amyloglucosidase A7095, arabinose, bovine serum albumin (BSA), N,O-bis trimethylsilyl trifluoroacetamide (BSTFA), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA), dimethyl sulfoxide (DMSO), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 4-dimethylaminocinnamaldehyde, ferulic acid, glucuronic acid, galactose, galacturonic acid monohydrate, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), hanks' balance salt solution (HBSS), phenol, quercetin, sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ), sulfuric acid, trimethylchlorosilane (TMCS) และ trimethylchlorosilane, trysin (EDTA) จากบริษัท Sigma-Aldrich Company Ltd. เมือง St. Louis ประเทศสหรัฐอเมริกา เอนไซม์ Endoxylanase จาก *Bacillus subtilis* GHF 11 (Grindamyl Powerbake) ได้รับจากบริษัท Danisco A/S ประเทศไทย Fetal bovine serum albumin (FBS) จากบริษัท Gibco เมือง New York ประเทศสหรัฐอเมริกา Iron (III) chloride ( $\text{FeCl}_3$ ), iron (II) sulphate ( $\text{FeSO}_4$ ) และ 2, 4, 6-Tripyridyl-s-triazin (TPTZ) จากบริษัท Merck เมือง KgaA ประเทศเยอรมันนี

##### 3.2. การเตรียมตัวอย่างเบื้องต้น

ตัวอย่างรำข้าวสาคัดไข่มันถูกนำมาให้ความร้อนด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาทีเพื่อกำจัดกิจกรรมของเอนไซม์ ตามด้วยการบดด้วยเครื่อง Ika-Werke M20 ร้อนผ่านตระแกรงขนาด 0.5 มิลลิเมตร และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

##### 3.3. การเตรียมอะราบิโนไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ (water-unextractable arabinoxylans, WUAX) จากรำข้าวสาคัดไข่มัน

##### 3.3.1. การเตรียมสารสกัดอะราบิโนไซแลนที่ไม่ละลายน้ำโดยการกำจัดสตาร์ชและโปรตีน และการให้ความร้อนภายใต้ความดัน

ทำการสกัดอะราบินโนไซแลนจากรำข้าวโดยการกำจัดสตาร์ชและโปรตีนด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Swennen และคณะ (2005) และ Yuan และคณะ (2005) โดยนำรำข้าว 12.5 กรัม เติมน้ำปราศจากไอออน (deionised water) 30 เท่า ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าอย่างสม่ำเสมอเพื่อให้เกิดการพองตัวเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้น เติมนอนไซม์แอลฟาอะมิเลส ( $\alpha$ -amylase) 937.5 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาทีภายใต้สภาวะควบคุมความชื้น จากนั้น ลดอุณหภูมิตัวอย่างจนถึงอุณหภูมิห้องและปรับสภาวะเป็นกลาง (pH 7.5  $\pm$  0.2) แล้วเติมนอนไซม์แอลคาเลส (alcalase) 375 ไมโครลิตร เขย่าผสม และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีภายใต้สภาวะควบคุมความชื้น จากนั้น สารละลายตัวอย่างถูกทำให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้องและปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 4.0-4.6 แล้วเติมนอนไซม์อะมิโลกลูโคซิเดส (amylglucosidase) 437.5 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังการย่อยด้วยเอนไซม์นำสารละลายตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 $\times$ g เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงรุ่น Thermo Scientific Sorvall Legend Mach 1.6 R ประเทศสหรัฐอเมริกา ตะกอนที่ได้นำไปละลายและล้างด้วยน้ำร้อน และล้างด้วยน้ำ DI จนกระทั่งน้ำที่ออกจากส่วนของสารกรองใส จากนั้น ล้างด้วยน้ำร้อนอีก 2 ครั้งและสุดท้ายล้างด้วยเอทานอลความบริสุทธิ์ 95% (v/v) และอะซิโตนตามลำดับ ตะกอนตัวอย่างที่ได้นำมาทำแห้งในเครื่องอบแห้งสุญญากาศ รุ่น WTB Binder ประเทศเยอรมันนี ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องบดรุ่น IKA -Werke M20 ประเทศเยอรมันนี และร่อนผ่านตระแกรงขนาด 250 ไมครอน ในขั้นตอนนี้ตัวอย่างที่ได้เรียกว่า destarched, deproteinised bran (DSDPB)

DSDPB ความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก (w/v) นำมาให้ความร้อนด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Hirayama HVA -110 เมือง Heidolph ประเทศเยอรมันนี) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-8 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 $\times$ g เป็นเวลา 10 นาที ตะกอนที่ได้ในขั้นตอนนี้เรียกว่า autoclaved DSDPB (ADSDPB) นำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง รุ่น Heto FD8 ประเทศแอฟริกาใต้ และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.3.2. การเตรียมสารสกัดอะราบินโนไซแลนที่ไม่ละลายน้ำโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล

#### 3.3.2.1. การย่อยด้วยเอนไซม์

WUAX เตรียมโดยวิธีดัดแปลงจาก Swennen และคณะ (2005) และ Yuan และคณะ (2005) กิจกรรมของเอนไซม์ endoxylanase จาก *Bacillus subtilis* วิเคราะห์โดยใช้ insoluble azurine crosslinked-arabinoxylan (AZCL-AX) ซึ่งอธิบายไว้ใน Megazyme Data sheet T-XAX200 โดยเอนไซม์ endoxylanase ทำการเจือจางใน โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ (sodium acetate buffer)

ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ (pH 4.7) สารละลายเอนไซม์เจือจางนำมาบ่มร่วมกับ AZCL-AX และ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/Visible spectrophotometer รุ่น Specto - Biochrom Libra S22 ประเทศสหราชอาณาจักร โดย 1 หน่วยกิจกรรมเอนไซม์ (1 unit) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสและ pH 4.7

ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการเติมเอนไซม์ที่ให้ปริมาณ WUAX สูงสุด โดยทดลองที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ endoxylanase 1, 2 และ 5 Unit สำหรับการเตรียม เอนไซม์ สารละลายเอนไซม์ endoxylanase (2 Unit/mL) เตรียมเริ่มต้นจาก endoxylanase 2.17 กรัม และ sodium acetate buffer ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ (pH 4.7) 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 30 นาทีและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ  $3,000 \times g$  เป็น เวลา 30 นาที สารละลายเอนไซม์เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในขั้นการเตรียมตัวอย่าง ตัวอย่าง แชนจ์แข็งผง DSDPB 10 กรัม นำมาละลายในน้ำ DI และเติมสารละลายเอนไซม์ endoxylanase แล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5 – 17.5 ชั่วโมงในตู้บ่มพร้อมเขย่า (New Brunswick Scientific Excella E24 series ประเทศสหราชอาณาจักร) ตัวอย่างที่ย่อยถูกเก็บที่ระยะเวลา 0.5, 2.5, 7.5 และ 17.5 ชั่วโมงเพื่อทำการวิเคราะห์ ตัวอย่างที่เก็บระยะเวลาต่างๆ ทำการหยุดกิจกรรมของ เอนไซม์ endoxylanase โดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ  $10,000 \times g$  เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสเหนือตะกอน (rice bran WUAX supernatant) และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำไปแยกส่วนด้วยเอทานอล

### 3.3.2.2. การแยกส่วนโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล

Rice bran WUAX supernatant จากข้างต้น สามารถแยกออกเป็น 3 ส่วน โดยการ ตกตะกอนด้วยเอทานอล เติมเอทานอลโดยกวนต่อเนื่องให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 60% โดย ปริมาตร (v/v) จากนั้นกวนผสมต่อเนื่องเป็นเวลา 30 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ  $10,000 \times g$  อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น Thermo Scientific Sorvall Legend Mach 1.6R ประเทศสหรัฐอเมริกา เก็บตะกอนที่ได้และนำไปละลายในน้ำ DI และทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง รุ่น Heto FD8 ประเทศแอฟริกาใต้ โดยตะกอนตัวอย่างส่วนนี้เรียกว่า F60 จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลเป็น 90% (v/v) และทำการตกตะกอนด้วยวิธีข้างต้น ตะกอนตัวอย่างส่วนนี้เรียกว่า F6090 ของเหลวส่วนที่เหลือนำไปประเหยเอทานอลด้วยเครื่องเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary

evaporator) รุ่น Buchi Rotavapor R-114 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ ตะกอนที่ได้จากส่วนนี้เรียกว่า F90

### 3.4. การตรวจสอบสมบัติทางเคมีและกายภาพของรำข้าวและอะราบีโนไซแลนจากรำข้าว

#### 3.4.1. การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น (Proximate compositions)

ปริมาณความชื้น โปรตีน ใยอาหารทั้งหมด (total dietary fiber, TDF) ใยอาหารที่ละลายไม่ได้ (insoluble dietary fiber, IDF) และใยอาหารที่ละลายได้ (soluble dietary fiber, SDF) ของแป้ง ลูกเดือยวิเคราะห์ด้วยวิธี AOAC (2000) การวิเคราะห์ปริมาณไขมันใช้เครื่อง 2050 Soxtec Avanti autoextraction unit (Foss Tecator, Sweden) และปริมาณสตาARCHทั้งหมดวิเคราะห์ด้วยวิธี AACC method (2000)

#### 3.4.2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนใน rice bran WUAX ที่สกัดโดยการแยกส่วนด้วยเอทานอลวิเคราะห์ตามวิธี Bradford ซึ่งอธิบายโดย Bollag, Rozycki และ Edelstein (1996) ทำการวิเคราะห์โดยนำ rice bran WUAX ปริมาตร 40 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย Bradford working buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตรในถาดปฏิกิริยาแบบ 96 หลุม (96 well plate) ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์และวางในตู้พลาสติกแบบ Zip-lock ถาดตัวอย่างเขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/Visible spectrophotometer รุ่น Specto - Biochrom Libra S22 ประเทศสหราชอาณาจักร โดยใช้สารละลาย Hanks' balance Salt Solution (HBSS) เป็นตัวอย่างควบคุม (blank) โดยปริมาณโปรตีนจะคำนวณเทียบกับสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

#### 3.4.3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar content)

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดวิเคราะห์ด้วยวิธีการทำปฏิกิริยากับสารประกอบ Phenol-sulfuric acid ตามวิธีวิเคราะห์ของ Dubois, Gilles, Hamilton, Pebers และ Smith (1956) สารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิตร นำมาทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอล (phenol) ความเข้มข้น 4% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (96%) ปริมาตร 2.5 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/Visible spectrophotometer รุ่น Specto - Biochrom Libra S22 ประเทศสหราชอาณาจักร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะคำนวณเทียบกับสารละลายมาตรฐานกลูโคส

### 3.4.4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์วิเคราะห์โดย Somogyi-Nelson's method (Somogyi, 1952) สารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตรทำปฏิกิริยากับ Alkaline copper reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือด 15 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง เติม Nelson reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เติมน้ำ DI 5 มิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/Visible spectrophotometer รุ่น Specto - Biochrom Libra S22 ประเทศสหราชอาณาจักร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะคำนวณเทียบกับสารละลายมาตรฐานน้ำตาล Arabinose ต่อ Xylose เท่ากับ 0.93:1

### 3.4.5. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของรำข้าวและ rice bran WUAX ที่สกัดโดยการแยกส่วนด้วยเอทานอล วิเคราะห์ตามวิธีของ Mattila และคณะ (2005)

#### 3.4.5.1. การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างรำข้าว DSDPB, ADSDPB และ rice bran WUAX ที่สกัดโดยการแยกส่วนด้วยเอทานอล 0.1-0.5 กรัม เติมเมทานอลความเข้มข้น 80% ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ในห้องเย็นปราศจากแสงเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสและเติมเมทานอลความเข้มข้น 80% ปริมาตร 5 มิลลิลิตรอีกครั้ง และนำไปปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสทั้งหมดไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอิสระทั้งหมด (total free phenolic) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และปริมาณกรดฟีนอลิกอิสระ (free phenolic acids) โดย HPLC ส่วนสารประกอบฟีนอลิกยึดเหนี่ยว (bound phenolic compounds) จะสกัดจากส่วนตะกอนที่เหลือ โดยเติมน้ำ DI 3 มิลลิลิตร NaOH ความเข้มข้น 5 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร และ NaOH ความเข้มข้น 10 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าผสมเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างปรับค่า pH เป็น 2 เติมสารละลายเอทิลอะซิเตต 12 มิลลิลิตรและกรอง ทำการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต 3 ครั้ง จากนั้นรวมตัวอย่างที่ได้จากการกรองนำไประเหยแห้ง แล้วละลายในเมทานอลความเข้มข้น 50% 4 มิลลิลิตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย sonicator กรอง และนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอิสระทั้งหมดและปริมาณกรดฟีนอลิกอิสระ



### 3.4.5.2. การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ตามวิธีการของ Singleton, Orthofer, and Lamuela-Raventos (1999) ทำการเจือจางสารละลายสกัดตัวอย่างจากข้อ 4.4.1 ในอัตราส่วน 1:10 ในน้ำกลั่น เติมสารประกอบ Folin-Ciocalteu's phenol เจือจาง ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 5 นาทีในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นทำให้เย็นและนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตรเทียบกับสารมาตรฐานกรดเฟอร์ริก (ferulic acid, FAE) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดแสดงในหน่วยมิลลิกรัมของกรดเฟอร์ริก ต่อ 100 กรัมของตัวอย่างแห้ง

### 3.4.5.3. การวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกโดยเทคนิคด้วยวิธีการทางโครมาโตกราฟีประสิทธิภาพสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)

ระบบ HPLC จากบริษัท Shimadzu Corporation เมืองโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น Japan ประกอบด้วย SPD-M10AVP diode array detector, CTO-10ACVP column oven, DGU-14A degasser, LC-10ADVP solvent delivery module, SIL-10ADVP autoinjector และ SCL-10AVP system controller คอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ Luna 250×4, 6 mm, 5 $\mu$ m C18 column จาก Phenomenex, Torrance, CA ประเทศสหรัฐอเมริกา อุณหภูมิของคอลัมน์ในการวิเคราะห์ตั้งไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส ทำการชะสารตัวอย่างแบบ gradient elution ด้วยอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วยสารละลาย A และสารละลาย B สารละลาย A คือ trifluoroacetic acid (TFA) ความเข้มข้น 0.05% สารละลาย B คือ acetonitrile ความเข้มข้น 95% ที่ผสมกับ 0.05% TFA ตั้งโปรแกรมการชะตัวอย่างดังนี้ isocratic elution 90% A, 0-3 min; linear gradient from 90% A to 87.5% A, 3-15 min; linear gradient from 87.5% A to 82.5% A, 15-25 min; linear gradient from 82.5% A to 70% A, 25-30 min; linear gradient from 70% A to 40% A, 30-36 min; linear gradient from 40% A to 20% A, 36-40 min; linear gradient from 20% A to 65% A, 40-43 min, linear gradient from 65% A to 90% A, 43-53 min; และ post-time, 6 min

ตัวอย่างวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง UV ที่ความยาวคลื่น 3 ระดับ ได้แก่

- 260 นาโนเมตรสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสาร protocatechuic acid, 4-OH-benzoic acid และ vanilic acid

- 270 นาโนเมตรสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสาร *O*-coumaric acid และ gallic acid
- 280 นาโนเมตรสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสาร caffeic acid, *p*-coumaric acid และ ferulic acid

ปริมาณกรดฟีนอลิกแสดงในหน่วยไมโครกรัมของกรดฟีนอลิกแต่ละชนิดต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง

### 3.4.6. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล

ตัวอย่าง WUAX ที่สกัดโดยการแยกส่วนด้วยเอทานอล ปริมาณ 2 มิลลิกรัมละลายใน 10 mM NaNO<sub>3</sub> ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร และกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอนด้วย polytetrafluoroethylene (PTFE) syringe filter น้ำหนักโมเลกุลวิเคราะห์โดยเทคนิค high-performance size exclusion chromatography (HPSEC) ระบบ HPSEC รุ่น Agilent 1200 series ประเทศสหรัฐอเมริกา ประกอบด้วย pump ร่วมกับ online degasser (Dionex DG-1210 ประเทศสหรัฐอเมริกา) และ autosampler (Agilent Technologies G1367C ประเทศสหรัฐอเมริกา) ตัวอย่างถูกชะผ่าน คอลัมน์ GPC 2 คอลัมน์ (Agilent PL Aquagel-OH Mixed-H, pore size, 8µm) และวัดการกระเจิงและการดูดกลืนแสงด้วย multiangle laser-light scattering (HPSEC-MALLS) detector (Wyatt Technologies DAWN HELEOS, Santa Barbara ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งวิเคราะห์ที่ 120 mW solid-state laser 658 nm) ร่วมกับ Dynamic light scattering (DLS) detector (Wyatt Technologies DynaPro NanoStar, USA detection angle-90° ประเทศสหรัฐอเมริกา) และ RI detector (Shodex RI-101 ประเทศญี่ปุ่น) ตัวอย่างวิเคราะห์ที่อุณหภูมิห้อง อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยเฟสเคลื่อนที่คือ โซเดียมไนเตรด (NaNO<sub>3</sub>) ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ซึ่งกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน (VacuCup Supor membrane, Pall life science ประเทศสหรัฐอเมริกา) น้ำหนักโมเลกุลคำนวณโดยโปรแกรม ASTRA software Version 6.0.1 (Wyatt Technologies, California ประเทศสหรัฐอเมริกา)

### 3.4.7. การวิเคราะห์น้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์และ linkage

#### 3.4.7.1. การวิเคราะห์น้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์

วิเคราะห์น้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแลกเปลี่ยนประจุ (High performance anion exchange chromatography, HPAEC) โดยใช้ดีเทคเตอร์แบบ Pulsed amperometric detector (PAD) (Dionex ICS 3000 system) ตามวิธีของ Beaugrand และคณะ (2004)

ตัวอย่าง rice bran WUAX จากการย่อยด้วยเอนไซม์ endoxylanase ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรนำมาย่อยด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ปริมาตร 45 ไมโครลิตร จากนั้นเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำ DI ปริมาตร 15 ไมโครลิตร และกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน ด้วย polytetrafluoroethylene (PTFE) syringe filter ก่อนฉีดเข้าคอลัมน์ ใช้คอลัมน์ CarboPac PA 20 column (150 mm × 3 mm, Dionex, Sunnyvale ประเทศสหรัฐอเมริกา) ควบคุมอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที โดยเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ประกอบด้วยสารละลาย A คือ น้ำ DI และสารละลาย B คือ สารละลายโซเดียมอะซิเตรตเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ ตั้งโปรแกรมการชะตัวอย่างดังนี้ linear gradient from 96% A to 20% A, 0-30 min; isocratic elution 20% A, 30-40 min; linear gradient from 20% A to 96% A, 40-60 min วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Chromelon software version 6.80

### 3.4.7.2. การวิเคราะห์น้ำตาลมอลโทสและโครงสร้างโมเลกุลของอะราบิโนไซแลนด้วยเทคนิค Methylation และ Silylation

#### 3.4.7.2.1. Methylation

ตัวอย่างรำข้าว DADPB, ADSDPB และ ethanol fractionated rice bran WUAX ทำปฏิกิริยา Methylation ตามวิธีของ Asres และ Perreault (1997) จากนั้นปฏิกิริยา acidic methanolysis ถูกเร่งปฏิกิริยาตามวิธีของ Sundberg, Sundberg, Lillandt และ Holmbom (1996) โดยชั่งตัวอย่าง 1-2 มิลลิกรัม เติม acidic methanol ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมและให้ความร้อนในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นถึงอุณหภูมิห้องและเติม pyridine ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และทำให้เป็นกลางด้วยกรดไฮโดรคลอริก เติมสารละลาย Sorbitol 1 มิลลิลิตรเพื่อเป็น internal standard และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการระเหยเพื่อกำจัดส่วนของเหลวภายใต้สุญญากาศในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ตัวอย่างที่เหลือนำไปทำแห้งในโถดูดความชื้นที่เชื่อมต่อกับปั๊มสุญญากาศแรงดันสูงเป็นเวลา 20 นาที

#### 3.4.7.2.2. Silylation

ตัวอย่างถูกทำให้ร้อนตัวใน pyridine ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย BSTFA [N,O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide] ที่ผสม 10% TMCS (trimethylchlorosilane) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง สารละลายตัวอย่างนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำการเจือจางตัวอย่างด้วยการเติม

ethyl acetate ปริมาตร 600 ไมโครลิตร กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน ด้วย polytetrafluoroethylene (PTFE) syringe filter ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography, GC)

ระบบ GC ที่ใช้รุ่น Agilent 6890N โดยใช้ดีเทคเตอร์ รุ่น Agilent 5973 Series mass selective detector (Agilent Technologies, Santa Clara ประเทศสหรัฐอเมริกา) นำตัวอย่างกรองที่ผ่านกระบวนการ Silylation ปริมาตร 1 ไมโครลิตรฉีดลงใน HP-5 column (30 m x 0.25 mm, film thickness, 0.25  $\mu$ m) อุณหภูมิ 260 องศาเซลเซียส split ratio เท่ากับ 1:50 ตั้งโปรแกรมให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้นดังนี้ 100 องศาเซลเซียส 2 นาที ด้วยอัตราเร็ว 4 องศาเซลเซียสต่อนาที จากนั้นเพิ่มเป็น 220 องศาเซลเซียส 2 นาที ด้วยอัตราเร็ว 15 องศาเซลเซียสต่อนาที และเพิ่มถึง 300 องศาเซลเซียส 2 นาที เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือแก๊สฮีเลียมด้วยอัตราการไหลคงที่ที่ 1 มิลลิเมตรต่อนาที ดีเทคเตอร์จะสแกนในช่วง 40 ถึง 600 Da (70 eV) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม MSD Chemstation E.2.01.1177 software จาก Agilent Technologies.

พิกัดจากโครมาโตแกรมที่ได้จะนำมาเทียบกับระยะเวลาที่ (retention time) ของสารมาตรฐาน methylated xylose (2,3,4-linked xylose), methylated xylotriose (terminal xylose and 4-linked xylose), nonmethylated xylose, arabinose (terminal xylose และ terminal arabinose) และ wheat arabinoxylan (2,4-linked and 3,4-linked xylose) ตามวิธีของ Laine, Tamminen, Vikkula, and Vuorinen (2002).

### 3.4.8. การวิเคราะห์คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

#### 3.4.8.1 การวิเคราะห์ Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

Ferric reducing antioxidant power วิเคราะห์ตามวิธีของ Katalinic, Milos, Modun, Music และ Boban (2004) เตรียมสารละลาย FRAP โดยผสมโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 3.6 (acetate buffer) เข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตรกับสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ( $\text{FeCl}_3$ ) เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตรและสารละลาย TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-s-triazin) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยสารละลาย TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-s-triazin) เตรียมจาก TPTZ 31.2 มิลลิกรัมในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 10 มิลลิลิตร

สารละลายตัวอย่างนำมาเจือจางด้วยน้ำ DI ปีเปตปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย FRAP 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตรด้วยเครื่อง

สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Libras22, Biochrom, Ltd., Cambridge, England) เทียบกับสารมาตรฐาน Ferrous(II) sulphate ในช่วงความเข้มข้นที่ 0.20 – 1.00 มิลลิโมลาร์

### 3.4.8.2. การวิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity

DPPH radical scavenging activity วิเคราะห์ตามวิธีการของ Sánchez-Moreno *et al.* (1998) ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย DPPH ที่ละลายในสารละลายเมทิลแอลกอฮอล์ ( $6.34 \times 10^{-5}$  M methanolic DPPH solution) ปริมาตร 3.9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาทีในความมืด วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Libras22, Biochrom, Ltd., Cambridge, England) เทียบกับ blank (DI water) และ control (เมทิลแอลกอฮอล์) รายงานค่าในรูปแบบของค่า IC<sub>50</sub> โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Inhibition DPPH<sup>•</sup> กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง เพื่อหาค่า IC<sub>50</sub> โดยคำนวณ % Inhibition DPPH<sup>•</sup> ตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ Inhibition DPPH}^{\bullet} = \left( \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right) \times 100$$

เมื่อ  $\text{Abs}_{\text{control}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของ Control  
 $\text{Abs}_{\text{sample}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

### 3.4.8.3. การทดสอบทางพิษวิทยาของ WUAX ในการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) โดยวิธีทดสอบ MTT reduction assay

ใช้เซลล์ไลน์ (cell line) HepG2 (hepatocellular carcinoma) จาก American Type Culture Collection (ATCC, USA) นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่เสริมด้วย Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, NY, USA), 10% 2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid (HEPES) 1.5% streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ penicillin (Invitrogen, CA, USA) 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5% ในการทดลองใช้เซลล์ไลน์ที่แพสเสส (passage) ไม่เกิน 20

ทดสอบความเป็นพิษของ WUAX ทั้ง 3 ส่วนต่อเซลล์ HepG2 ด้วยวิธี MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ตามวิธีการของ Mosmann (1983) นำเซลล์ HepG2 มาเลี้ยงใน 96-well plate โดยให้มีปริมาณเซลล์ในแต่ละหลุมเป็น  $3.0 \times 10^4$

เซลล์ต่อหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบกับสารสกัดจาก WUAX ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดออก แล้วเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม บ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลายฟลูออโรมาซานที่ เกิดขึ้นด้วยสารละลาย DMSO ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่า 96-well plate เบาๆ นาน 10 นาทีก่อน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Benchmark Plus, Bio-Rad, Japan) ผลการทดลองแสดงเป็นร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิต (% cell viability) โดยพล็อตกราฟร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิตกับความเข้มข้นของตัวอย่าง และคำนวณค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์ที่มีชีวิตได้ 50% ( $IC_{50}$ ) จากสมการถดถอยแบบไม่เป็นเส้นตรง (nonlinear regression) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยทำการทดสอบแต่ละทริตเมนต์อย่างน้อย 4 ครั้ง ครั้งละ 2 ซ้ำ

#### 3.4.8.4. การต้านออกซิเดชันภายในเซลล์ (Cellular Antioxidant Activity (CAA) assay)

ศึกษาฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันภายในเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ด้วยสาร 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) โดยดัดแปลงวิธีการของ Girard-Lalancette, Pichette, and Legault (2009) โดยนำเซลล์ HepG2 มาเลี้ยงใน black wall clear bottom 96 well plate (Corning Incorporated, New York, USA) ให้มีปริมาณเซลล์ในแต่ละหลุมเป็น  $2.5 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดออกและเติมสารสกัด WUAX จากร้าข้าวที่ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และล้างด้วย PBS ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย DCFH-DA ความเข้มข้น 20 ไมโครโมล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม และบ่มเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วย PBS ปริมาตร 150 ไมโครลิตร 2 ครั้ง หลังจากนั้นเติมสารละลาย *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH) ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่ละลายใน Hank's balance salt solution (HBSS) เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิด ROS วัดปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์ ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectra MAX Gemini EM, Molecular devices, California) ที่ excited wavelength 485 nm และ emitting wavelength 535 nm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยวัดค่าทุก 30 นาทีเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ผลการศึกษาแสดงเป็นค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ DCF-fluorescence intensity $\pm$ SD โดยทำการทดสอบแต่ละสิ่งทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

### 3.5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลและความแปรปรวน โดย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range tests (DMRT) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ (SPSS) program for Windows Version 17



## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและการอภิปรายผล

#### 4.1. การสกัดอะราบิโนไซแลนที่ไม่ละลายน้ำจากรำข้าว (rice bran water unextractable arabinoxylans)

การทดลองนี้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเติมเอนไซม์ในการสกัดอะราบิโนไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ (water unextractable arabinoxylans, WUAX) ตารางที่ 3.1 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของ rice bran WUAX ที่กำจัดสารพิษและโปรตีนแล้ว (DSDPB) โดยศึกษาปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์แตกต่างกันที่ 1.0, 2.0 and 5.0 Unit ของเอนไซม์ endoxylanase และระยะเวลาการย่อยที่ 0.5, 2.5, 7.5 และ 17.5 ชั่วโมง โดยอัตราส่วนของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แสดงถึงขนาดโดยเฉลี่ยของตัวอย่างที่ผ่านการย่อย (hydrolysate)

จากตารางที่ 3.1 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่เปลี่ยนแปลงในช่วงระยะเวลาในการย่อยถึง 2.5 ชั่วโมงจากการคำนวณอัตราส่วนของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณเพิ่มปริมาณเอนไซม์ และระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้นถึง 2.5 ชั่วโมงและลดลงเมื่อระยะเวลาในการย่อยนานขึ้น แสดงให้เห็นถึงขนาดโดยเฉลี่ยของตัวอย่างที่ผ่านการย่อยที่มีขนาดใหญ่ขึ้นในช่วงแรกของการย่อย แสดงให้เห็นว่าในการย่อย DSDPB ด้วยเอนไซม์ endoxylanase จะปลดปล่อยสายยาวของ WUAX ในช่วงแรกของการย่อย จากนั้นโมเลกุลจะถูกย่อยให้มีขนาดเล็กลงเมื่อระยะเวลาในการย่อยนานขึ้น Maes, Vangeneugden และ Delcour (2004) อธิบายว่า การย่อย WUAX ด้วยเอนไซม์ *Bacillus subtilis* endoxylanase จะประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกช่วงการละลายของ WUAX และหลังจากนั้นจะเป็นการย่อยของ WUAX ที่ละลาย ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน

อะราบิโนไซแลนจากรำข้าวเป็นพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างแบบกิ่งก้านมากมายและมีสายโซ่ข้าง (side chain) ที่ซับซ้อน (Shibuya and Iwasaki, 1985) Schooneveld-Bergmans, Beldma, and Voragen, (1999) พบว่า การมีสายโซ่ข้างแทนที่จำนวนมากในอะราบิโนไซแลนทำให้โครงสร้างของอะราบิโนไซแลนทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ จากการย่อย DSDPB โดยใช้เอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้น 5 ยูนิต พบว่า การย่อยอะราบิโนไซแลนเกิดขึ้นน้อย ดังแสดงในค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดต่ำหลังการย่อย ดังนั้น ในการทดลองต่อมาจึงทำการทดลองเบื้องต้นถึงกระบวนการก่อนการย่อยของ DSDPB โดยการให้ความร้อน DSDPB ความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก (w/v) ภายใต้อุณหภูมิ



ตารางที่ 3.1 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวิซ์หลังการบ่มด้วยเอนไซม์ endoxylanase ของตัวอย่าง rice bran WUAX ที่กำจัด  
สตาร์ชและโปรตีนแล้ว

ระยะเวลา	0.5			2.5			7.5			17.5		
การย่อย (ช.ม.)												
ความ เข้มข้น ของ เอนไซม์	1 U	2 U	5 U	1 U	2 U	5 U	1 U	2 U	5 U	1 U	2 U	5 U
TS (%)	0.23±0.03	0.38±0.05	0.60±0.05	0.44±0.06	0.54±0.06	1.42±0.06	0.58±0.19	0.76±0.03	1.86±0.26	0.67±0.16	1.24±0.1	2.61±0.34
RS (%)	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.05±0.01	0.07±0.02	0.04±0.0	0.07±0.01	0.1±0.01	0.15±0.02	0.18±0.02	0.23±0.0
TS/RS	5.62	11.75	15.11	10.41	12.73	19.74	13.52	10.5	17.13	4.50	7.0	11.40

หมายเหตุ TS คือ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด; RS คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์; U คือ ยูนิต

ค้นด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ endoxylanase 2 ยูนิตต่อกรัม เป็นเวลา 30 นาที พบว่า กระบวนการนี้สามารถที่จะเพิ่มปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลไซโลส ปริมาณน้ำตาลอะราบิโนส และปริมาณน้ำตาลกลูโคส ซึ่งสามารถคำนวณเป็นปริมาณอะราบิโนสที่เพิ่มขึ้น 2.5 เท่า (ตารางที่ 3.2) ดังนั้น ความเข้มข้นของเอนไซม์ ระยะเวลาในการให้ความร้อนภายใต้แรงดัน และระยะเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ จึงปัจจัยที่มีผลในการสกัด WUAX

**ตารางที่ 3.2** องค์ประกอบทางเคมีของ WUAX จากการย่อยด้วยเอนไซม์เปรียบเทียบกับการให้ความร้อนภายใต้แรงดันรวมกับการย่อยด้วยเอนไซม์ใน DSDPB

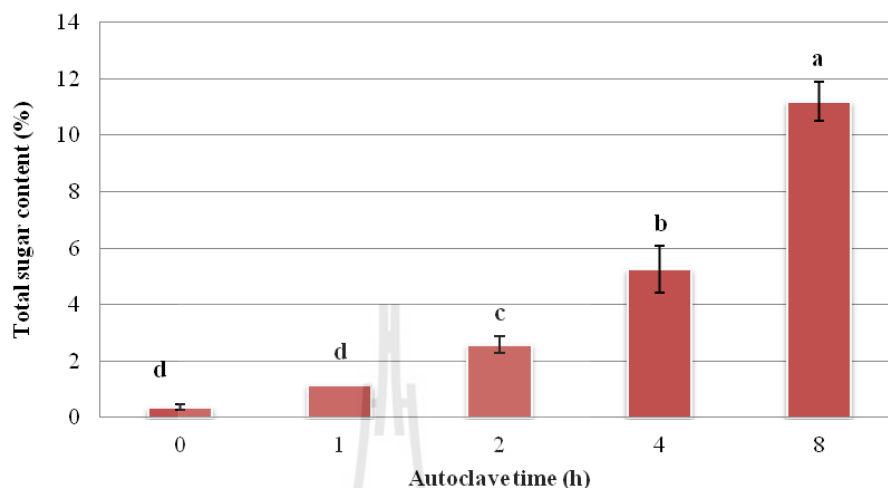
Sugar (%)	Enzyme concentration (Unit/g)/ autoclave time (h)/ incubation time (h)	
	2U/0h/0.5 h <sup>a</sup>	2U/1h/0.5 h <sup>b</sup>
Total sugar	0.42 ± 0.04	1.0 ± 0.02
Reducing sugar	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.0
Xyl	0.03 ± 0.0	0.14 ± 0.0
Ara	0.19 ± 0.0	0.38 ± 0.02
Glu	ND	0.11 ± 0.0
AX	0.19	0.46
Ara/Xyl	6.33	2.71
TS/RS	10.5	7.13

หมายเหตุ AX, arabinoxylan = 0.88 x (%arabinose + %xylose); Ara/Xyl, arabinose to xylose ratio;

Glu, glucose; TS, total sugar; RS, reducing sugar; TS/RS, total sugar to reducing sugar ratio.

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด WUAX ให้ได้ปริมาณผลผลิตสูงสุด โดยการให้ความร้อนภายใต้แรงดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 1, 2 4 และ 8 ชั่วโมง ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์ *Bacillus subtilis* endoxylanase 2 ยูนิตต่อกรัม เป็นเวลา 30 นาที ผลของระยะเวลาในการให้ความร้อนภายใต้แรงดันต่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมด แสดงในภาพที่ 3.1 พบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก 1.14 เป็น 11.2% เมื่อระยะเวลาการให้ความร้อนเพิ่มขึ้นจาก 1 ถึง 8 ชั่วโมง จากผลการทดลองนี้ ทำให้สามารถเลือกสภาวะการให้ความร้อนภายใต้แรงดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดเพื่อให้ได้ความ

ขาวของสายน้ำตาลที่หลากหลาย และนำไปใช้ในการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยที่เหมาะสมในการสกัด WUAX ขึ้นต่อไป



รูปที่ 3.1

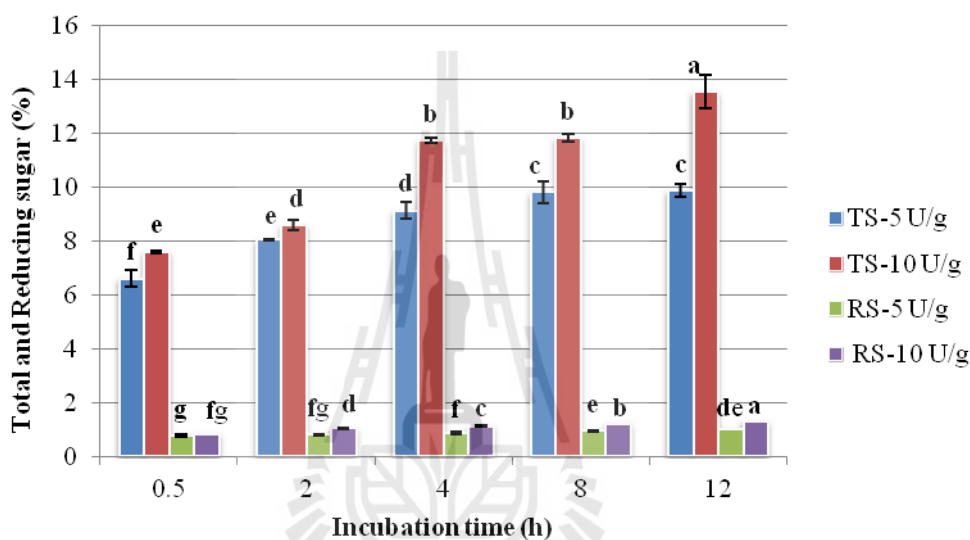
ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดหลังการให้ความร้อนภายใต้แรงดันที่ระยะเวลา 1 ถึง 8 ชั่วโมงรวมกับการย่อยด้วยเอนไซม์ endoxylanase 2 Unit เป็นเวลา 30 นาที

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b, c, d ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เวลาในการให้ความร้อนภายใต้แรงดันที่ต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ในการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ระดับ 5 และ 10 ยูนิตต่อกรัม และระยะเวลาการย่อยจาก 0.5 ถึง 12 ชั่วโมงหลังการให้ความร้อนภายใต้แรงดันเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในการสกัด WUAX แสดงผลดังรูปที่ 3.2 พบว่า ปริมาณเอนไซม์ที่ระดับ 10 ยูนิตต่อกรัมให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังการย่อยมากกว่าการใช้เอนไซม์ที่ระดับ 5 ยูนิตต่อกรัมในทุกช่วงระยะเวลาการย่อย เมื่อเปรียบเทียบถึงระยะเวลาในการย่อย ในช่วง 4 ชั่วโมงแรก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การย่อยจาก 4 ถึง 8 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดคงที่และถูกย่อยเพิ่มขึ้นในช่วงระยะเวลา 8 ถึง 12 ชั่วโมง สำหรับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และไม่เปลี่ยนแปลงในช่วงของการย่อย 4 ชั่วโมงแรก แต่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังการย่อย 4 ชั่วโมง

จากผลการทดลองในช่วงแรก (ตารางที่ 3.1) พบว่า ขนาดโดยเฉลี่ยของตัวอย่างที่ผ่านการย่อยจะมีขนาดเล็กลงเมื่อระยะเวลาการย่อยนานกว่า 7.5 ชั่วโมง Beaugrand และคณะ (2004) และ Leguart และคณะ (1999) รายงานว่า การย่อยด้วยเอนไซม์ endoxylanase GHF 11 could สามารถที่

จะย่อยWUAX ให้เป็น โมเลกุลขนาดเล็กของ xylooligosaccharides ส่วน Maes และคณะ (2004) พบว่า การย่อยรำข้าวสาลี (wheat bran) ด้วยเอนไซม์ endoxylanase GHF 11 ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำ จะปลดปล่อยอะราบิโนไซแลนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ในการศึกษานี้ต้องการสกัดอะราบิโนไซแลนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ดังนั้น วิธีการที่เหมาะสมในการสกัดอะราบิโนไซแลนสามารถทำได้โดยการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชออกจากรำข้าว ตามด้วยการให้ความร้อนภายใต้แรงดันเป็นเวลา 4 ชั่วโมงและย่อยด้วยเอนไซม์ endoxylanase 5 ยูนิต เป็นเวลา 4 ชั่วโมง



รูปที่ 3.2

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้รับจากการย่อย autoclaved-destarched, deproteinised bran (ADSDPB) ด้วย endoxylanase 5 และ 10 ยูนิต เป็นเวลา 0.5 ถึง 12 ชั่วโมง

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b, c, d, e, f, g ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ระยะเวลาการย่อยที่ต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### 4.2. องค์ประกอบทางเคมี สมบัติทางเคมีและกายภาพของรำข้าวและอะราบิโนไซแลนจากรำข้าว

##### 3.2.1. องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวและอะราบิโนไซแลนจากรำข้าว

ปริมาณผลผลิต ปริมาณน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ชนิดต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของอะราบิโนไซแลนและปริมาณโปรตีนของรำข้าวสกัดไขมัน (rice bran), รำข้าวที่สกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้ว (DSDPB) และรำข้าวที่สกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชและผ่านการสกัดร่วมด้วยการใช้ความร้อนภายใต้แรงดัน (ADSDPB) แสดงในตารางที่ 3.3 จากผลการ

ทดลองพบว่า ผลผลิตของ DSDPB ลดลงเหลือ 26% เมื่อรำข้าวผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ช และผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ endoxylanase ส่วนกระบวนการที่ใช้ความร้อนภายใต้แรงดันร่วมด้วยในการสกัดนั้น (ADSDPB) ให้ผลผลิตลดลงถึง 20.9% นอกจากนี้ ADSDPB สามารถผลิต WEAX ได้ 2.52% ซึ่งสามารถแยกได้เป็น F60, F6090 และ F90 ในปริมาณ 9.5, 17.9 และ 72.6% ตามลำดับ

รำข้าวสกัดไขมันมีองค์ประกอบของน้ำตาลกลูโคสสูง (70.68 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง) เมื่อเทียบกับน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ชนิดอื่น สำหรับ DSDPB และ ADSDPB พบว่า มีองค์ประกอบของอะราบินโนส (arabinose) ไซโลส (xylose) กาแลคโตส (galactose) แรมโนส (rhamnose) แมนโนส (mannose) แต่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลง โดยที่ ADSDPB มีองค์ประกอบของกรดกลูคูโรนิก (Glucuronic acid) และปริมาณอะราบินโนสไฮแลนสูงกว่า DSDPB แสดงให้เห็นว่า การสกัดอะราบินโนสไฮแลนด้วยวิธีการย่อยรำข้าวด้วยเอนไซม์ร่วมกับการให้ความร้อนภายใต้แรงดันเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สามารถสกัดอะราบินโนสไฮแลนได้ในปริมาณสูง

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณองค์ประกอบของน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ใน DSDPB และ ADSDPB พบว่า ADSDPB มีปริมาณน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์สูงกว่า DSDPB โดยเฉพาะอย่างยิ่งอะราบินโนสและน้ำตาลไซโลส ซึ่งสามารถคำนวณเป็นปริมาณอะราบินโนสไฮแลนได้สูงถึง 218.66 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่า การให้ความร้อนภายใต้แรงดันเป็นวิธีการที่สามารถจะทำลายโครงสร้างผนังเซลล์ของรำข้าวและเปิดโครงสร้างที่ซับซ้อนให้เอื้ออำนวยต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งโดยทั่วไปการให้ความร้อนสามารถที่จะทำให้เกิดการเสียดสภาพโครงสร้างดั้งเดิมของไซแลน (xylan) จากลิกโนเซลลูโลส (lignocelluloses) ซึ่งมีโครงสร้างที่แข็งแกร่งและไม่ละลายน้ำไปเป็นคาร์โบไฮเดรตที่สามารถละลายน้ำได้ มีหลากหลายงานวิจัยเกี่ยวกับการกระบวนการให้ความร้อนต่อการสกัดคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน เช่น Vegas, Alonso, Dominguez และ Parajo (2004) และ Parajo, Garrote, Cruz และ Dominguez (2004) ทำการศึกษาที่อุณหภูมิตั้งแต่ 40 ถึง 225 องศาเซลเซียส พบว่า สามารถสกัด xylooligosaccharides จากเปลือกข้าว (rice hulls) ได้เป็นอย่างดี Rose และ Inglett (2010) พบว่า กระบวนการให้ความร้อน 2 ขั้นตอน สามารถใช้ในการผลิต feruloylated arabinoxylooligosaccharides จากข้าวสาลีได้ นอกจาก xylooligosaccharides การให้ความร้อนขึ้นหรือการใช้ไอน้ำสกัดสามารถที่จะสกัดเอาสารประกอบอื่นๆ ออกมาด้วย ได้แก่ น้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ กรดอะซิติก ลิกนินที่ละลายในกรด (acid-soluble lignin) สารประกอบเฟอฟูรัล (furfural) สารประกอบอนินทรีย์ที่ละลายได้ (soluble inorganic components) และอนุพันธ์ของสารโปรตีน (Moure และคณะ 2006) นอกจากนี้ ในการผลิต xylooligosaccharides จากเปลือกออลมอนต์ โดยการย่อย autohydrolysis พบ สารประกอบ น้ำตาลไซโลส, อะราบินโนส, กลูโคส, hydroxymethylfurfural, Klason-type lignin และ non-identified products (Nabarlatz,

Farriol, and Montane, 2005) การกระจายตัวของ arabinose side chains บนสายหลัก xylan ก่อให้เกิดลักษณะการวางตัวของโครงสร้างอะราบินโนไซแลนที่ต่างกัน ทำให้เกิดสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกันออกไป (Izydorczyk และ Biliaderi, 1995; Zhang, Li, Smith, และ Musa, 2015) ในการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการให้ความร้อนภายใต้แรงดันสามารถทำลายพันธะไฮโดรเจนของลิกโนเซลลูโลสที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบหลัก โดยสายโซ่หลักของเฮมิเซลลูโลสจะถูกทำลายโดยการย่อยและเกิดการแลกเปลี่ยนประจุ  $H^+$  (hydrogen ions) ซึ่งเกิดจากแตกตัวเป็นไอออนด้วยตัวเองของน้ำ (water autoionization) และเกิดการสร้างสารประกอบกรดอินทรีย์ (organic acids) ดังจะเห็นได้จากค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลงจาก  $6.32 \pm 0.2$  เป็น  $4.74 \pm 0.1$  หลังกระบวนการให้ความร้อนภายใต้แรงดันและเกิดผลิตภัณฑ์ที่สามารถละลายน้ำได้ซึ่งโดยส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) น้ำตาลมอโนแซคคาไรด์ (monosaccharides), acetic acid (Moure, Gullon, Dominguez, and Parajo, 2006)

**ตารางที่ 3.3** องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวสกัดไขมัน (rice bran), รำข้าวที่สกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้ว (DSDPB) และรำข้าวที่สกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้วและผ่านการสกัดร่วมด้วยการใช้ความร้อนภายใต้แรงดัน (ADSDPB)

Compositions (mg/g)	Rice bran	DSDPB	ADSDPB
Ara	$13.56 \pm 0.60$	$39.40 \pm 2.18$	$94.69 \pm 0.51$
Xyl	$14.72 \pm 0.66$	$52.11 \pm 3.65$	$153.79 \pm 0.71$
Glu	$70.68 \pm 1.90$	$3.02 \pm 0.07$	$18.00 \pm 1.32$
Gal	$2.67 \pm 0.09$	$6.45 \pm 0.65$	$32.49 \pm 1.55$
Rham	ND	$4.21 \pm 0.94$	$4.73 \pm 0.18$
Man	$0.60 \pm 0.06$	$1.41 \pm 0.11$	$12.69 \pm 0.50$
Glucuronic acid	ND	ND	$10.59 \pm 0.90$
Galacturonic acid	$2.55 \pm 0.07$	$0.82 \pm 0.06$	$6.31 \pm 0.77$
Protein	$179.1 \pm 10.0$	$140.0 \pm 10.0$	$140.0 \pm 10.0$
AX	24.89	80.52	218.66
Ara/Xyl	0.9	0.8	0.6
Yield (%)	100	$26.0 \pm 0.4$	$20.9 \pm 0.3$

หมายเหตุ Ara, arabinose; Xyl, xylose; Glu, glucose; Gal, galactose; Rhamnose; Man, mannose, AX: arabinoxylan =  $0.88 \times (\% \text{ Xyl} + \% \text{ Ara})$ ; Ara/Xyl: arabinose to xylose ratio; DSDPB, destarched, deproteinised rice bran; ADSDPB, autoclaved destarched, deproteinised rice bran

นอกจากนี้ การทดลองยังพบว่าน้ำตาลกลูโคสมีค่าเพิ่มขึ้นหลังการให้ความร้อนภายใต้แรงดันจาก 3.02 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง เป็น 18.00 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง ซึ่งอาจเกิดจากการย่อยเฮมิเซลลูโลส อย่างไรก็ตาม น้ำตาลกาแลคโตส แรมโนส แมนโนส กรดคลอโรโรนิกและกรดกาแลคโตโรนิก พบในปริมาณต่ำ เนื่องจากโมเลกุลเหล่านี้เป็นโมเลกุลที่มาเชื่อมต่อกับสายโซ่หลักของน้ำตาลไซโลส (Shibuya และ Iwasaki, 1985; Rao และ Muralikrishna, 2007) อัตราส่วนของอะราบินออสต่อไซโลส (Ara/Xyl) มีค่าลดลง แสดงให้เห็นว่าสายโซ่ไซแลนบางส่วนอาจถูกทำลายโดยอุณหภูมิและความดันที่สูงด้วยกระบวนการนี้

#### 4.2.2. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

##### 4.2.2.1 สารประกอบฟีนอลิกอิสระทั้งหมดและสารประกอบฟีนอลิกยึดเหนี่ยวทั้งหมด (Total free and bound phenolic content)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอิสระทั้งหมดและสารประกอบฟีนอลิกยึดเหนี่ยวทั้งหมดของรำข้าวสากัดไขมัน (rice bran), รำข้าวที่สากัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้ว (DSDPB) และรำข้าวที่สากัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้วและผ่านการสักร่วมด้วยการให้ความร้อนภายใต้แรงดัน (ADSDPB) แสดงในตารางที่ 3.4 พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกยึดเหนี่ยวทั้งหมดสูงกว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอิสระทั้งหมดในทุกตัวอย่าง ตัวอย่างรำข้าวที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ช (DSDPB) พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอิสระทั้งหมดลดลงจาก 490.6 เป็น 48.9 มิลลิกรัม FAE ต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ในขณะที่การให้ความร้อนภายใต้แรงดันทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอิสระทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก 48.9 เป็น 282.0 มิลลิกรัม FAE ต่อ 100 กรัมตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกยึดเหนี่ยวทั้งหมดของ DSDPB และ ADSDPB เพิ่มขึ้นในปริมาณสูงเมื่อเทียบกับตัวอย่างรำข้าวสากัดไขมันเริ่มต้น แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างที่สากัดได้อาจมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งจะทำให้การทดสอบในการทดลองขั้นถัดไป

ตัวอย่างรำข้าวที่สากัดได้จากการวิจัยนี้ พบว่า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงเช่นเดียวกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในรำข้าวจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่มีปริมาณ 297 มิลลิกรัม FAE ต่อ 100 กรัม (Sunan Butsat และ Sirithon Siriamornpun, 2010) รายงานวิจัย

ต่างประเทศ เช่น การรายงานของ Jung, Kim, Hwang และ Ha (2007) รายงานว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในรำข้าวสกัดไขมันมีปริมาณ 27.86 มิลลิกรัม FAE ต่อ 100 กรัม Goffman และ Bergman (2004) พบว่า light-brown rice bran ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดต่ำกว่า red rice bran 10 เท่า Zhang, Zhang, Zhang, และ Liu (2010) รายงานว่า ค่าเฉลี่ยของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอิสระ สารประกอบฟีนอลิกยึดเหนี่ยว และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของ black rice bran มีปริมาณสูงกว่า white rice bran ในขณะที่ Iqbal, Bhangar และ Anwar (2005) รายงานว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของรำข้าวจากข้าวแตกต่างสายพันธุ์จะพบในช่วง 251 ถึง 359 มิลลิกรัม FAE ต่อ 100 กรัม

**ตารางที่ 3.4** ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอิสระทั้งหมดและสารประกอบฟีนอลิกยึดเหนี่ยวทั้งหมดของรำข้าวสกัดไขมัน (rice bran), รำข้าวที่สกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้ว (DSDPB) และรำข้าวที่สกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้วและผ่านการสกัดร่วมด้วยการใช้ความร้อนภายใต้แรงดัน (ADSDPB)

Samples	Total free phenolic (mg FAE <sup>a</sup> /100g)	Total bound phenolic (mg FAE <sup>a</sup> /100g)
Rice bran	490.6 ± 40.2	830.9 ± 70.3
DSDPB	48.9 ± 0.2	2,599.2 ± 438.9
ADSDPB	282.0 ± 29.2	1,692.5 ± 239.2

หมายเหตุ FAE, ferulic acid equivalent. DSDPB, destarched, deproteinised bran; ADSDPB, autoclaved destarched, deproteinised bran

#### 4.2.2.2. องค์ประกอบและปริมาณกรดฟีนอลิกอิสระและกรดฟีนอลิกยึดเหนี่ยวทั้งหมด (Free and bound phenolic acids content)

องค์ประกอบของกรดฟีนอลิกอิสระ (free phenolic acid) และกรดฟีนอลิกยึดเหนี่ยวทั้งหมด (bound phenolic acid) ของรำข้าวสกัดไขมัน (rice bran), รำข้าวที่สกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้ว (DSDPB) และรำข้าวที่สกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้วและผ่านการสกัดร่วมด้วยการใช้ความร้อนภายใต้แรงดัน (ADSDPB) แสดงในตารางที่ 3.5 และ 3.6 พบว่า rice bran, DSDPB และ ADSDPB ประกอบด้วยกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิก



(Hydroxycinnamic Acid) ได้แก่ กรดแคฟเฟอิก (caffeic acid), กรดเฟอร์ริก (ferulic acid) และกรดคูมาริก (coumaric acids) และกลุ่มกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (hydroxybenzoic acids) ได้แก่ กรดแกลลิก (gallic acid), กรดวานิลลิก (vanilic acid), กรดโพรโตแคเทอชอิก (protocatechuic acid) และ กรด 4-ไฮดรอกซีเบนโซอิก (4-hydroxybenzoic acids)

**ตารางที่ 3.5** องค์ประกอบของกรดฟีนอลิกอิสระ (free phenolic acid) ของรำข้าวสกัดไขมัน (rice bran), รำข้าวที่สกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้ว (DSDPB) และรำข้าวที่สกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้วและผ่านการสกัดร่วมด้วยการใช้ความร้อนภายใต้แรงดัน (ADSDPB)

<b>Free phenolic acids</b> ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>a</sup>	<b>Rice bran</b>	<b>DSDPB</b>	<b>ADSDPB</b>
Gallic acid	ND	ND	37.7 $\pm$ 2.9
Protocatechuic acid	ND	ND	2.7 $\pm$ 0.3
4-OH-Benzoic acid	58.7 $\pm$ 7.8	0.4 $\pm$ 0.0	13.2 $\pm$ 2.1
Vanilic acid	66.0 $\pm$ 1.0	ND	3.7 $\pm$ 0.6
Caffeic acid	89.4 $\pm$ 9.0	ND	34.1 $\pm$ 2.7
<i>p</i> -Coumaric acid	275.7 $\pm$ 2.1	81.1 $\pm$ 2.0	879.1 $\pm$ 56.6
<i>o</i> -Coumaric acid	ND	ND	ND
Ferulic acid	225.1 $\pm$ 8.7	38.0 $\pm$ 3.7	650.1 $\pm$ 6.1

**ตารางที่ 3.6** องค์ประกอบของกรดฟีนอลิกยึดเหนี่ยว (bound phenolic acid) ของรำข้าวสกัดไขมัน (rice bran), รำข้าวที่สกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้ว (DSDPB) และรำข้าวที่สกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้วและผ่านการสกัดร่วมด้วยการใช้ความร้อนภายใต้แรงดัน (ADSDPB)

<b>Bound phenolic acids</b> ( $\mu\text{g/g}$ )	<b>Rice bran</b>	<b>DSDPB</b>	<b>ADSDPB</b>
Gallic acid	ND	$5.4 \pm 1.8$	$14.2 \pm 4.9$
4-OH-Benzoic acid	$69.0 \pm 11.4$	$213.2 \pm 19.0$	$218.7 \pm 23.1$
Vanilic acid	$131.4 \pm 0.8$	$492.5 \pm 43.7$	$589.2 \pm 21.2$
Caffeic acid	$24.7 \pm 3.3$	$197.2 \pm 53.9$	$151.5 \pm 22.2$
<i>p</i> -Coumaric acid	$3,418 \pm 28.8$	$16,052 \pm 2,244$	$19,733 \pm 813.3$
<i>o</i> -Coumaric acid	ND	ND	ND
Ferulic acid	$9,139 \pm 380.2$	$24,020 \pm 3054.5$	$44,816 \pm 1,865$

นอกจากนี้ พบว่า กรดฟีนอลิกยึดเหนี่ยว มีปริมาณสูงกว่ากรดฟีนอลิกอิสระในทุกตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณที่วิเคราะห์ข้างต้น (ตารางที่ 3.4) และพบว่า กรด *p*-Coumaric acid และกรด ferulic เป็นองค์ประกอบหลักของกรดฟีนอลิกอิสระ (ตารางที่ 3.5) ส่วน กรด caffeic, vanilic และ 4-OH-benzoic พบในปริมาณต่ำ ผลการทดลองที่ได้ตรงกับผลของ Sunan Butsat และ Sirithon Siriamornpun (2010) และ Jung, Kim, Hwang และ Ha (2007) สำหรับองค์ประกอบของกรดฟีนอลิกยึดเหนี่ยว พบว่า มีกรด ferulic เป็นองค์ประกอบหลัก รองลงมาคือ กรด *p*-coumaric, กรด Vanilic, กรด 4-OH-Benzoic กรด Caffeic และกรด Gallic ตามลำดับ การสกัดแบบใช้ความร้อนภายใต้แรงดันร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์ สามารถเพิ่มปริมาณ bound ferulic acid จาก 24,020 เป็น 44,816 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง และ *p*-coumaric acid จาก 16,052 เป็น 19,733 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง (ตารางที่ 3.6) แสดงให้เห็นว่า การสกัดแบบใช้ความร้อนภายใต้แรงดันมีความสามารถในการทำลาย rice bran hemicelluloses และปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกทั้งในรูปกรดฟีนอลิกอิสระและกรดฟีนอลิกยึดเหนี่ยวได้มาก จากผลการวิจัยนี้ เห็นได้ว่า รำข้าวมีกรด ferulic ที่อยู่ในรูปกรดฟีนอลิกยึดเหนี่ยวในปริมาณสูงสุด (9,139 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง) ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับ Zhao และ Moghadasian (2008) ที่รายงานถึง ส่วนผนังเซลล์และเอนโดสเปิร์มของข้าวจะประกอบไปด้วยกรด ferulic ประมาณ 9,100 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง

#### 4.2.2.3. โครงสร้างของอะราบินโนไซแลน

การศึกษาโครงสร้างของอะราบินโนไซแลนในรำข้าวสกัดไขมัน (rice bran), รำข้าวที่สกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้ว (DSDPB) และรำข้าวที่สกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้วและผ่านการสกัดร่วมด้วยการใช้ความร้อนภายใต้แรงดัน (ADSDPB) โดยปฏิกิริยา methylation แสดงสัดส่วนจำนวนโมลการแทนที่ (% molar ratio) ดังในตารางที่ 3.7 ซึ่งขึ้นกับ retention time และ mass spectral patterns จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gas chromatography จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบพบว่า สายโซ่หลักของไซแลนของ rice bran WUAX ประกอบไปด้วยน้ำตาลไซโลสที่ถูกแทนที่ที่ตำแหน่งต่างๆ โดยพบ arabinofuranosyl residues จำนวนมากซึ่งแทนที่ในสายโซ่หลักของไซแลนที่ตำแหน่ง C-(O)-3 ด้วยพันธะ 3, 4-linked Xyl และที่ตำแหน่ง C-(O)-2 ด้วยพันธะ 2, 4-linked Xyl และพบ arabinofuranosyl ที่ไปแทนที่ทั้งที่ตำแหน่ง C-(O)-2 และ C-(O)-3 (disubstituted Xylp; dXylp) ด้วยพันธะ 2,3,4-linked Xyl บนหน่วยย่อยน้ำตาลไซโลส (xylopyranosyl unit)

ตารางที่ 3.7 แสดงให้เห็นว่า โครงสร้างหลักของอะราบินโนไซแลนในรำข้าวสกัดไขมัน คือน้ำตาลไซโลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$  (1, 4) โดยมีน้ำตาลอะราบินโนสมาจับเป็นกิ่งก้านของสาย

**ตารางที่ 3.7** พันธะที่พบในอะราบินโนไซแลนที่ได้จากปฏิกิริยา methylation ในรำข้าวสกัดไขมัน (rice bran), รำข้าวที่สกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้ว (DSDPB) และรำข้าวที่สกัดไขมันที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและสตาร์ชแล้วและผ่านการสกัดร่วมด้วยการใช้ความร้อนภายใต้แรงดัน (ADSDPB)

Linkages (% molar ratio)	Rice bran	DSDPB	ADSDPB
T- linked Xyl	2.77 $\pm$ 0.2	6.55 $\pm$ 0.7	5.89 $\pm$ 0.2
T- linked Ara	38.21 $\pm$ 0.2	66.64 $\pm$ 3.4	19.90 $\pm$ 1.6
4-linked Xyl	4.21 $\pm$ 0.02	ND	14.87 $\pm$ 1.2
2,4- linked Xyl	14.10 $\pm$ 0.8	14.44 $\pm$ 0.7	5.77 $\pm$ 0.6
3,4- linked Xyl	37.78 $\pm$ 2.1	ND	44.54 $\pm$ 2.6
2,3,4- linked Xyl	2.94 $\pm$ 0.03	12.36 $\pm$ 0.1	9.03 $\pm$ 0.02

หมายเหตุ T- linked Xyl, terminal nonreducing end xylose; T- linked Ara , terminal nonreducing end arabinose. ND, not detected.

หลักไซแลนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1, 3-linked ( $\alpha$ -1, 3-linked arabinose residues) ปริมาณ 37.78% นอกจากนั้นยังมีน้ำตาลอะราบินโนสที่มาแทนที่ที่ตำแหน่ง C-(O)-3 หรือ C-(O)-2 ด้วยพันธะ  $\alpha$ -1, 2-linkage ปริมาณ 14.10% occurred และน้ำตาลอะราบินโนสที่มาแทนที่ที่ตำแหน่ง C-(O)-3 และ C-(O)-2 บนน้ำตาลไซโลสอีก 2.94% สำหรับ ADSDPB พบว่า โครงสร้างหลักของอะราบินโนไซแลนประกอบไปด้วย  $\alpha$ -1, 3-linked arabinose residues 44.54% ตามด้วย disubstituted xylose 9.03% และ  $\alpha$ -1, 2-linked arabinose residues 5.77% ตามลำดับ

จากตารางที่ 3.7 ปริมาณ T- linked Ara พบในปริมาณ 19.90-66.64% molar ratio ซึ่ง T-linked Ara หมายถึง non-reducing ends ของ arabinose แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของอะราบินโนไซแลนเป็นน้ำตาลที่มีกิ่งก้านสาขามาก ซึ่งพบเช่นเดียวกับของอะราบินโนไซแลนในข้าวและมอลต์ (Rao และ Muralikrishna, 2007) Shibuya และ Iwasaki (1985) รายงานว่า ปฏิบัติการ methylation analysis ของ rice bran hemicellulose จะทำให้สายโซ่ข้างโดยส่วนใหญ่ของอะราบินโนไซแลนประกอบไปด้วยหน่วยย่อย arabinofuranosyl เพียงหน่วยเดียว โดยเป็นสายโซ่กิ่งสั้นๆ บนสายสายโซ่หลักไซแลนและที่ส่วนปลายของ arabinose residues ที่ตำแหน่ง O-5 อาจจับกับกรดเพอริลิกด้วยพันธะโควาเลนต์ของเอสเทอร์ (Izydorczyk และ Biliaderis, 1995) การทดลองนี้ให้ผลสอดคล้องกับ Izydorczyk และ Biliaderis (1995) ซึ่งสามารถตรวจพบ terminal xylosyl galactosyl และ glucosyl ปริมาณต่ำในตัวอย่าง

#### 4.3 คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

##### 4.3.1 ปริมาณและการจำแนกชนิดของสารประกอบฟีนอลิกโดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

###### 4.3.1.1 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและสารประกอบฟีนอลิกของอะราบินโนไซแลน

จากรำข้าวด้วยการระบวณการตกตะกอนด้วยเอทานอล (graded ethanol precipitation)

อะราบินโนไซแลนที่ไม่ละลายน้ำจากรำข้าวสกัดไขมันซึ่งถูกนำมาแยกด้วยเอนไซม์ endoxylanase และแยกส่วนออกเป็น 3 ส่วน โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล 3 ระดับตามวิธีที่ได้อธิบายในบทที่ 2 โดยตัวอย่างที่ตกตะกอนในเอทานอลความเข้มข้น 0-60% เรียกว่า F60 ตัวอย่างที่ตกตะกอนในเอทานอลความเข้มข้น 60-90% เรียกว่า F6090 และตัวอย่างที่ตกตะกอนในเอทานอลความเข้มข้นมากกว่า 90% เรียกว่า F90 ปริมาณฟีนอลิกอิสระและฟีนอลิกยึดเหนี่ยวทั้งหมดของทั้ง 3 ส่วน แสดงในตารางที่ 3.8 พบว่า ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟีนอลิกอิสระ

และฟีนอลิกชนิดเหนียวของ rice bran WUAX อยู่ใน ช่วง 726.7-4,636.7, 716.7-3,253.4 mg FAE/100g และ 9.98-3,299.4 mg FAE/100g ตามลำดับ โดยสารสกัดส่วน F6090 จะมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าส่วน F60 และ F90 ตามลำดับ ซึ่ง F60 และ F90 จะมีปริมาณฟีนอลิกอิสระใกล้เคียงกัน แต่สารสกัด F90 มีปริมาณฟีนอลิกชนิดเหนียวในปริมาณต่ำ โดยปริมาณฟีนอลิกชนิดเหนียวในสารสกัด F60, F6090 และ F90 พบในปริมาณ 82%, 30% และ 1% ของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ตามลำดับ และปริมาณฟีนอลิกอิสระในปริมาณ 8%, 70% และ 99% ของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ตามลำดับ Rao และ Muralikrishna (2004) รายงาน โพลีแซคคาไรด์ส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (water unextractable non-starch polysaccharide) จะประกอบไปด้วยกรดฟีนอลิกชนิดเหนียวจำนวนมากกว่าโพลีแซคคาไรด์ส่วนที่สามารถละลายน้ำได้ (water extractable non-starch polysaccharide) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การแยกส่วนโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอลสามารถแยกอะราบิโนไซแลนที่ให้สารประกอบฟีนอลิกซึ่งมีคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลได้ในปริมาณแตกต่างกัน

**ตารางที่ 3.8** ปริมาณฟีนอลิกอิสระ (free phenolic) ฟีนอลิกชนิดเหนียว (bound phenolic) และฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic) ของอะราบิโนไซแลนที่สกัดจากการแยกส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเอทานอลออกเป็น 3 ส่วน

Ethanol fractionated	Free phenolic	Bound phenolic	Total <sup>a</sup>
WUAX	(mg FAE/100g)	(mg FAE/100g)	
F60	727.1 ± 63.2 <sup>a</sup>	3,299.4 ± 435.0 <sup>c</sup>	4,026.5
F6090	3,253.4 ± 174.9 <sup>b</sup>	1,383.3 ± 317.1 <sup>b</sup>	4,636.7
F90	716.7 ± 21.7 <sup>a</sup>	9.98 ± 2.6 <sup>a</sup>	726.7

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b, c ที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันของปริมาณฟีนอลิกที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

**ตารางที่ 3.9** ปริมาณกรดฟีนอลิกอิสระ (free phenolic acids) ของอะราบิโนไซแลนที่สกัดจากการแยกส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเอทานอลออกเป็น 3 ส่วน

Compounds ( $\mu\text{g/g}$ )	F60	F6090	F90
Gallic acid	ND	ND	ND
Protocatechuic acid	ND	ND	47.3 $\pm$ 1.2
4-OH-Benzoic acid	12.7 $\pm$ 0.5	ND	39.8 $\pm$ 1.0
Vanilic acid	27.4 $\pm$ 2.1	ND	106.6 $\pm$ 9.5
Caffeic acid	8.8 $\pm$ 1.0	ND	217.4 $\pm$ 27.5
<i>p</i> -Coumaric acid	203.7 $\pm$ 21.9	32.4 $\pm$ 4.9	858.3 $\pm$ 18.5
<i>o</i> -Coumaric acid	7,492.2 $\pm$ 417.8	59,247.3 $\pm$ 14.3	ND
Ferulic acid	643.8 $\pm$ 36.8 <sup>b</sup>	199.5 $\pm$ 9.9 <sup>a</sup>	737.2 $\pm$ 9.6 <sup>c</sup>
<b>Total</b>	8,388.6	59,479.2	2,006.6

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b, c ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันของปริมาณ Ferulic acid ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

**ตารางที่ 3.10** ปริมาณกรดฟีนอลิกยึดเหนี่ยว (bound phenolic acids) ของอะราบิโนไซแลนที่สกัดจากการแยกส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเอทานอลออกเป็น 3 ส่วน

Compounds ( $\mu\text{g/g}$ )	F60	F6090	F90
Gallic acid	65.1 $\pm$ 19.9	20.0 $\pm$ 2.7	ND
Protocatechuic acid	ND	ND	ND
4-OH-Benzoic acid	88.1 $\pm$ 11.8	62.1 $\pm$ 6.35	5.6 $\pm$ 0.86
Vanilic acid	365.4 $\pm$ 27.4	305.8 $\pm$ 2.8	ND
Caffeic acid	78.5 $\pm$ 12.0	156.6 $\pm$ 20.4	ND
<i>p</i> -Coumaric acid	3,424.0 $\pm$ 583.6	1,411.6 $\pm$ 104.1	9.9 $\pm$ 0.69
<i>o</i> -Coumaric acid	ND	ND	ND
Ferulic acid	57,276.5 $\pm$ 932.5 <sup>b</sup>	65,670.0 $\pm$ 235.4 <sup>c</sup>	107.8 $\pm$ 10.88 <sup>a</sup>
<b>Total</b>	61,297.6	67,626.1	123.3

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b, c ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันของปริมาณ Ferulic acid ที่ระดับความเชื่อมั่น 95

ปริมาณกรดฟีนอลิกอิสระ (free phenolic acids) และปริมาณกรดฟีนอลิกยึดเหนี่ยว (bound phenolic acids) ของอะราบีโนไซแลนที่สกัดจากการแยกส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเอทานอลได้สารสกัดเป็น F60, F6090 และ F90 แสดงในตารางที่ 3.9 และ 3.10 พบว่า อะราบีโนไซแลนที่สกัดจากรำข้าวจากการตกตะกอนด้วยเอทานอลประกอบไปด้วยกรดฟีนอลิก 2 กลุ่มคือ กลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิก (Hydroxycinnamic Acid) ได้แก่ กรดแคฟเฟอิก (caffeic acid), กรดเฟอร์ริก (ferulic acid) และกรดคูมาริก (coumaric acids) และกลุ่มกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (hydroxybenzoic acids) ได้แก่ กรดแกลลิก (gallic acid), กรดวานิลลิก (vanilic acid), กรดโพรโตแคทชิวอิก (protocatechuic acid) และ กรด 4-ไฮดรอกซีเบนโซอิก (4-hydroxybenzoic acids) โดยสารสกัดส่วน F6090 พบ ปริมาณกรดฟีนอลิกมากกว่า F60 และ F90 ตามลำดับ และพบกรด ferulic เป็นองค์ประกอบหลักของกรดฟีนอลิกยึดเหนี่ยวตามด้วยกรด *p*-coumaric และพบกรด ferulic ในรูปแบบกรดฟีนอลิกยึดเหนี่ยวมากกว่ารูปแบบอิสระในสารสกัด F60 และ F6090 ส่วนกรด *p*-coumaric พบทั้งในแบบกรดฟีนอลิกยึดเหนี่ยวและแบบกรดฟีนอลิกอิสระ ส่วนกรด *o*-coumaric พบในรูปแบบกรดฟีนอลิกอิสระ

กรด ferulic ที่พบในสารสกัด F60 และ F6090 โดยส่วนใหญ่เป็นกรดฟีนอลิกแบบยึดเหนี่ยว ปริมาณกรดฟีนอลิกแบบยึดเหนี่ยวพบในปริมาณ 89 และ 329 เท่าสูงกว่ากรดฟีนอลิกแบบอิสระ (ตารางที่ 3.9 และ 3.10) ผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับปริมาณกรด ferulic ใน rice non-starch polysaccharide ซึ่งพบเป็นกรดฟีนอลิกในรูปแบบยึดเหนี่ยวมากกว่าแบบอิสระ (Rao และ Muralikrishna, 2004) สำหรับสารสกัด F90 ประกอบไปด้วย กรด ferulic ในรูปแบบยึดเหนี่ยวน้อยกว่ารูปแบบอิสระ ซึ่งพบในปริมาณ 13% ของ bound ferulic acids และ 87% ในรูปแบบ free ferulic acids สำหรับกรด *p*-coumaric ที่พบในสารสกัด F60 และ F6090 โดยส่วนใหญ่เป็นกรดฟีนอลิกแบบยึดเหนี่ยวมากกว่ารูปแบบอิสระ แต่ในสารสกัด F90 พบในรูปแบบอิสระมากกว่ารูปแบบยึดเหนี่ยว ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองทั่วไปซึ่งพบว่า กรด coumaric เป็นองค์ประกอบอันดับสองและส่วนใหญ่มีปริมาณ น้อยกว่ากรด ferulic 4 เท่า (Rao และ Muralikrishna, 2004) สำหรับกรด gallic นั้นไม่พบในรูปแบบกรดฟีนอลิกอิสระแต่พบในรูปแบบกรดฟีนอลิกแบบยึดเหนี่ยวในปริมาณต่ำในสารสกัด F60 และ F6090 ส่วนกรด protocatechuic พบในรูปแบบกรดฟีนอลิกยึดเหนี่ยวในสารสกัด F90 สำหรับสารสกัด F6090 พบกรด coumaric ในรูปแบบกรดฟีนอลิกยึดเหนี่ยวในปริมาณสูง แต่ไม่พบกรดฟีนอลิกอิสระจำพวก gallic acid, protocatechuic acid, 4-OH-Benzoic acid, vanilic และ caffeic acid

โดยสรุป กรดฟีนอลิกหลักๆ ที่พบในอะราบีโนไซแลนที่สกัดจากการแยกส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเอทานอล ประกอบไปด้วยกรด ferulic, *p*-coumaric และ *o*-coumaric โดย

กรด ferulic จะพบมากที่สุด ซึ่งโดยทั่วไปกรด ferulic จะเชื่อมต่อกับ arabinoxylans ในผนังเซลล์ของ aleurone layers (Shibuya และ Iwasaki, 1985; Izydorczyk และ Biliaderis, 1995) กรด ferulic จะพบในรูปแบบกรดฟีนอลิกยึดเหนี่ยวมากกว่ารูปแบบอิสระเช่นเดียวกับกรด *p*-coumaric แต่กรด *o*-coumaric จะพบในรูปแบบกรดฟีนอลิกอิสระมากกว่ารูปแบบกรดฟีนอลิกยึดเหนี่ยว จากตัวอย่างทั้ง 3 ส่วน สารสกัด F6090 จะมีกรด ferulic รูปแบบกรดฟีนอลิกยึดเหนี่ยวมากที่สุดในปริมาณ 65,670  $\mu\text{g/g}$  อย่างไรก็ตาม ในสารสกัด F6090 ไม่พบกรดฟีนอลิกอิสระจำพวก gallic acid, protocatechuic acid, 4-OH-Benzoic acid, vanilic และ caffeic acid ส่วนสารสกัด F90 พบกรดฟีนอลิกอิสระมากกว่ากรดฟีนอลิกในรูปแบบยึดเหนี่ยว มีรายงานการตรวจวัดปริมาณกรดฟีนอลิกในข้าวและข้าวโพด พบว่าประกอบไปด้วยส่วนของ insoluble-bound form 74% และ 69% ของปริมาณฟีนอลิกรวม ตามลำดับ (Ishii, 1997; Zhao และ Moghadasian, 2008)

#### 4.3.1.2 โครงสร้างน้ำหนักโมเลกุลของของอะราบีโนไซแลนจากรำข้าวที่สกัดด้วย กระบวนการตกตะกอนด้วยเอทานอล (graded ethanol precipitation)

โครงสร้างน้ำหนักโมเลกุลของของอะราบีโนไซแลนจากรำข้าวด้วยกระบวนการตกตะกอนด้วยเอทานอล แสดงในตารางที่ 3.11 พบว่า น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของตัวอย่างที่ตกตะกอนมีน้ำหนักน้อยเมื่อตกตะกอนในเอทานอลความเข้มข้นสูง โดยน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของสารสกัด F60 มีค่าสูงสุดที่  $5.786 \times 10^4$  กรัมต่อโมล น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของตัวอย่าง F6090 มีค่า  $4.137 \times 10^4$  กรัมต่อโมล และน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของสารสกัด F6090 มีค่า  $1.525 \times 10^3$  กรัมต่อโมล แสดงให้เห็นว่ากระบวนการตกตะกอนด้วยเอทานอลนี้สามารถแยกอะราบีโนไซแลนตามน้ำหนักโมเลกุลได้



**ตารางที่ 3.11** น้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (weight-average molecular weight, Mw), น้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยโดยจำนวน (number-average molecular weight, Mn), Z-value molecular weight (Mz) และดัชนีการกระจาย (polydispersity index, Mw/Mn, XMz/Mn) ของอะราบีโนไซแลนที่สกัดจากการแยกส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเอทานอลออกเป็น 3 ส่วน

	Mw (g/mol)	Mn (g/mol)	Mz (g/mol)	Mw/Mn	Mz/Mn	DP <sup>a</sup>
F60	$5.786 \times 10^4$	$3.169 \times 10^4$	$9.501 \times 10^4$	1.826	2.998	438
F6090	$4.137 \times 10^4$	$1.894 \times 10^4$	$1.078 \times 10^5$	2.185	5.693	313
F90	$1.525 \times 10^3$	$2.932 \times 10^2$	$1.446 \times 10^4$	5.199	49.307	12

หมายเหตุ Degree of polymerization (DP) = MW/ 132 g/mol

Cherukuri และ Cheruvanky (2007) รายงาน น้ำหนักโมเลกุลของอะราบีโนไซแลนจากรำข้าวที่ผ่านการสกัดด้วยด่างด้วยเทคนิค size exclusion chromatography พบว่า มี 2 ขนาดโมเลกุลที่น้ำหนักโมเลกุล 40 และ 6 กิโลดาลตัน (kDa) ซึ่งขการกระจายขนาดโมเลกุลและขนาดโมเลกุลที่พบจากระบวนการตกตะกอนด้วยเอทานอลในการทดลองนี้ให้ผลแตกต่างจากการรายงานข้างต้น โดยพบอะราบีโนไซแลนที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน 3 ส่วนและมี degree of polymerization สูงกว่าการรายงานของ Zhou และคณะ (2010) และน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัด F60 มีขนาด  $5.786 \times 10^4$  กรัมต่อโมล ซึ่งต่ำกว่า heteropolysaccharides จากการสกัดไขมันในรำข้าวออกด้วยน้ำร้อนที่โดยปกติมีขนาดโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 90 กิโลดาลตัน (Wang และคณะ, 2008)

ดัชนีการกระจาย (polydispersity index) ของโมเลกุลของอะราบีโนไซแลนสามารถหาได้จากค่า Mw/Mn และ Mz/Mn ซึ่งพบว่า ดัชนีการกระจายของตัวอย่างสกัดทั้ง 3 ส่วน มีค่ามากกว่า 1 แสดงให้เห็นว่ามีความกระจายของโมเลกุลสูงหรือมีรูปร่างของโมเลกุลไม่แน่นอนและ/หรือโมเลกุลมีกิ่งก้านสาขามาก โดยสารสกัด F90 แสดงค่าดัชนีการกระจายมากกว่าสารสกัด F60 และ F6090 ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับความสามารถในการตกตะกอน แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงแต่มีการกระจายตัวต่ำจะตกตะกอนได้ที่มีความเข้มข้นของเอทานอลต่ำกว่าความเข้มข้นของเอทานอลสูง เนื่องจาก การตกตะกอนด้วยเอทานอลต้องอาศัยความชื้นชอบน้ำ (hydrophobic) ระบบจะมีความเป็น hydrophobic เพิ่มขึ้นเมื่อเพื่อความเข้มข้นของเอทานอล ดังนั้น rice bran WUAX ที่มีขนาดโมเลกุลสูงจะมีความเป็น hydrophilic สูงจะรวมตัวและตกตะกอนออกมาก่อน

ความยาวสายโซ่โดยเฉลี่ย (degree of polymerization) สามารถคำนวณได้จากสัดส่วนน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยโดยน้ำหนักต่อน้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลไซโลส (132 กรัมต่อโมล) ซึ่งพบว่า ความยาวสายโซ่โดยเฉลี่ยมีขนาดเล็กลงจาก 438 ถึง 12 เมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้นจาก 60 ถึง >90% โดยตัวอย่าง F90 ที่มี DP 12 แสดงถึง oligosaccharide

พฤติกรรมการตกตะกอนด้วยเอทานอลใน rice bran WUAX จากการทดลองนี้ พบว่า เหมือนกับการย่อยด้วยเอนไซม์ของ wheat bran WUAX ซึ่งโมเลกุลของอะราบิโนไซแลนจะมีขนาดเล็กลงและจะตกตะกอนเป็นลำดับกับความเข้มข้นของเอทานอล (Swennen และคณะ, 2006) โดยโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ที่มีหมู่แทนที่มากจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ได้น้อยทำให้โมเลกุลหลังการย่อยมีขนาดใหญ่และมีความเป็น hydrophilic สูง ซึ่งขึ้นชอบที่จะรวมตัวกันทำให้ตกตะกอนออกมาเป็นอันดับแรก

#### 4.3.1.3 ปริมาณน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ โปรตีนและคุณสมบัติทางโครงสร้างของรำข้าวที่สกัดด้วยกระบวนการตกตะกอนด้วยเอทานอล (graded ethanol precipitation)

ปริมาณน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ของรำข้าวสกัดด้วยกระบวนการตกตะกอนด้วยเอทานอล แสดงในตารางที่ 3.12 พบว่า สารสกัด F60 และ F6090 มีน้ำตาล xylose เป็นองค์ประกอบหลักในปริมาณ 560.22 และ 576.99 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ และมีน้ำตาล arabinose เป็นองค์ประกอบรอง ในปริมาณ 164.44 และ 170.20 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งสามารถคำนวณเป็นปริมาณอะราบิโนไซแลนได้ประมาณ 640 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง อย่างไรก็ตามยังพบน้ำตาล galactose, glucose และ rhamnose และพบ mannose ในปริมาณต่ำซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในการสกัดอะราบิโนไซแลนจากรำข้าว (Shibuya และ Iwasaki, 1985; Izydorczyk และ Biliaderis, 1995) และส่วนของอะราบิโนไซแลนที่ละลายน้ำจากเมล็ดข้าว (Rao และ Muralikrishna, 2007) จากการทดลองนี้ สารสกัด F60 และ F6090 มีปริมาณและองค์ประกอบของน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ใกล้เคียงกันและใกล้เคียงกับ rice bran polysaccharides ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์จาก *Aspergillus Oryzae* และ *Lentimus edodes* enzymes จากการรายงานของ Ghoneum และ Maeda (1996) ซึ่งพบว่าตัวอย่างที่ย่อยได้ประกอบไปด้วยน้ำตาล arabinose, xylose, galactose, glucose และ mannose

ตารางที่ 3.12 องค์ประกอบของ rice bran WUAX ที่สกัดด้วยกระบวนการตกตะกอนด้วยเอทานอล

Components <sup>a</sup> (mg/g)	F60	F6090	F90
Ara	164.44 ± 10.02	170.20 ± 1.81	11.09 ± 1.32
Xyl	560.22 ± 21.88	567.99 ± 16.83	20.45 ± 1.61
Glu	37.05 ± 2.79	52.07 ± 2.06	49.04 ± 2.11
Gal	72.35 ± 4.03	43.51 ± 4.68	ND
Rham	15.65 ± 3.12	19.75 ± 2.93	ND
Man	ND	5.46 ± 0.73	ND
Glucuronic acid	ND	ND	ND
Galacturonic acid	3.7 ± 0.52	1.18 ± 0.07	ND
Protein <sup>b</sup>	76.9 ± 0.26	26.1 ± 0.02	6.2 ± 0.03
AX	637.70	649.60	27.75
Ara/Xyl	0.29	0.30	0.54

หมายเหตุ Ara, arabinose; Xyl, xylose; Glu, glucose; Gal, galactose; Rhamnose; Man, mannose, AX: arabinoxylan =  $0.88 \times (\% \text{ Xyl} + \% \text{ Ara})$ ; Ara/Xyl: arabinose to xylose ratio; ND, not detected.

สำหรับ galacturonic acid หรือ uronic acid นั้นพบในปริมาณต่ำเมื่อเทียบกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบ uronic acid ใน rice bran water extractable arabinoxylan ในปริมาณ 23 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง (Wang และคณะ, 2008) และที่รายงานใน native และ malted rice grain ซึ่งพบ uronic acid ในปริมาณ 80-130 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง (Rao และ Muralikrishna, 2007) โดย uronic acids จะพบในโครงสร้างอะราบินโนไซด์โดยเป็นส่วนที่ไปเชื่อมต่อกับ xylose residues ที่ตำแหน่ง O-2 (Shibuya และ Iwasaki, 1985)

ปริมาณน้ำตาล Arabinose ต่อ xylose (Ara/Xyl) มีค่าค่อนข้างต่ำในตัวอย่าง F60 และ F6090 มีค่าเพียง 0.29 – 0.3 แสดงให้เห็นถึงการแทนที่ด้วยน้ำตาล Arabinose ต่ำในตัวอย่างทั้ง 2 fraction นี้

สารสกัด F90 พบน้ำตาลกลูโคสปริมาณสูงเมื่อเทียบกับน้ำตาลมอลโทแซ็กคาไรด์ชนิดอื่น พบในปริมาณ 49.04 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง ซึ่งจากปฏิกิริยา Methylation ของ polysaccharide fraction ที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบจาก rice bran ที่ศึกษาโดย Shibuya และ

Iwasaki (1985) แสดงให้เห็นว่าสายโซ่หลักของกลูแคนที่เชื่อมต่อกับพันธะ  $\alpha$ -(1-4)-linked glucan จะมีกิ่งเชื่อมต่อกับตำแหน่ง O-6 ประมาณ 40% การทดลองนี้ ในตัวอย่างรำข้าว (rice bran hemicelluloses) จะประกอบไปด้วย xyloglucan นอกเหนือจากอะราบิโนไซแลน ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่า สารสกัด F90 ประกอบไปด้วย xyloglucan เป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้ ตัวอย่างรำข้าว ที่สกัดด้วยกระบวนการตกตะกอนด้วยเอทานอล พบปริมาณ โปรตีนที่แตกต่างกัน โดยสารสกัด F60 มีโปรตีนสูงกว่า F6090 และ F90 ตามลำดับ (76.9, 26.1 และ 6.2 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ).

พันธะไกลโคซิดิกระหว่างโมเลกุล (interglycosidic linkages) ระหว่าง น้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ของอะราบิโนไซแลนในตัวอย่างแต่ละ fraction ถูกวิเคราะห์โดยการทำปฏิกิริยา methylation โดยคำนึงถึงเฉพาะน้ำตาล arabinose และ xylose แสดงสัดส่วนจำนวนโมเลกุลแทนที่ แสดงในตารางที่ 3.13. ซึ่งขึ้นกับ retention time และ mass spectral patterns จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gas chromatography

น้ำตาล Arabinose เป็นน้ำตาลที่มาเชื่อมต่อกับน้ำตาลไซโลส (terminal linked sugar) แสดงเป็น T-linked Ara ในตารางที่ 3.13 พบว่า มีปริมาณ 21.60-23.32 % แสดงให้เห็นว่า terminal-linked arabinose เป็นน้ำตาลองค์ประกอบหลักของสายโซ่ข้างของทุกตัวอย่าง F60, F6090 และ F90 และพบว่าทุก fractions มีกิ่งก้านที่แทนที่ตำแหน่ง C-(O)-3 monosubstituted xylose จำนวนมาก โดยแสดงพันธะ 3, 4-linked Xyl ในปริมาณ 28.83-32.72% อย่างไรก็ตาม พบการแทนที่ตำแหน่ง C-(O)-2 monosubstituted xylose residues (พันธะ 2, 4-linked Xyl) และการแทนที่ตำแหน่ง C-(O)-2 และ C-(O)-3 di-substituted xylose (พันธะ 2, 3, 4-linked Xyl) residues จำนวนน้อย ผลการทดลองนี้ตรงกับรายงานของ Shibuyu และ Iwasaki (1985) ที่พบว่า rice bran hemicellulose ประกอบไปด้วยอะราบิโนไซแลนที่มีโครงสร้างกิ่งก้านมากมาย โดยสายโซ่ไซแลน จะถูกแทนที่ด้วยน้ำตาลอะราบิโนสที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งที่ C-(O)-2 หรือ C-(O)-3 ในปริมาณ 24.6-31.3% และมีการแทนที่ทั้งสองตำแหน่ง (di-substituted xylose) ในปริมาณ 6.7% และอะราบิโนไซแลนจากธัญพืชโดยส่วนใหญ่จะพบการแทนที่ของน้ำตาลอะราบิโนสที่ตำแหน่งเดียวมากกว่า การแทนที่แบบสองหรือสามตำแหน่ง (Izydorcztik และ Biliaderis, 1995)

ตารางที่ 3.13 พันธะที่พบในอะราบิโนไซแลนที่ได้จากปฏิกิริยา methylation ใน rice bran WUAX ที่สกัดด้วยกระบวนการตกตะกอนด้วยเอทานอล

Linkages <sup>a</sup> (% molar ratio)	F60	F6090	F90
T- linked Xyl	3.51 ± 0.01	3.64 ± 0.2	9.94 ± 0.07
T- linked Ara	22.85 ± 0.83	23.32 ± 1.47	21.60 ± 0.05
4-linked Xyl	25.44 ± 1.04	28.40 ± 0.56	27.11 ± 1.52
2,4- linked Xyl	13.27 ± 0.92	12.67 ± 0.83	6.96 ± 0.5
3,4- linked Xyl	31.88 ± 4.13	28.83 ± 1.16	32.72 ± 2.16
2,3,4- linked Xyl	3.05 ± 0.77	3.15 ± 0.24	1.67 ± 0.13

หมายเหตุ T- linked Xyl, terminal nonreducing end xylose; T- linked Ara , terminal nonreducing end arabinose.

non-reducing end arabinose (T-linked Ara) และ non-reducing end xylose (T-linked Xyl) เป็นน้ำตาลที่ปรากฏในส่วนปลายสุดของสายโซ่ จากตารางที่ 3.13 พบ Non-reducing end arabinose ในปริมาณ 21.60–23.32% molar ratio และ non-reducing end xylose 3.54–9.94% คิดเป็น non-reducing end arabinose: non-reducing end xylose เท่ากับ 6.51, 6.41 และ 2.17 สำหรับสารสกัด F60, F6090 และ F90 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าอะราบิโนไซแลนจากรำข้าวของสารสกัด F60 และ F6090 มีโครงสร้างที่เป็นกิ่งก้านมากมาย Shibuya และ Iwasaki (1985) รายงานว่าโครงสร้างโมเลกุลของ rice bran hemicellulose ประกอบไปสายโซ่ข้างของ arabino-furanosyl เพียง 1 โมเลกุล และนอกจากน้ำตาลอะราบิโนสจะปรากฏเป็นสายโซ่ข้างแล้วนั้น ยังพบ น้ำตาล xylosyl, galactosyl และ glucosyl เป็นส่วนน้อยที่ปรากฏเป็นส่วนปลายของสายโซ่ข้าง (Izydorczyk และ Biliaderis, 1995)

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาของ Rao และ Muralikrishna (2007); Izydorczyk และ Biliaderis (1995); Shibuya และ Iwasaki (1985) ได้สมมติฐานว่า the terminal-linked arabinose residues คือสายโซ่สั้นบนสายโซ่หลักไซแลน และ the terminal-linked arabinose residues จะจับกับกรดเฟอรูลิกด้วยพันธะโควาเลนต์ของเอสเทอร์ที่ตำแหน่ง C (O)-5 ของน้ำตาลอะราบิโนส (Smith และ Hartley, 1983; Izydorczyk และ Biliaderis, 1995) จากตารางที่ 3.13 ในทุกตัวอย่างเห็นได้ว่าค่าพันธะของ 3,4- linked Xyl สูงกว่า 2,4- linked Xyl 5 เท่า แสดงว่ามีการแทนที่ที่

ตำแหน่ง C-(O)-3 มากกว่า C-(O)-2 mono-substituted xylose ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าน้ำตาลอะราบิโนสจะเชื่อมต่อกับกรดเฟอร์ูลิกด้วยพันธะโควาเลนต์เอสเทอร์ที่ตำแหน่ง C (O)-5 และน้ำตาลอะราบิโนสที่มีกรดเฟอร์ูลิกจะเชื่อมต่อกับไซโลสที่ตำแหน่ง C-(O)-3 ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างของ feruloyl arabinoxylans (Izydorczyk และ Biliaderis, 1995).

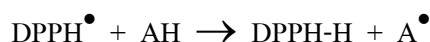
ตัวอย่าง F60 และ F6090 มีค่าพันธะ 2,3,4- linked Xyl ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 3.13) แสดงว่ามีการแทนที่ของน้ำตาลอะราบิโนสในน้ำตาลไซโลสที่ตำแหน่ง C-(O)-2 และ C-(O)-3 ใกล้เคียงกัน ผลการทดลองนี้ตรงกับการทดลองของ Shibuya และ Iwasaki (1985) และการแทนที่ด้วยน้ำตาลอะราบิโนสเป็นสายโซ่ทั้งสองตำแหน่งในอะราบิโนสยังมีรายงานในการสกัดอะราบิโนไซแลนจากรำข้าวสาลี (Beaugard และคณะ, 2004), dehusked barley (Han, 2000), native rice และ malted rice (Rao และ Muralikrishna, 2007) นอกจากนี้ ไซโลสสายโซ่ตรงที่แสดงโดยพันธะ 4-linked Xyl ยังพบในทุกตัวอย่างในปริมาณ 25.4-28.4% จากผลโครงสร้างโดยรวมของอะราบิโนไซแลนที่สกัดจากรำข้าวนี้แสดงให้เห็นว่า อะราบิโนไซแลนที่สกัดโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ endoxylanase ตามด้วยการตกตะกอนด้วยเอทานอลมีโครงสร้างเป็นกิ่งก้านที่ประกอบไปด้วยสายโซ่หลักของไซแลนและโซ่ข้างของน้ำตาลอะราบิโนสและน้ำตาลอะราบิโนสที่ต่อกับกรดเฟอร์ูลิกด้วยพันธะโควาเลนต์เอสเทอร์ โดยสายโซ่ข้างจะเชื่อมต่อกับสายไซแลนที่พันธะ C-(O)-3 ของน้ำตาลไซโลสเป็นหลัก

#### 4.4 คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของรำข้าวที่สกัดด้วยกระบวนการตกตะกอนด้วยเอทานอล

##### 4.4.1 การยับยั้งอนุมูลอิสระโดยใช้วิธีวิเคราะห์ DPPH และ Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

ตารางที่ 3.14 แสดงสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดอะราบิโนไซแลนจากรำข้าวที่ได้จากการสกัดด้วยกระบวนการตกตะกอนด้วยเอทานอลได้เป็น 3 ส่วน โดยแสดงปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระลดลง 50% (IC<sub>50</sub>, 50% of inhibitory concentration) โดยทั่วไป หากค่า IC<sub>50</sub> เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานแล้วพบว่ามีความต่ำกว่าสารมาตรฐานแสดงว่ามีสมบัติยับยั้งอนุมูลอิสระสูง ซึ่งในการทดสอบนี้ใช้สารมาตรฐาน 3 ชนิด ได้แก่ trolox, ascorbic acid และ ferulic acid การทดสอบใช้ DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้น (Prapairat และคณะ, 2011) มีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่

ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และเมื่ออนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้สีม่วงจางลงเป็นสีเหลืองนวลคังสมการ (บุหริน พันธุ์สุวรรณ, 2556)



สารสกัดอะราบิโนไซแลนจากรำข้าวที่สกัดด้วยกระบวนการตกตะกอนด้วยเอทานอลทั้ง 3 ส่วน F60, F6090 และ F90 แสดงสมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารมาตรฐาน Tolox, Ascorbic acid และ Ferulic acid โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  สูงกว่าสารมาตรฐาน (ตารางที่ 3.14) สารสกัด F60, F6090 และ F90 มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 556.6, 389.6 and 1,314.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่าสารสกัด F6090 มีสมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดจาก F60 และ F90 โดยให้ผลสอดคล้องกับปริมาณกรดเพอรูริกที่อยู่ในรูปฟีนอลิกชนิดเหนียวที่มีมากในสารสกัด F6090 การทดลองให้ผลเช่นเดียวกับ Yuan, Wang, Yao และ Chen, 2005 ที่รายงานค่า  $\text{IC}_{50}$  จากสารสกัด feruloylated oligosaccharide จากรำข้าวสาลีซึ่งสกัดจากการย่อยด้วยเอนไซม์ xylanase จาก *Bacillus subtilis* เท่ากับ 520 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การตรวจวิเคราะห์หาความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระ Ferric reducing antioxidant power หรือ FRAP โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์ริก  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ (ferric tripyridyltriazine) เป็นสารทดสอบ อะตอมของเหล็กในสารนี้จะถูกรีดิวซ์โดยสารต้านออกซิเดชันได้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัส  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงินที่ดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ผลการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัด F60, F6090 และ F90 แสดงในตารางที่ 3.14 พบว่า สารสกัด F6090 มีค่า FRAP สูงที่สุด คือ 896.06 ไมโครโมลของ  $\text{Fe}^{+2}$ ต่อกรัม โดยสูงกว่าสารสกัด F60 ที่มีค่า FRAP เท่ากับ 786.18 ไมโครโมลของ  $\text{Fe}^{+2}$ ต่อกรัม และสารสกัด F90 มีค่า FRAP น้อยสุดที่ปริมาณ 106.21 ไมโครโมลของ  $\text{Fe}^{+2}$ ต่อกรัม ผลความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ให้ผลสอดคล้องกับวิธี DPPH แสดงให้เห็นว่า สารสกัด F6090 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง ผลการวิจัยในครั้งนี้สอดคล้องกับผลการวิจัยหลายงานวิจัยที่พบว่า ฟีชีมีสารประกอบฟีนอลิกจะมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูง (Ou และคณะ, 2002; Javanmardi และคณะ, 2003; Luximon-Ramma และคณะ, 2003; Sangkittikomol, 2003; Djeridane และคณะ, 2006; Ana และคณะ, 2007; Jasna และคณะ, 2007) และให้ผลสอดคล้องกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแกลบ (husk) และรำ (bran) จากข้าวขาวดอก

มะลิ 105 ที่แสดงสมบัติยับยั้งอนุมูลอิสระสูงจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH และ FRAP (Sunan Butsat และ Sirithon Siriamornpun, 2010)

อย่างไรก็ตาม จากผลทางสถิติ พบว่า สารสกัด F60 และ F6090 มีค่า FRAP ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่สารสกัด F6090 มีค่า DPPH ต่ำกว่า F6090 และ F90 ทางสถิติตามลำดับ ความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ที่แตกต่างกันเนื่องมาจากวิธีการสกัดและวิธีการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน (นิธิยา รัตนปนนท์, 2548; โอภา วัชรคุปต์, 2549) ทั้งวิธี DPPH และ FRAP เป็นการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดจากอนุมูลอิสระ ซึ่งเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายในเวลา 4-6 นาที แต่ในการวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันจากพีชจำพวกฟีนอลิก จะพบว่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร จะเพิ่มขึ้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ ดังนั้นการวัดครั้งเดียวตามเวลาที่กำหนด อาจไม่ใช่ค่าที่เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ วิธี FRAP มีข้อดีคือเป็นวิธีที่ง่ายใช้เวลาสั้น ไม่แพง และไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ แต่มีข้อเสียคือกลไกของปฏิกิริยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ไม่เกี่ยวข้องกับกลไกในร่างกาย ส่วนข้อดีของวิธี DPPH คือทำง่าย อนุมูล DPPH<sup>•</sup> จะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับสารต้านอนุมูลอิสระภายในเวลา 30 นาที ปกติจะใช้เวลาประมาณ 5 นาที อนุมูล DPPH<sup>•</sup> ละลายได้ทั้งในน้ำและสารทำละลายอินทรีย์ ใช้วิเคราะห์หาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นสารที่ละลายน้ำหรือสารที่ละลายในไขมัน ส่วนข้อเสียของวิธี DPPH คือ DPPH<sup>•</sup> ไม่เป็นสารตามธรรมชาติที่ก่อให้เกิดอนุมูลในเซลล์หรือในร่างกายเช่นเดียวกับ Fe<sup>3+</sup>-TPTZ (โอภา วัชรคุปต์, 2549)



ตารางที่ 3.14 ความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระของ rice bran WUAX ที่สกัดด้วยกระบวนการตกตะกอนด้วยเอทานอล วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH และ FRAP

ตัวอย่าง	DPPH		FRAP value		
	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	µmol Fe <sup>+2</sup> /g	mg TRE/mg	mg AAE/mg	mg FAE/mg
F60	556.6 ± 31.3 <sup>c</sup>	786.2 ± 2.6 <sup>b</sup>	0.56 ± 0.02	0.37 ± 0.01	0.41 ± 0.01
F6090	389.5 ± 11.0 <sup>b</sup>	896.1 ± 16.7 <sup>b</sup>	0.65 ± 0.04	0.43 ± 0.02	0.48 ± 0.02
F90	1,314.7 ± 17.0 <sup>d</sup>	106.2 ± 0.31 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00
Trolox	2.98 ± 0.0 <sup>a</sup>	14,065 ± 142 <sup>c</sup>			
Ascorbic acid	2.85 ± 0.03 <sup>a</sup>	21,670 ± 420 <sup>d</sup>			
Ferulic acid	5.28 ± 0.07 <sup>a</sup>	21,347 ± 866 <sup>d</sup>			

หมายเหตุ TRE, trolox equivalent; AAE, ascorbic acid equivalent; FAE, ferulic acid equivalent ตัวอักษร a, b, c และ d ที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันของปริมาณ DPPH และ FRAP value ในสารสกัดทั้ง 3 ส่วน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากผลความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของ rice bran WUAX ที่สกัดด้วยกระบวนการตกตะกอนด้วยเอทานอลทั้ง 3 ส่วน ในตารางที่ 3.8, 3.9, 3.10 และ 3.14 เห็นได้ว่า สารสกัด F60 และ F6090 มีปริมาณสารฟีนอลิกสูงและมีความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัด F90 ที่มีสารฟีนอลิกต่ำกว่า การทดลองให้ผลเช่นเดียวกับ Rao และ Muralikrishna (2006) ที่รายงานว่า สารสกัดอะราบิโนไซแลนที่ละลายน้ำได้ที่มีกรดเพอรูริกเป็นองค์ประกอบจะมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระอยู่สูงจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH นอกจากนี้ Chatchawan และคณะ (2008) รายงาน ค่า  $IC_{50}$  จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH ในสารสกัดจากรำข้าวของข้าวไทยหลากหลายสายพันธุ์ พบว่ามีค่า  $IC_{50}$  ในช่วง 0.38-0.74 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง โดยคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันเนื่องจากสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน สถานที่ในการเพาะปลูกที่แตกต่างกัน ความอุดมสมบูรณ์ วิธีการเก็บรักษา กระบวนการแปรรูป รวมถึงวิธีการสกัดและวิธีการวิเคราะห์

ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระกับขนาดโมเลกุล พบว่า สารสกัดอะราบิโนไซแลนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีสมบัติยับยั้งอนุมูลอิสระสูง Zhou และคณะ (2010) รายงานว่า อะราบิโนไซแลนที่สกัดจากรำข้าวสาลีซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล  $3.252 \times 10^4$  และ  $3.517 \times 10^5$  Da มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของหนูและมีผลต่อกระบวนการ macrophage phagocytosis Cherukuri และ Cheruvanky (2007) พบว่า Non-starchy rice bran polysaccharides ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 4-7 KDa และ 35-45 KDa สามารถใช้เป็นอาหารบำบัดโรคหรืออาหารเฉพาะโรค (Therapeutic diet) สำหรับการลดระดับคอเลสเตอรอล ลดระดับน้ำตาลในเลือด ป้องกันการเกิดโรคเกี่ยวกับไตและป้องกันการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่

อย่างไรก็ตาม สมบัติการต้านอนุมูลอิสระยังขึ้นกับสารประกอบเชิงซ้อนของน้ำตาลกับสารฟีนอลิก เช่น สารประกอบเชิงซ้อนของน้ำตาลกับ  $\alpha$ -tocopherol (Faraji และ Lindsay, 2004), สารประกอบเชิงซ้อนของ chitosan-arabinose และ chitosan-galactose (Mahae, Chalal, and Muhamud, 2011) นอกจากนี้ น้ำตาล fructose, sucrose, raffinose, sorbitol และ mannitol สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารฟีนอลิกซึ่งมีผลต่อการต้านอนุมูลอิสระในน้ำมันปลา (Farali และ Lindsay, 2004) ซึ่งสารสกัดอะราบิโนไซแลนที่สกัดได้จากการทดลองนี้ปริมาณน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์อยู่มากซึ่งสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารฟีนอลิกทำให้มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น

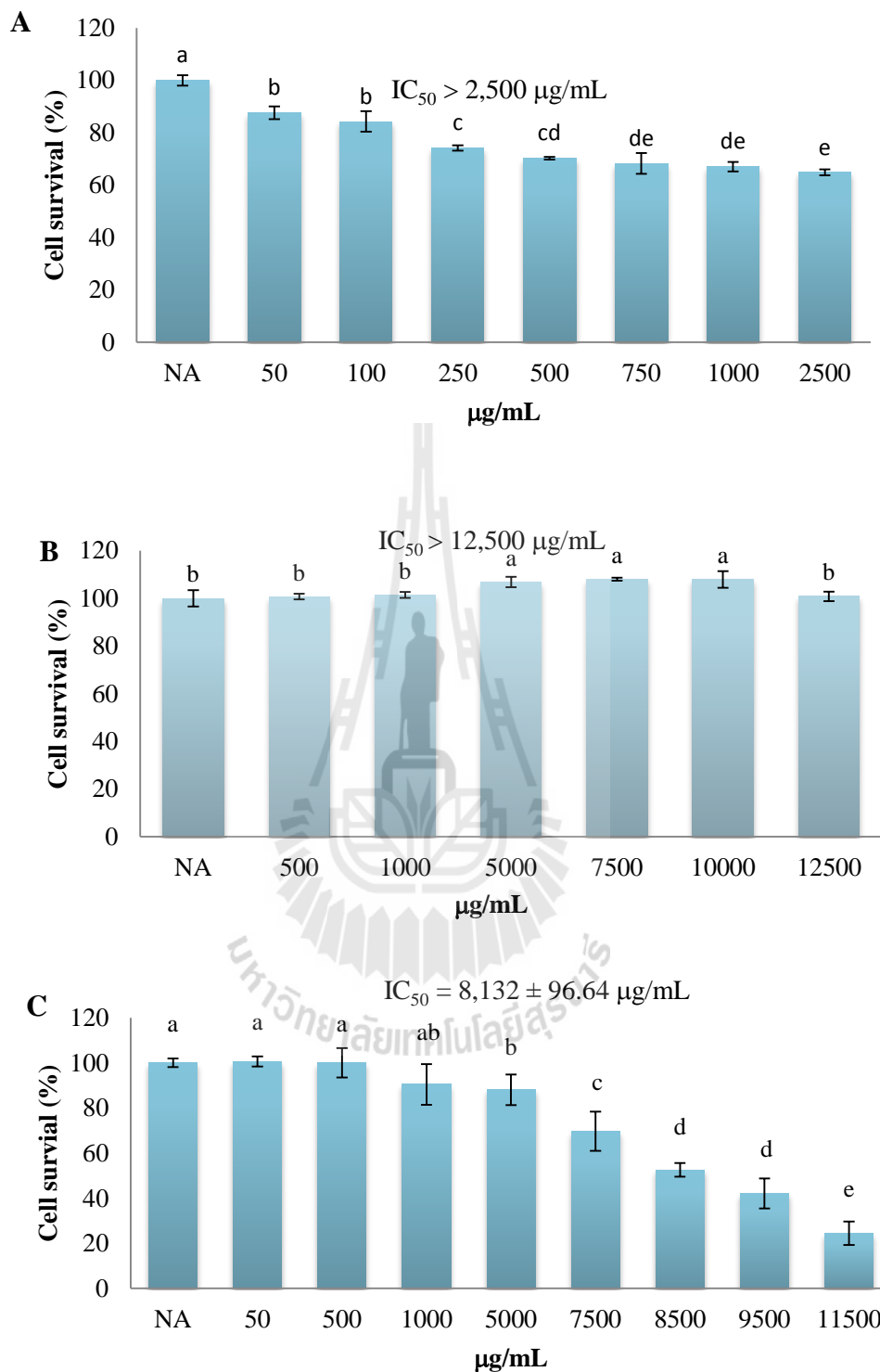
#### 4.4.2. ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระประเมินภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต (Antioxidant capacity as evaluated within a life cell)

##### X 4.4.2.1. ผลของ WUAX ของรำข้าวที่ผ่านการแยกส่วนด้วยเอทานอลต่อการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) HepG2 ประเมินโดยวิธี MTT

การประเมินความเป็นพิษของ WUAX ทั้ง 3 ส่วนต่อเซลล์ HepG2 ด้วยวิธี MTT ผลการทดลองแสดงเป็นค่าร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิต (% cell viability) และค่า  $IC_{50}$  ในรูปที่ 3.3A-3.3C ผลการศึกษาพบว่าแฟรกชัน F60 เหนียวน่าให้เกิดพิษเล็กน้อย โดยที่ความเข้มข้น 50-2,500  $\mu\text{g/mL}$  แฟรกชัน F60 มีผลลดการมีชีวิตของเซลล์ HepG2 ลงประมาณ 12% ถึง 35% ตามลำดับ โดยมีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 2,500  $\mu\text{g/mL}$  (รูป 4.3A) ส่วนแฟรกชัน F6090 ที่ความเข้มข้น 500-12,500  $\mu\text{g/mL}$  ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของ HepG2 ในทางตรงกันข้าม WUAX จากรำข้าวแฟรกชันนี้ ที่ความเข้มข้น 5,000-10,000  $\mu\text{g/mL}$  มีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์เล็กน้อย และมีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 12,500  $\mu\text{g/mL}$  (รูปที่ 3.3B)

แฟรกชัน F90 ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50-1,000  $\mu\text{g/mL}$  ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการรอดชีวิตของเซลล์ (รูปที่ 3.3C) อย่างไรก็ตามในช่วงความเข้มข้น 5,000-11,500  $\mu\text{g/mL}$  แฟรกชัน F90 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ HepG2 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น (dose related manner) ที่ความเข้มข้นดังกล่าวการรอดชีวิตของเซลล์ HepG2 ลดลง 20% ถึง 80% ตามลำดับ นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นสูงๆ แฟรกชัน F90 เป็นพิษต่อ HepG2 มากกว่าแฟรกชัน F6090 ค่า  $IC_{50}$  ของ F90 เป็น  $8,132 \pm 296.4 \mu\text{g/mL}$

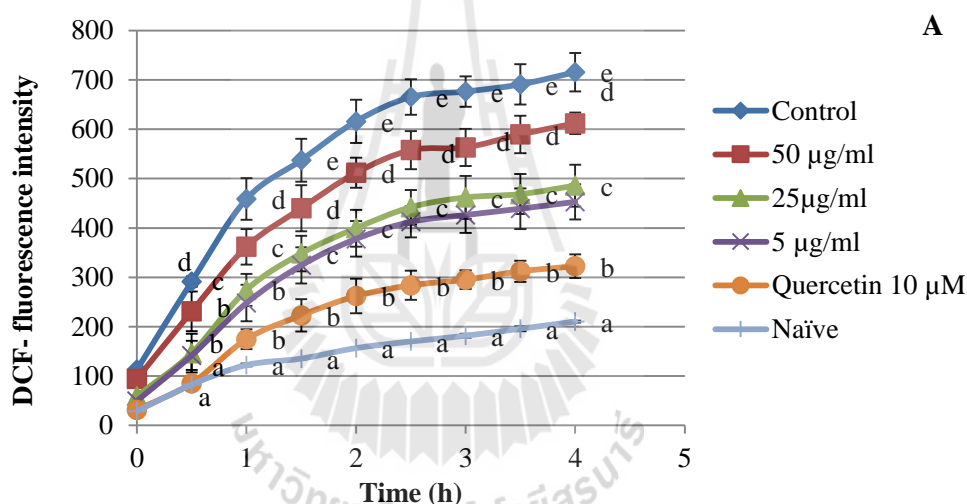
โดยสรุปเป็นพิษของ WUAX จากรำข้าวที่แยกส่วนด้วยเอทานอลต่อเซลล์ HepG2 แตกต่างกันไปในแต่ละแฟรกชัน โดยสามารถเรียงตามลำดับความเป็นพิษได้ดังนี้ F60 > F90 > F6090 จากผลการทดสอบนี้ช่วงความเข้มข้นของแต่ละแฟรกชันที่ไม่เป็นพิษต่อ HepG2 จะถูกเลือกไปใช้ในการประเมินค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ด้วยวิธี DCFH-DA ต่อไป



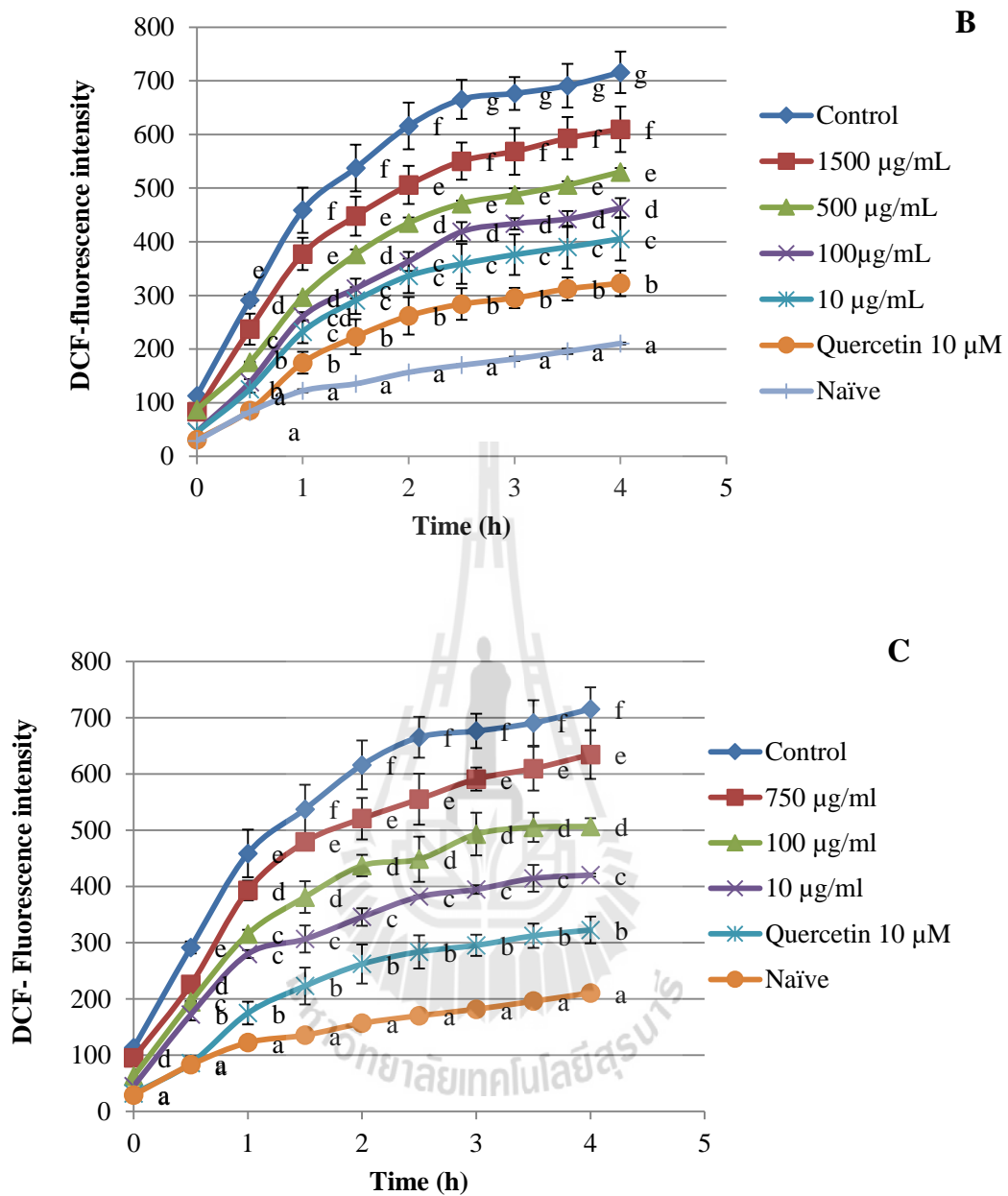
รูปที่ 3.3 ผลของ WUAX จากร้าข้าวที่ผ่านการแยกส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเอทานอลต่อการรอดชีวิต (% cell viability) ของเซลล์ HepG2 เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT assay; F60 (A), F6090 (B), and F90 (C) NA, Naïve; ผลการทดลองแสดงในรูปค่า mean  $\pm$  S.D. (n=3)

#### 4.4.2.2. การลดปริมาณ ROS ภายในเซลล์ (Intracellular ROS scavenging activity)

การศึกษาผลของ WUAX จากรำข้าวทั้ง 3 แพรกชั้นต่อ ROS ภายในเซลล์ตับ hepatocarcinoma HepG2 ของมนุษย์ โดยใช้ quercetin เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ในการทดสอบเซลล์ HepG2 ได้สัมผัสโดยตรงกับ *tert-butyl hydroperoxide* (t-BuOOH) เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ ระดับของ ROS จะถูกวัดโดย DCFH-DA probe โดย DCFH-DA ที่ผ่านเข้าสู่เซลล์จะถูกกำจัดหมู่ acetyl โดยเอนไซม์ esterase ได้เป็น DCFH กระจุก ซึ่งจะถูกเก็บกักอยู่ภายในเซลล์ และเมื่อ DCFH ถูกออกซิไดซ์โดย ROS ก็จะเปลี่ยนเป็น DCF ที่เรืองแสง (Wolfe and Lui, 2007) ดังนั้นการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นของเซลล์จึงแสดงว่ามี ROS เพิ่มขึ้น



รูปที่ 3.4 ผลของ เติมสารสกัด WUAX จากรำข้าวที่ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม ปริมาตร 200 µL บ่มไว้ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และล้างด้วย PBS ปริมาตร 150 µL แล้วเติมสารละลาย DCFH-DA คที่ผ่านการแยกส่วนด้วยเอทานอล ต่อ ระดับของ ROS ภายในเซลล์ HepG2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด ROS ด้วย *t*-BuOOH; F60 (A), F6090 (B) และ F90 (C) วิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA และ DMRT ด้วยโปรแกรม SPSS โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ถูกเหนี่ยวนำ ณ เวลาเดียวกัน โดยข้อมูล ณ เวลาเดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )



**รูปที่ 3.4** ผลของ WUAX จากรำข้าวที่ผ่านการแยกส่วนด้วยเอทานอล ต่อระดับของ ROS ภายในเซลล์ HepG2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด ROS ด้วย *t*-BuOOH; F6090 (B) และ F90 (C) วิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA และ DMRT ด้วยโปรแกรม SPSS โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ถูกเหนี่ยวนำ ณ เวลาเดียวกัน โดยข้อมูล ณ เวลาเดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (ต่อ)

กลไกการเกิดออกซิเดชันของ DCFH ภายในเซลล์ HepG2 โดยอนุมูลอิสระที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นโดย *t*-BuOOH เมื่อมีและไม่มีสารสกัดด้วย WUAX จากรำข้าว แสดงในรูปที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่าการเกิดสารเรืองแสง DCF ในเซลล์ HepG2 ของตัวอย่างควบคุม (vehicle control) เพิ่มขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้น (time dependent manner) จนกระทั่งถึงที่ที่ค่าระดับความเข้มข้นของ DCF-Fluorescence (DCF-Fluorescence intensity) ประมาณ 715.61 ที่เวลา 4 ชั่วโมง การบ่มด้วยสารสกัด WUAX จากรำข้าวทั้ง 3 แพรกชันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนการ ทริตด้วยสารละลาย DCFH-DA มีผลลดความเข้มข้นของ DCF-Fluorescence ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ทุกเวลาที่ศึกษาจาก 0.5 จนถึง 4 ชั่วโมง (รูป 4.4A-4.4C) โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้นต่ำสุดของทุกแพรกชันได้เหนี่ยวนำให้เกิดการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของ ROS และผลนี้ลดลงเมื่อความเข้มข้นสารสกัด WUAX จากรำข้าวเพิ่มขึ้น

ความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลด ROS ของ F60, F6090 และ F90 คือ 5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  และ 10  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ (รูปที่ 3.4A-3.4C) แม้ว่าทุกแพรกชันมีผลอย่างมากในการลด ROS ภายในเซลล์ แต่ความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดของทุกแพรกชันมีประสิทธิภาพน้อยกว่า quercetin ความเข้มข้น 10  $\mu\text{M}$  เล็กน้อย

ความเข้มข้นที่แตกต่างกันของสารสามารถก่อให้เกิดการตอบสนองทางชีวภาพที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจจะอธิบายได้ด้วยหลักการของฮอร์โมนมิซิส (hormesis) ซึ่งเป็นปรากฏการณ์การตอบสนองต่อสารโดยการได้รับสารปริมาณน้อย ๆ มีผลช่วยกระตุ้น (low dose stimulation) แต่จะเกิดการยับยั้งหรือต้านเมื่อได้สารปริมาณมาก (high dose inhibition) ตัวอย่างของฮอร์โมนมิซิสสามารถสังเกตได้จากพารามิเตอร์บางอย่างของการมีสุขภาพดี เช่น อัตราการเจริญเติบโต ความสามารถในการมีลูก (fecundity) และการมีอายุยืนยาว (longevity) หรือการต้านอนุมูลอิสระ (Nielsen, Ostergaard, และ Larsen, 2008) การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าทุกแพรกชันของ WUAX จากรำข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดมีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดปริมาณ ROS และประสิทธิภาพนี้จะไม่เพิ่มขึ้นแต่จะค่อย ๆ ลดลงเมื่อความเข้มข้นของ WUAX จากรำข้าวเพิ่มขึ้น มีรายงานปรากฏการณ์เช่นเดียวกันนี้ของกรด caffeic ที่มีผลเพิ่มระดับ ROS ในเซลล์ไลดน์ HT-1080 fibrosarcoma ของมนุษย์โดยการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นของ DCF (Prasad, Karthikeyan, Karthikeyan, และ Reddy, 2011) รวมทั้งในสารพฤกษเคมี (phytochemicals) ต่าง ๆ ที่ได้จากอาหารที่มาจากธรรมชาติ (Son, Camandola, และ Mattson, 2008) ในธรรมชาตินั้นคุณ สมบัติที่เป็นพิษของสารพฤกษเคมีช่วยป้องกันพืชจากศัตรูพืช และเมื่อมนุษย์บริโภคสารพฤกษเคมีเหล่านี้ในปริมาณที่เหมาะสมจะให้ประโยชน์ต่อสุขภาพ แต่การบริโภคปริมาณมากกลับมีผลกระตุ้นให้เกิดการความเครียดในระดับโมเลกุลของเซลล์ (cellular stress response)

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าอะราบิโนไซแลนส่วนที่ไม่ละลายในน้ำของ รำข้าวซึ่งได้จากย่อยด้วยเอนไซม์ endoxylanase ก่อนนำมาการแยกส่วนโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอลมีศักยภาพสูงในการลด ROS ภายในเซลล์ มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาถึงผลการปกป้องเซลล์ (cytoprotective effects) ของธัญพืชอื่น ๆ Wang, Sun, Cao, และ Tian, (2009) พบว่าโอลิโกแซคคาไรด์ของรำข้าวสาลีที่มีกรดเฟอร์ูริกเป็นองค์ประกอบ (feruloyl oligosaccharides) หลักมีประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์จากภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) โดยการยับยั้งการสูญเสียรีดิวซ์กลูตาไธโอน (reduced glutathione, GSH) การเกิดเปอร์ออกไซด์ของไขมัน (lipid peroxidation) รวมทั้งมีผลลด methaemoglobin และการเกิดคาร์บอนิล (carbonyl group) จากโปรตีน โดยที่ความเข้มข้น 10–500  $\mu\text{mol/L}$  พบว่าโอลิโกแซคคาไรด์ของรำข้าวสาลีที่มีกรดเฟอร์ูริกเป็นองค์ประกอบไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocytes) ทั้งแบบ cytotoxicity และ genotoxicity นอกจากนี้ที่ความเข้มข้น 500  $\mu\text{mol/L}$  ยังช่วยยับยั้งความเสียหายที่เกิดจาก  $\text{H}_2\text{O}_2$  ต่อ DNA ของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ถึง 91.1% (Wang, Sun, Cao, Song, และ Tian, 2008) Ghoneum และ Maeda, (1996) รายงานว่าโพลีแซคคาไรด์จากรำข้าวที่ผลิตโดยการสกัดด้วยเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วยไซโลสและอะราบิโนเป็นส่วนประกอบหลักแสดงคุณสมบัติเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory properties) โดยการส่งเสริมกิจกรรมของ NK ในผู้ป่วย

ในการศึกษาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี CAA assay นั้นมีความเป็นไปได้สองทางที่สารใดๆ จะมีผลในการต้านอนุมูลอิสระคือโดยการตัดวงจรปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิด peroxy radical ที่เชื่อมเซลล์ หรือโดยการที่สารสามารถผ่านเข้าไปภายในเซลล์และทำปฏิกิริยากับ ROS ภายในเซลล์ ดังนั้นจึงคล้ายกับว่าประสิทธิผล (efficacy) ในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่ทดสอบขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพ (efficiency) ในการดูดซึมสารของเซลล์และ/หรือประสิทธิภาพของสารในการเกาะติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ (Yokomizo และ Moriwaki, 2006) ข้อมูลจากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าแฟรกชัน F6090 ซึ่งประกอบด้วยกรดฟีนอลิกชนิดอิสระ (free phenolic acids) และชนิดยึดเหนี่ยว (bound phenolic acids) มากกว่าอีกสองแฟรกชันที่ระดับ 59,479.2 และ 67,626.1  $\mu\text{g/g}$  ตามลำดับ (ตารางที่ 3.9 และ 3.10) มีค่า FRAP values สูงที่สุดเป็น 896.1  $\mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{g}$  และค่า  $\text{EC}_{50}$  ของ DPPH ต่ำที่สุด (389.5  $\mu\text{g/mL}$ , ตารางที่ 3.14) ผลการศึกษาโดยวิธี CAA assay แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกของแฟรกชัน F6090 สามารถผ่านเข้าไปภายในเซลล์และ/หรือถูกดูดซับโดยเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงสามารถทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระภายในระบบชีวภาพได้

ในการทดสอบด้วยวิธี CAA assay นอกเหนือจากทั้งสองโอกาสที่สารจะมีผลในการต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวมาแล้ว คุณสมบัติอื่น ๆ ของสารพฤกษเคมี (phytochemicals) ก็มี



ผลต่อประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) ด้วย โดย ส่วนประกอบโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกมีบทบาทสำคัญในการปกป้องเซลล์จากความเครียดออกซิเดชัน เช่น โครงสร้างส่วน 3',4'-hydroxyl groups ใน B ring และส่วนของ 2,3-double bond ที่รวมอยู่กับ 4-oxo group ใน C ring ของ quercetin ที่มีผลทำให้ quercetin เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทรงพลังมากในการปกป้องเซลล์จากความเครียดออกซิเดชัน ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้น โดย  $H_2O_2$  (Wang และ Joseph, 1999) สำหรับ Hydroxybenzoic acid และ hydroxycinnamic acid ซึ่งโครงสร้างประกอบด้วยวงแหวน phenyl ring เพียงหนึ่งวงแหวนนั้นมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่า quercetin โดยคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบทั้งสองเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของ hydroxyl group ในการเป็น hydrogen donor ที่มีศักยภาพในการลดความหนาแน่นของอิเล็กตรอนของ carboxyl group ที่ติดอยู่กับ aromatic ring (Soobrattee, Neergheen, Luximon-Ramma, Aruoma, และ Bahorun, 2005)

ผลการทดสอบด้วย CAA assay แสดงให้เห็นว่า WUAX จากรำข้าวทั้ง 3 แพรกชั้นมีผลลดปริมาณ ROS เช่นเดียวกันถึงแม้ว่าจะมีโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน Zhou *et al.* (2010) ได้ศึกษาผลของอะราบีโนไซแลนจากรำข้าวสาลีซึ่งสกัดด้วยการใช้ด่าง (alkaline-extracted AX, AXA) และใช้เอนไซม์ (enzyme-extracted AX, AXE) พบว่าการสกัดด้วยด่างให้อะราบีโนไซแลนที่มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่า (4.10%) การสกัดด้วยเอนไซม์ (9.85%) รวมทั้งไม่พบกรดเพอรูริก อัตราส่วนของอะราบีโนสต่อไซโลสสำหรับ AXA และ AXE เป็น 0.83 และ 0.56 และมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น  $3.517 \times 10^5$  Da และ  $3.252 \times 10^4$  Da ตามลำดับ และพบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างอะราบีโนไซแลนทั้งสองแบบในการเสริมสร้างการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาว (lymphocyte proliferation) ในทำนองเดียวกัน Cherkuri และ Cheruvanky (2007) พบว่าโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งจากรำข้าวซึ่งผลิตโดยสกัดด้วยด่างมีผลเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง และมีผลต้านไวรัส (anti-viral effects) โพลีแซคคาไรด์นี้ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนใหญ่ (92.4 mole%) และส่วนที่เหลือเป็นอะราบีโนและไซโลส (5.2 และ 1.9 mole% ตามลำดับ)

Frenzel, Richter และ Eschrich, (2002) ได้รายงานว่าน้ำตาลฟรุคโตส มีคุณสมบัติในการลด ROS ด้วยเช่นกัน โดยมีผลยับยั้งกระบวนการอะพอพโตซิส (apoptosis) ของเซลล์ตับหนูซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นโดยกระบวนการ reoxygenation ผ่านกระบวนการรักษาเสถียรภาพของกลูตาไธโอน (stabilization of the glutathione pool) Bland, Keshavarz, และ Bucke (2004) รายงานว่าโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีระดับของพอลิเมอร์ (degree of polymerization) มากกว่า 6

มีแนวโน้มที่จะสร้างโครงสร้างแบบเฮลิค (helical structures) ซึ่งเป็นรูปแบบโครงสร้างที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในกรณีที่มีอิทธิพลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

จากผลการทดสอบ WUAX จากรำข้าวที่แยกส่วนด้วยเอทานอลด้วย CAA assay ประกอบกับรายงานข้างต้นนั้นดูเหมือนว่าโครงสร้างของน้ำตาลส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติการทำงานของ WUAX จากรำข้าว Oku et al, (2003) ได้ตรวจสอบกลไกการทำงานด้านอนุมูลอิสระของทรีฮาโลส (trehalose) ด้วย NMR และเคมีควอนตัม และพบว่าหนึ่งโมเลกุลทรีฮาโลสทำปฏิกิริยาแบบสโตยชิโอเมตริก (stoichiometrically interact) กับ 1 โมเลกุลของพันธะคู่แบบซิสของโอเลฟิน (cis-olefin double bond) ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว แบบจำลองคอมพิวเตอร์แสดงให้เห็นว่าเกิดโครงสร้างที่ซับซ้อนและเสถียรขึ้นระหว่างทรีฮาโลสกับพันธะคู่ของโอเลฟินผ่านทางพันธะไฮโดรเจนแบบ  $\text{OH}\cdots\pi$  and  $\text{CH}\cdots\text{O}$  นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของพลังงานกระตุ้นที่ใช้ในปฏิกิริยาสกัดไฮโดรเจน (hydrogen abstraction reaction) ออกจากหมู่เมทิลีน (methylene group) สองโมเลกุลที่อยู่ระหว่างพันธะคู่ที่ทำปฏิกิริยากับ โมเลกุลของทรีฮาโลส ดังนั้นทรีฮาโลสจึงมีผลลดการออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวผ่านทางเกิดพันธะชนิดอ่อน (weak interaction) กับพันธะคู่

เมื่อพิจารณาผลการศึกษาของ Zhou et al. (2010); Bland et al. (2004) และ Oku et al. (2003) ดังที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่ารูปแบบและลักษณะโครงสร้าง 3 มิติ (conformational characteristics) ของน้ำตาลมีผลต่อคุณสมบัติในการทำหน้าที่ยของน้ำตาล Dervilly-Pinel, Thibault, และ Saulnier (2001) ได้ศึกษาลักษณะโครงสร้างของอะราบีโนไซแลนชนิดละลายน้ำได้ของแป้งสาลิที่ผ่านการกำจัดกรดเฟอร์ริก (deferuloylated) แยกเป็นแฟรกชัน และทำให้บริสุทธิ์โดย HPSEC ได้ทั้งหมด 48 แฟรกชันซึ่งมีดัชนี polydispersity ต่ำ พบว่าทั้ง 48 แฟรกชัน มีลักษณะโครงสร้าง 3 มิติ (persistence length  $q$ , hydrodynamic parameter  $n$  and Mark-Houwink exponent  $a$ ) คล้ายคลึงกันและเข้าได้กับลักษณะโครงสร้าง 3 มิติแบบ semi-flexible ไม่ว่าลักษณะโครงสร้าง (structural characteristics) ของแต่ละแฟรกชันจะเป็นแบบใดก็ตาม และระดับการแทนที่ (Substitution degree) ของโครงสร้างไซแลน (xylan backbone) ด้วยอะราบีโนสไม่มีผลใดๆ ต่อโครงสร้าง 3 มิติของอะราบีโนไซแลน

ความมีขั้วของสารเป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญ การศึกษาของ Crespy, et al. (2003) ในหนูแรทพบว่าการเคลื่อนย้ายฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ผ่านวิลไลขนาดเล็กหรือบรชบอร์ด (brush border) ของลำไส้เล็กเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติด้านความชอบและละลายได้ดีในน้ำมัน (lipophilicity) มากกว่าคุณสมบัติด้านการเรียงตัวของคาร์บอนอะตอม (spatial conformation) ฟลาโวนอยด์ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) อาจจะถูกตรึง (embedded) อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์

ได้อย่างลึกซึ้ง ซึ่งมีผลต่อความเป็นของไหล (membrane fluidity) ของเยื่อหุ้มเซลล์และการทำลายปฏิกิริยาออกซิเดชันของปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้น ณ เยื่อหุ้มเซลล์ได้ส่วนประกอบที่มีไขมันมากกว่าจะทำให้ปฏิกิริยากับผิวหน้าของเยื่อหุ้มเซลล์ผ่านพันธะไฮโดรเจน และการปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์จากความเครียดออกซิเดชันทั้งจากภายในและภายนอกเซลล์จะเกิดขึ้นที่ ผิวหน้าของเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นฐานได้ว่าสารพฤกษเคมีที่อยู่ในกลุ่มอื่นๆ ซึ่งมีคุณสมบัติทางกาย เช่นเดียวกับกับฟลาโวนอยด์จะทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์เช่นเดียวกัน (Oteizai, Erlejman, Verstraeten, Keen และ Fraga 2005) และนี่อาจจะเป็นเหตุผลที่ว่าทำไมแฟรกชัน F90 จึงมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระทั้งที่แฟรกชันนี้ประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิกน้อยกว่าแฟรกชันอื่นๆ แต่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำสูงกว่าแฟรกชันอื่นๆ

Wolfe and Lui (2007) เปิดเผยว่าการทดสอบ CAA ด้วยโปรโตคอลที่แตกต่างกันคือการล้างหรือไม่ล้างด้วย PBS ก่อนขั้นตอนการเติมสารละลาย DCFH-DA มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารแตกต่างกัน เช่น กรดแกลลิก (gallic acid) วิตามินซี และกรดคาเฟอิก (caffeic acid) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงอย่างมากเมื่อมีการล้างด้วย PBS ในขณะที่การล้างหรือไม่ล้างด้วย PBS มีผลต่อเคอควิซิน (quercetin) น้อยมาก ในการศึกษาของเราครั้งนี้ดำเนินการทดลองโดยใช้โปรโตคอลที่มีการล้างด้วย PBS ดังนั้นจึงอาจมีผลกระทบอย่างใดอย่างหนึ่งโดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อแฟรกชัน F90 ซึ่งประกอบด้วยกรดคาเฟอิกชนิดอิสระมากกว่าแฟรกชันอื่นๆ

จากผลการทดสอบสหสัมพันธ์ที่พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมากระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของ WUAX จากรำข้าวที่แยกส่วนโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล กับความสามารถในการรีดิวซ์โดยวิธี FRAP ( $r = 0.914$ ) และ EC50 ของ DPPH ( $r = -0.897$ ) นอกจากนี้ผลการทดสอบด้วย CAA assay ยังแสดงให้เห็นว่าแฟรกชันที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการยับยั้งการผลิต ROS คือ F60 ซึ่งเป็นแฟรกชันที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าแฟรกชันอื่นๆ ดังนั้นจึงคล้ายกับว่าจำนวนมวล/โมล (Molar mass) เกี่ยวข้องต่อความสามารถในการลดอนุมูลอิสระ ในความเป็นจริงมีรายงานหลายฉบับที่เปิดเผยถึงผลของน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) และขนาดโมเลกุล (molecular size) ของอะราบิโนไซแลนจากธัญพืช และโอลิโกแซคคาไรด์อื่น ๆ ในการต้านอนุมูลอิสระและคุณสมบัติด้านภูมิคุ้มกันบำบัด (immune therapy properties) Zhou *et al.* (2007) รายงานว่าอะราบิโนไซแลนจากรำข้าวสาเล่ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล  $(3.252 \times 10^4 \text{ Da})$  ต่ำกว่าอะราบิโนไซแลนที่ได้จากการย่อยด้วยต่าง 10 เท่ามีผลเพิ่มเซลล์แมโครเฟจ (macrophage) และฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) รวมทั้งลดภาวะภูมิไวเกิน (hypersensitivity reaction) ได้มากกว่าอะราบิโนไซแลนที่ได้จากการย่อยด้วยต่าง

การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโอลิโกแซคคาไรด์หลายชนิดซึ่งมีระดับ degree of polymerization (DP) แตกต่างกัน พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโอลิโกแซคคาไรด์ของอะกาโรส (agaro-oligosaccharides) มีความสัมพันธ์กับระดับ DP ซึ่งเกี่ยวข้องกับการช่วยเพิ่มการมีชีวิตของเซลล์ และโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดคือ agaro-hexaose เมื่อเทียบกับ agaro-biose agaro-tetraose และ agaro-decaose (Chen and Yan, 2005) Bland, Keshavarz, และ Bucke (2004) รายงานว่าผลการทดสอบกับ manno-oligosaccharides (DP 5-7) และ arabino-oligosaccharides (DP 6-8) พบว่าโอลิโกแซคคาไรด์เหล่านี้มีแนวโน้มที่จะสามารถยับยั้งการผลิต ROS เพิ่มขึ้นเมื่อมี DP มากขึ้น และพบว่าโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีระดับ DP มากกว่า 6 ซึ่งมีแนวโน้มที่จะสร้างโครงสร้างแบบเฮลิคัล (helical structures) มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการมีอิทธิพลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย นอกจากนี้ยังพบผลเช่นเดียวกันนี้ใน manno-oligosaccharides ที่ได้จาก locust bean gum และ arabino-oligosaccharides อีกด้วย (Bland, 2002) โพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายทะเล sargassum ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 50,000 Da และประกอบด้วย furanopolysaccharide ซึ่งมี กาแลคโตส, ไซโลส, อะราบีโนส, กลูโคส, แรมโนส และฟรุกโตส เป็นองค์ประกอบมีผลยับยั้งความเครียดออกซิเดชันโดยการเพิ่มปริมาณของรีดิวซ์กลูตาไธโอน เพิ่มกิจกรรมของ superoxide dimutase และ glutathione peroxidase และลดระดับของ ROS ในเซลล์เม็ดเลือดขาว bursal (bursal lymphocytes) ของไก่ อินฟราเรดสเปกตรัมแสดงให้เห็นในโครงสร้างโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์ sargassum ว่ามีพันธะ  $\beta$ -glycosidic อยู่ในโมเลกุล รวมทั้งพบพิกที่ค่าการดูดกลืนแสงตรงกับ  $\alpha$ -D-galactopyranosyl (Zhanga, Hua, Liua, and Shuai, 2011) (Zhanga, หัวหิน, Liua และ Shuai 2011)

## บทที่ 5

### บทสรุป

การสกัดอะราบิโนไซแลนส่วนที่สกัดไม่ได้ด้วยน้ำ (water unextractable arabinoxylans, WUAX) จากรำข้าว สามารถสกัดได้โดยการให้ความร้อนภายใต้แรงดันหรือการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ เอนโดไซแลนเนส (endoxylanase) จาก *Bacillus subtilis* 5 ยูนิตเป็นเวลา 4 ชั่วโมง สารสกัดจากรำข้าวอุดมไปด้วยกรดฟีนอลิกชนิดเหนียวมากกว่ากรดฟีนอลิกอิสระ ซึ่งโดยส่วนใหญ่เป็นกรดเฟอร์ริกและกรดฟีเคอูริก การตกตะกอนในเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ สามารถสกัดอะราบิโนไซแลนที่มีขนาดโมเลกุลต่างกันออกมา 3 ส่วนตามความเข้มข้นของเอทานอล โดยสารสกัดจากเอทานอลเข้มข้น 0-60% (F60) มีน้ำหนักโมเลกุล  $5.786 \times 10^4$  กรัมต่อโมล สารสกัดจากเอทานอลเข้มข้น 60-90% (F6090) มีน้ำหนักโมเลกุล  $4.137 \times 10^4$  กรัมต่อโมล และสารสกัดจากเอทานอลเข้มข้นมากกว่า 90% (F90) มีน้ำหนักโมเลกุล  $1.525 \times 10^3$  กรัมต่อโมล สารสกัดอะราบิโนไซแลนมีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลักและมีน้ำตาลอะราบิโนสเป็นองค์ประกอบรอง นอกจากนี้ น้ำตาลมโนแซ็กคาไรด์ยังมีกรดเฟอร์ริกในรูปแบบยึดเหนี่ยวเป็นองค์ประกอบ แสดงให้เห็นว่าอะราบิโนไซแลนจากรำข้าวเป็นแหล่งของ feruloylated arabinoxylans โครงสร้างโมเลกุลของอะราบิโนไซแลนเป็นแบบกิ่งก้าน โดยมีสายโซ่หลักของน้ำตาลไซโลสและมีกิ่งก้านของน้ำตาลอะราบิโนสที่มาแทนที่ที่ตำแหน่ง C-(O)-3 ของน้ำตาลไซโลสเป็นส่วนมาก มีการแทนที่ที่ตำแหน่ง C-(O)-2 และมีการแทนที่ตำแหน่ง C-(O)-2 และ C-(O)-3 ในบางโมเลกุลของน้ำตาลไซโลส โดยมีระดับการแทนที่มากกว่า 90% ในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดจาก F60 และ F6090 มี Feruloylated arabinoxylans สูง ทำให้มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูง ทั้งจากการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในหลอดทดลอง (in vitro) ด้วยวิธี DPPH และ FRAP และจากความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระประเมินภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต ทั้งนี้สารสกัดจาก F60 และ F90 ยังประกอบด้วยอะราบิโนไซแลนปริมาณมาก จึงอาจกล่าวได้ว่ากรดฟีนอลิกชนิดยึดเหนี่ยว จำนวนมวล/โมล และอะราบิโนไซแลนเป็นปัจจัยหลักที่ช่วยสนับสนุนการต้านอนุมูลอิสระ สำหรับสารสกัด F90 นั้นมีสารประกอบฟีนอลิก และจำนวนมวล/โมลน้อยกว่าสารสกัด F60 และ F6090 ทำให้มีความสามารถต้านออกซิเดชันในหลอดทดลอง (in vitro) ต่ำกว่าสารสกัด F60 และ F6090 อย่างไรก็ตาม สารสกัด F90 มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำและมีโมเลกุลขนาดเล็ก ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญต่อการถูกตรึงอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้สารสกัด F90 มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระในระดับเซลล์เมื่อทดสอบด้วยวิธี DCFH DA

จากผลงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าอะราบิโนไซแลนจากรำข้าวมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูง อุปกรณ์และวิธีการสกัดไม่ยุ่งยากซับซ้อน และมีค่าใช้จ่ายต่ำ ดังนั้น การผลิตอะราบิโนไซแลนจากรำข้าวจะเป็นยกระดับจากการแปรรูปรำข้าวเพื่อส่งออก ให้เป็นการแปรรูปรำข้าวในเชิงอุตสาหกรรมได้ในอนาคต



## บรรณานุกรม

- Asres, D. D., and Perreault, H. (1997). Monosaccharide permethylation products for gas chromatography-mass spectrometry: how reaction conditions can influence isomeric ratios. **Canadian Journal of Chemistry**. 75: 1385–1392.
- Aherne, S. A., and O'Brien, M. N. (2000). Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide and menadione induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells. **Free Radical Biology and Medicine**. 29: 507–514.
- Andreasen, M. F., Landbo, A. K., Christensen, L. P., Hansen, A., and Meyer, S. (2001). Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49: 4090–4096.
- Adom, K. K., and Liu, R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50: 6182–6187.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., Berker, K. I., and Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. **Molecules**. 12: 1496–1547.
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D., and Edelstein, S. (1996). **Protein Methods**. New York: John Wiley & Sons. 415 p. pp. 57–81.
- Benzie, I. F. F., and Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**. 239: 70–76.
- Benzie, I. F. F., and Szeto, Y. T. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 47: 633–636.
- Babior, B. M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**. 109: 33–44.
- Bland, E. J., Keshavarz, T., and Bucke, C. (2004). The influence of small oligosaccharides on the immune system. **Carbohydrate Research**. 339: 1673–1678.

- Beaugrand, J., Chambat, G., Wong, V. W., Goubet, F., Rémond, C., Paës, G., Benamrouche, S., Debeire, P., O'Donohue, M., and Chabbert, B. (2004). Impact and efficiency of GH10 and GH11 thermostable endoxylanases on wheat bran and alkali-extractable arabinoxylans. **Carbohydrate Research**. 339: 2529–2540.
- Barakat, A., Putaux, J. L., Saulnier, L., Chabbert, B., and Cathala, B. (2007). Characterization of arabinoxylan-dehydrogenation polymer (synthetic lignin polymer) nanoparticles. **Biomacromolecules**. 8: 1236–1245.
- Butsat, S., and Siriamornpun, S. (2010). Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. **Food Chemistry**. 119: 606–613.
- Biotium, Inc. (2010). Apoptosis assay kit CF488A-annexin V and PI (Propidium Iodide) catalog number: 30061. [On-line]. Available: [http:// www.biotium.com](http://www.biotium.com).
- Ciucanu, I., and Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**. 131: 209–217.
- Chaplin, M. F., and Kennedy, J. F. (ed.). (1994). **Carbohydrate analysis a practical approach**. (2nd ed.). New York: Oxford University press.
- Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Cotelle, N., Vezin, H., Demigne, C., and Remesy, C. (2003). The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*. 284(6): G980–G988.
- Chen, H., and Yan, X. (2005). Antioxidant activities of agaro-oligosaccharides with different degrees of polymerization in cell-based system. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1722: 103–111.
- Cheng, J.-C., Dai, F., Zhou, B., Yang, L., and Liu, Z.-L. (2007). Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: Mechanism and structure-activity relationship. **Food Chemistry**. 104: 132-139.
- Chen, H., Yan, X., Mai, T., Wang, F., and Xu, W. (2009).  $\lambda$ -Carrageenan oligosaccharides elicit reactive oxygen species production resulting in mitochondrial-dependent apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. **International Journal of Molecular Medicine**. 24: 801–806.



- Chotimarkorn, C., Benjakul, S., and Silalai, N. (2008). Antioxidant components and properties of five long-grained rice bran extracts from commercial available cultivars in Thailand. **Food Chemistry**. 111: 636–641.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Pebers, P. A., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**. 28: 350–356.
- Diaz, M. N., Frei, B., Vita, J. A., and Keaney, J. F. Jr. (1997). Antioxidants and Atherosclerotic Heart Disease. **The New England Journal of Medicine**. 337: 408–416.
- Dervilly-Pinel, G., Thibault, J-F., and Saulnier, L. (2001). Experimental evidence for a semi-flexible conformation for arabinoxylans. **Carbohydrate Research**. 330: 365–372.
- Devi, R. R., and Arumugan, C. (2007). Antiradical efficacy of phytochemical extracts from defatted rice bran. **Food and Chemical Toxicology**. 45: 2014–2021.
- Eklund, P. C., Langvik, O. K., Warna, J. P., Salmi, T. O., Willfor, S. M., and Sjöholm, R. E. (2005). Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. **Organic and Biomolecular Chemistry**. 3: 3336–3347.
- Ergun, B. C., Coban, T., Onurdag, F. K., and Banoglu, E. (2012). Synthesis, antioxidant and antimicrobial evaluation of simple aromatic esters of ferulic acid. **Archives of Pharmacal Research**. 34(8): 1251-1261.
- Frenzel, J., Richter, J., and Eschrich, K. (2002). Fructose inhibits apoptosis induced by reoxygenation in rat hepatocytes by decreasing reactive oxygen species via stabilization of the glutathione pool. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**. 1542: 82–94.
- Farali, H., and Lindsay, R. (2004). Characterization of the antioxidant activity of sugars and polyhydric alcohols in fish oil emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52: 7164–7171.
- Ghoneum, M., and Gollapudi, S. (2003). Modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) sensitizes human T cell leukemia cells to death receptor (CD95)-induced apoptosis. **Cancer Letters**. 201: 41–49.
- Goffman, F. D., and Goffman, C. J. (2004). Rice kernel phenolic content and its relationship with antiradical efficiency. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 84: 1235–1240.

- Ghoneum, M., Hamilton, J., and Gollapudi, S. (2004). Modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/biobran), potentiates chemotherapy-induced apoptosis in human breast cancer cells. **The Journal of Nutrition**. 134: 3541S.
- Garcia, A. L., Otto, B., Reich, S. C., Weickert, M. O., Steiniger, J., Machowetz, A., Rudovich, N. N., Möhlig, M., Katz, N., Speth, M., Meuser, F., Doerfer, J., Zunft, H. J., Pfeiffer, A. H., and Koebnick, C. (2007). Arabinoxylan consumption decreases postprandial Serum glucose, serum insulin and plasma total ghrelin response in subjects with impaired glucose tolerance. **European Journal of Clinical Nutrition**. 61: 334–34.
- Gollapudi, S., and Ghoneum, M. (2008). MGN-3/Biobran, modified arabinoxylan from rice bran, sensitizes human breast cancer cells to chemotherapeutic agent, daunorubicin. **Cancer Detection and Prevention**. 32: 1–6.
- Gulcin, I., Buyukokuroglu, M. E., and Kufrevioglu, O. I. (2003). Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. **Journal of Pineal Research**. 34: 278–281.
- Halliwell, B., and Aruoma, O. I. (1991). DNA damage by oxygen-derived species its mechanism and measurement in mammalian systems. **Federation of European Biochemical Societies**. 282 (1.2): 9–19.
- Horwitz, W. (ed.). (2000). **Official methods of analysis of AOAC international**. Maryland: AOAC International.
- Huang, D., Ou, B., and Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53: 1841–1856.
- Izydorczyk, M. S., and Biliaderi, C. G. (1995). Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**. 28: 33–48.
- Ishii, T. (1997). Structure and functions of feruloylated polysaccharides. **Plant Science**. 127: 111–127.
- Iqbal, S., Bhanger, M. I., and Anwar, F. (2005). Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. **Food Chemistry**. 93: 265–272.
- Izydorczyk, M. S., and Dexter, J. E. (2008). Barley  $\beta$ -glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products—a Review. **Food Research International**. 41: 850–868.

- Jung, E., Kim, S., Hwang, I., and Ha, T. (2007). Hypoglycemic effects of a phenolic acid fraction of rice bran and ferulic acid in C57BL/KsJ-*db/db* mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 55: 9800–9804.
- Jain, S., and Yadav, H. (2010). MTT assay cell viability [On-line]. Available: <http://www.protocol-online.org>.
- Katapodis, P., Vadaou, M., Kalogeris, E., Kekos, D., Macris, B. J., and Christakopoulos, P. (2003). Enzymic production of a feruloylated oligosaccharide with antioxidant activity from wheat flour arabinoxylan. **European Journal of Nutrition**. 42: 55–60.
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., and Taniguchi, H. (2002). Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50: 2161–2168.
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., and Taniguchi, H. (2002). Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50: 2161–2168.
- Kennedy, G., Spence, V. A., McLaren, M., Hill, A., Underwood, C., and Belch, J. J. F. (2005). Oxidative stress levels are raised in chronic fatigue syndrome and are associated with clinical symptoms. **Free Radical Biology and Medicine**. 39: 584–589.
- Kurata, R., Adachi, M., Yamakawa, O., and Yoshimoto, M. (2007). Growth suppression of human cancer cells by polyphenolics from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 55: 185–190.
- Luh, B. S. (1991). **Rice utilization** (Vol. II) (2<sup>nd</sup> ed.). New York: Van Nostrand Reinhold.
- Lequart, C., Nuzillard, J.-M., Kurek, B., and Debeire, P. (1999). Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides. **Carbohydrate Research**. 319: 102–111.
- Li, Y. L., Gan, G. P., Zhang, H. Z., Wu, H. Z., Li, C. L., Huang, Y. P., Liu, Y. W., and Liu, J. W. (2007). A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. Rhizome *in vitro* anticancer effects on human cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**. 113: 115–124.
- Luangwitthajaroen, Y., Siralertmukul, K., and Nimmannit, U. (2007). Congress on Science and Technology of Thailand. No. 33.

- Maes, C., and Delcour, J. A. (2002). Structural Characterisation of water-extractable and water-unextractable arabinoxylans in wheat bran. **Journal of Cereal Science**. 35: 315–326.
- Maes, C., Vangeneugden, B., and Delcour, J. A. (2004). Relative activity of two endoxylanases towards water-unextractable arabinoxylans in wheat bran. **Journal of Cereal Science**. 39: 181–186.
- Mattila, P., Mattipihlav, J., and Hellstrom, J. (2005). Contents of phenolic acids, alkyl and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53: 8290–8295.
- Madhujith, T., and Shahidi, F. (2009). Antioxidant potential of barley as affected by alkaline hydrolysis and release of insoluble-bound phenolics. **Food Chemistry**. 117: 615–620.
- Maha, N., Chalot, C., and Muhamud, P. (2011). Antioxidant and antimicrobial properties of chitosan-sugar complex. **International Food Research Journal**. 18(4): 1543–1551.
- Moure, A., Gullon, P., Dominguez, H., and Parajo, J. C. (2006). Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. **Process Biochemistry**. 41: 1913–1923.
- Moers, K., Celus, I., Brijs, K., Courtin, C., and Delcour, J. (2005). Endoxylanase substrate selectivity determines degradation of wheat water-extractable and water-unextractable arabinoxylan. **Carbohydrate Research**. 340: 1319–1327.
- Moongngarm, A., Daomukda, N., and Khumpika, S. (2012). Chemical compositions, phytochemicals, and antioxidant capacity of rice bran, rice bran layer, and rice germ. **APCBEE Procedia**. 2: 73-79.
- Mueller-Harvey, I., and Hartley, R. D. (1986). Linkage of *p*-coumaroyl and feruloy groups to cell-wall polysaccharides of barley straw. **Carbohydrate Research**. 148 (1): 71–85.
- Nardini, M., D'acquino, M., Tomassi, G., Gentili, V., Ifelice, M., and Scaccini, C. (1995). Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation caffeic acid and other hydroxycinnamic acid and derivatives. **Free Radical Biology and Medicine**. 19(5): 541–552.
- Niki, E. (2002). Antioxidant activity: Are we measuring it correctly?. **Nutrition**. 18: 524–525.
- Noaman, E., El-Din, N. K. B., Bibars, M. A., Mossallam, A. A. A., and Ghoneum, M. (2008). Antioxidant potential by arabinoxylan rice bran, MGN-3/biobran, represents a

- mechanism for its oncostatic effect against murine solid Ehrlich carcinoma. **Cancer Letters**. 268: 348–359.
- Nielsen, E., Ostergaard, G., and Larsen, J. C. (2008). **Toxicological risk assessment of chemicals: a practical guide**. Informa health care USA, Inc., New York. p. 86–196.
- Ohta, T., Yamasaki, S., Egaehira, Y., and Sanada, H. (1994). Antioxidative activity of corn bran hemicellulose fragments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 42: 653–656.
- Ohta, T., Semboku, N., Kuchii, A., Egashira, Y., and Sanada, H. (1997). Antioxidant activity of corn bran cell-wall fragments in the LDL oxidation system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 45: 1644–1648.
- Oku, K., Watanabe, H., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M., Tsujisaka, Y., Komori, M., Inoue, Y., and Sakurai, M. (2003). NMR and Quantum Chemical Study on the OH••pi and CH••O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: Implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose. **Journal of American Chemical Society**. 125: 12739–12748.
- Ordaz-Ortiz, J. J., Devaux, M.-F., and Saulnier, L. (2005). Classification of wheat varieties based on structural features of arabinoxylans as revealed by endoxylanase treatment of flour and grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53: 8349-8356.
- Oteiza, P. I., Erlejman, A. G., Verstraeten, S. V., Keen, C. L., and Fraga, C. G. (2005). Flavonoid-membrane interactions: a protective role of flavonoids at the membrane surface. **Clinical and Developmental Immunology**. 12 (1): 19–25.
- Office of Agricultural Economics. (2010). Rice production [On-line]. Available: [http://www.oae.go.th/main.php?filename=agri\\_production](http://www.oae.go.th/main.php?filename=agri_production)
- Oteizai, P. I., Erlejman, A. G., Verstraeten, S. V., Keen, C. L., and Fraga, C. G. (2005). Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface. **Clinical & Developmental Immunology**. 12(1):19–25.
- Prior, R. L., WU, X., and Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53: 4290–4302.

- Price, R. K., Welch, R. W., Lee-Manion, A. M., Bradbury, I., and Strain, J. J. (2008). Total phenolics and antioxidant potential in plasma and urine of humans after consumption of wheat bran. **Cereal Chemistry**. 85: 152–157.
- Prasad, N., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S., and Reddy, B. (2011). Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line N. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 349: 11–19.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**. 26 (9/10): 1231–1237.
- Rao, R. S. P., and Muralikrishna, G. (2004). Non-starch polysaccharidephenolic acid complexes from native and germinated cereals and millet. **Food Chemistry**. 84: 527–531.
- Rao, R. S. P., and Muralikrishna, G. (2006). Water soluble feruloyl arabinoxylans from rice and ragi: Changes upon malting and their consequence on antioxidant activity. **Phytochemistry**. 67: 91–99.
- Rohrer, C. A. and Siebenmorgen, T. J. (2004). Nutraceutical concentrations within the bran of various rice kernel thickness fractions. **Biosystems Engineering**. 88(4): 453-460.
- Rose, D. J., and Inglett, G. E. (2010). Two-stage hydrothermal processing of wheat (*Triticum aestivum*) bran for the production of feruloylated arabinoxylooligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58: 6427–6432.
- Somogyi, M. (1945). A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**. 160: 61–73.
- Sosulski, F., Krygier, K., and Hogge, L. (1982). Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 30 (2): 337–340.
- Smith, M. M., and Hartley, R. D. (1983). Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell-wall polysaccharides in graminaceous plants. **Carbohydrate Research**. 18: 65–80.
- Shibuya, N. (1984). Phenolic acids and their carbohydrate esters in rice endosperm cell walls. **Phytochemistry**. 23: 2233–2237.

- Shibuya N., and Iwasaki, T. (1985). Structural features of rice bran hemicellulose. **Phytochemistry**. 24: 285-289.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., and Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 76: 270–276.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of totalphenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**. 299: 152–178.
- Schooneveld-Bergmans, M. E. F., Beldman, G., and Voragen, A. G. J. (1999). Structural features of glucuronoarabinoxylans extracted from wheat bran by barium hydroxide. **Journal of Cereal Science**. 29: 63–75.
- Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., and Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research**. 579: 200–213.
- Swennen, K., Courtin, C. M., Bruggen, B. V., Vandecasteele, C., and Delcour, J. A. (2005). Ultrafiltration and ethanol precipitation for isolation of arabinoxylooligosaccharides with different structures. **Carbohydrate Polymers**. 62: 283–292.
- Swennen, K., Courtin, C. M., Lindemans, G. CJE., and Delcour, J. A. (2006). Large-scale production and characterisation of wheat bran arabinoxylooligosaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 86: 1722–1731.
- Saulnier, L., Sadoa, P. E., Branlard, G., Charmet, G., and Guillon, F. (2007). Wheat arabinoxylans: Exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. **Journal of Cereal Science**. 46: 261–281.
- Trogh, I., Croes, E., Courtin, C. M., and Delcour J. A. (2005). Enzymic degradability of hull-less barley flour alkali-solubilized arabinoxylan fractions by endoxylanases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53: 7243–7250.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., and Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 46: 4113–4117.

- Vegas, R., Alonso, J. L., Dominguez, H., and Parajo, J. C. (2004) Processing of rice husk autohydrolysis liquors for obtaining food ingredients. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52: 7311–7317.
- Yuan, X., Wang, J., and Yao, H. (2005). Antioxidant activity of feruloylated oligosaccharides from wheat bran. **Food Chemistry**. 90: 759–764.
- Yuan, X., Wang, J., Yao, H., and Chen, F. (2005). Free radical-scavenging capacity and inhibitory activity on rat erythrocyte hemolysis of feruloyl oligosaccharides from wheat bran insoluble dietary fiber. **LWT-Food Science and Technology**. 38: 877–883.
- Yokomizo, A., and Moriwaki, M. (2006). Effects of uptake of flavonoids on oxidative stress induced by hydrogen peroxide in human intestinal Caco-2 cells. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 70 (6): 1317–1324.
- Wang, H., and Joseph, J. A. (1999). Structure-activity relationships of quercetin in antagonizing hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC12 cells. **Free Radical Biology and Medicine**. 27 (5–6): 683–694.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Song, H., and Tian, Y. (2008). Inhibitory effect of wheat bran feruloyl oligosaccharides on oxidative DNA damage in human lymphocytes. **Food Chemistry**. 109: 129–136.
- Wang, L., Zhang, H., Zhang, X., and Chen, Z. (2008). Purification and identification of a novel heteropolysaccharide RBPS2a with anti-complementary activity from defatted rice bran. **Food Chemistry**. 110: 150–155.
- Wood, P. J., Weisz, J., and Blackwell, B. A. (1994). Structural studies of (1-3),(1-4)- $\beta$ -D glucans by <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance spectroscopy and by rapid analysis of cellulose-like regions using high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides released by lichenase. **Cereal Chemistry**. 71:301–307.
- Wolfe, K. L., and Hailiu, R. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 55: 8896–8907.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., and Tian, Y. (2009). Protection of wheat bran feruloyl oligosaccharides against free radical-induced oxidative damage in normal human erythrocytes. **Food and Chemical Toxicology**. 47: 1591–1599.



- Wu, C., Huang, H., Lin, J., Huang, S., and Yen, G. (2011). The proglycation effect of caffeic acid leads to the elevation of oxidative stress and inflammation in monocytes, macrophages and vascular endothelial cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 22: 585–594.
- Zhao, Z., Egashira, Y., and Sanada, H. (2003). Ferulic acid sugar esters are recovered in rat plasma and urine mainly as the sulfoglucuronide of ferulic acid. **The Journal of Nutrition**. 133(5): 1355–1361.
- Zhao, Z., and Moghadasian, M. H. (2008). Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. **Food Chemistry**. 109: 691–702.
- Zhou, S., Liu, X., Guo, Y., Wang, Q., Peng, D., and Cao, L. (2010). Comparison of immunological activities of arabinoxylans from wheat bran with alkali and xylanase-aided extraction. **Carbohydrate Polymers**. 81: 784–789.
- Zhang, M., Zhang, R., Zhang, X., and Liu, R. (2010). Phenolic profiles and antioxidant activity of black rice bran of different commercially available varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58: 7580–7587.
- Zhang, S., Li, W., Smith, C. J., and Musa, H. (2015). Cereal-derived arabinoxylans as biological response modifiers: Extraction, molecular features, and immune-stimulating properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 55: 1033-1050.
- Zhanga, L., Hua, T., Liua, H., and Shuai, X. (2011). Inhibitory effect of Sargassum polysaccharide on oxidative stress induced by infectious bursa disease virus in chicken bursal lymphocytes. **International Journal of Biological Macromolecules**. 49: 607–615.

## ภาคผนวก

### การวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

#### 1. ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

##### วิธีการ

1. ออบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 °C นาน 2-3 ชั่วโมง นำออก จากตู้อบใส่ไว้ในโถคู่ความชื้นรอนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งและ บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน

2. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1-3 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนัก ที่แน่นอนแล้ว

3. ออบตัวอย่างในตู้อบไฟฟ้าด้วยอุณหภูมิ 105 °C นาน 5-6 ชั่วโมง

4. เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วนำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถคู่ความชื้นรอนกระทั่งอุณหภูมิ ของภาชนะลดลงถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

5. คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น(\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

#### 2. ปริมาณโปรตีน (AOAC, 2000)

##### วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างบนกระดาษกรองให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 0.5-1.0 กรัม ท่อให้ มิดชิดใส่ลงในขวดย่อยโปรตีน

2. ใส่สารผสมคอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO<sub>4</sub>) และโพแทสเซียมซัลเฟต (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 5 กรัม (อัตราส่วนระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟตและโพแทสเซียมซัลเฟต 1:10) เพื่อเร่งปฏิกิริยา

3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ปริมาตร 15-20 มิลลิลิตรและสารป้องกันการเกิดโฟม (anti-foaming agent) 4-5 หยด

4. ย่อยตัวอย่างบนเตาเครื่องย่อยโปรตีนที่อุณหภูมิ 380 °C จนได้สารละลายใสปล่อยให้ เย็น

5. จัดอุปกรณ์การกลั่นแล้วเปิดสวิตซ์ไฟและเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่น

6. ใช้ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุกรดบอริก (ความเข้มข้น 4%) ปริมาตร 25 มิลลิลิตรและน้ำซึ่งเติมอินดิเคเตอร์ 2-3 หยดเรียบร้อยแล้วไปรับรองของเหลวที่ก่อกวนโดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดนี้

7. กำหนดให้เครื่องเติมน้ำกลั่นและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 32% โดยน้ำหนักและทำการกลั่นที่ประมาณ 10 นาที ล้างปลายอุปกรณ์ควบแน่นด้วยน้ำกลั่นลงในขวดรองรับ

8. ไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้กับกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 0.1 นอร์มัลจนสีของสารละลายเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวเป็นสีม่วง

9. ทำ blank และปฏิบัติตามข้อ 1-8 โดยไม่เติมตัวอย่าง

10. คำนวณปริมาณโปรตีนจากสูตร

$$\text{ปริมาณโปรตีน(\%)} = \frac{(A-B)N \times 1.4 \times F}{W}$$

เมื่อ A = ปริมาตรกรดที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง(มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรกรดที่ใช้ไตเตรตกับ blank (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของกรด (นอร์มัล)

F = ค่าคงที่สำหรับแป้งข้าวเจ้าคือ 6.25

W = น้ำหนักตัวอย่างที่เริ่มต้น (กรัม)

#### 4. ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)

ซึ่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 2 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ใส่ในถ้วยกระเบื้อง (crucible) นำไปเผาจนหมดควันเข้าเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 - 600 °C ประมาณ 2 ชั่วโมงหรือจนมีสีขาว-เทาถึงให้เย็นใน โถดูดความชื้นชั่งน้ำหนักคำนวณปริมาณเถ้าเป็นร้อยละ

$$\text{ร้อยละเถ้า} = (\text{น้ำหนักตัวอย่าง} + \text{ถ้วยกระเบื้อง (หลังเผา)}) - \text{น้ำหนักถ้วยกระเบื้อง} \times 100$$

เมื่อ น้ำหนักตัวอย่างเป็นกรัม (น้ำหนักแห้ง)

### 3. การวิเคราะห์หาปริมาณใยอาหารทั้งหมด (Total Dietary Fiber, TDF)

ดำเนินการวิเคราะห์หาปริมาณใยอาหารทั้งหมดตามวิธีของ AOAC method 985.29 โดยชั่งตัวอย่างสด 1.0 g (ตัวอย่างที่ใช้ต้องบดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 10 mesh ถ้าตัวอย่างมีปริมาณไขมันมากกว่า 10% ให้ทำการสกัดไขมันออกก่อน) ใส่ในบีกเกอร์ทรงสูงขนาด 500 ml (ทำการเตรียมตัวอย่าง 2 ซ้ำ และ Blank 2 ซ้ำ) เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.08 M ปริมาตร 50 ml และ sonicated เพื่อให้แน่ใจว่าตัวอย่างมีการกระจายใน buffer อย่างสมบูรณ์ เติม heat stable  $\alpha$ -amylase ปริมาตร 100  $\mu$ l ปิดบีกเกอร์ด้วย aluminium foil นำบีกเกอร์ใส่ลงใน shaker water bath ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับ pH ของสารละลายให้มี pH 7.5 $\pm$ 0.1 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.275 M จากนั้นเติม protease solution ปริมาตร 0.5 ml นำไปย่อยใน shaker water bath ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับ pH ของสารละลายให้มี pH 4.5 $\pm$ 0.2 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.325 M เติม amyloglucosidase ปริมาตร 0.3 ml นำไปย่อยที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที เติมเอทานอล 95% อุ่นที่อุณหภูมิ 60 °C ปริมาตร 280 ml ตั้งสารละลายทิ้งไว้ข้ามคืน เพื่อให้เกิดตะกอนที่อุณหภูมิห้อง กรองตะกอนผ่าน crucible ที่ผ่านการเผาที่อุณหภูมิ 550 °C อย่างน้อย 5 ชั่วโมงมาแล้ว และภายใน crucible บรรจุ celite ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนปริมาณ 1.0 g กรองตัวอย่างด้วย vacuum pump ล้างตัวอย่างที่ติดอยู่ที่บีกเกอร์ด้วยเอทานอล 78% ปริมาตร 20 ml จำนวน 3 ครั้ง ตามด้วยเอทานอล 95% ปริมาตร 10 ml จำนวน 2 ครั้ง และอะซิโตน ปริมาตร 10 ml จำนวน 2 ครั้ง นำ crucible ที่มีตะกอนของตัวอย่างไปทำแห้งในตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 105 °C ข้ามคืน และนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักตะกอน นำตะกอนตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีเจลดาคัล ตามมาตรฐาน AOAC, 2000 และวิเคราะห์หาปริมาณใยอาหารทั้งหมด (Total Dietary Fiber, TDF) จากสูตร

$$\text{TDF, \%} = \left[ \frac{(\text{weight residue} - P - A - B)}{\text{weight test portion}} \right] \times 100$$

เมื่อ P = weight (mg) of protein

A = weight (mg) of ash

B = weight (mg) of blank

## ประวัติผู้วิจัย

### นางสุนันทา ทองทา

นางสุนันทา ทองทา เกิดเมื่อวันที่ 27 ตุลาคม 2506 ณ จังหวัดนครราชสีมา ปัจจุบันดำรงตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ สังกัดสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. (พัฒนาผลิตภัณฑ์) จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อปี พ.ศ. 2529 จบการศึกษาระดับปริญญาโท วท.ม. (วิทยาศาสตร์การอาหาร) จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อปี พ.ศ. 2533 จากนั้นเข้ารับราชการบรรจุตำแหน่งอาจารย์ที่ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีเดียวกัน ต่อมาในปี พ.ศ. 2536 ได้รับทุน Fulbright จากมูลนิธิการศึกษาไทย-อเมริกัน ไปศึกษาต่อในระดับปริญญาเอก ที่ University Of Illinois at Urbana-Champaign สหรัฐอเมริกา และสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2541

นางสุนันทา ทองทา ได้มีผลงานทางวิชาการดังต่อไปนี้

#### 1. ผลงานตีพิมพ์ / การประชุมระดับชาติและนานาชาติ

- Sorndech, W., Meier, S., Jansson, A. M., Sagnelli, D., Lee, B.H., Hamaker, B.R., Rolland-Sabaté, A., Hebelstrup, K.H., **Tongta, S.**, & Blennow, A. 2016. Structure of branching enzyme- and amyloamylase modified starch produced from well-defined amylose to amylopectin substrates. *Carbohydrate Polymers*, 152, 51-61.
- Sorndech, W., Meier, S., Jansson, A. M., Sagnelli, D., Hindsgaul, O., **Tongta, S.**, and Blennow, A. 2015. Synergistic Amyloamylase and Branching Enzyme Catalysis to Suppress Cassava Starch Digestibility, *Carbohydrate Polymers*, 132:409-418. (IF 4.074)
- Prompiputtanapon, K. and **Tongta, S.** 2015. Modification of tapioca starch granule surfaces on soluble fiber formation. *Journal of Food Science and Agricultural Technology*. 1(1): 116-121.
- Tananchai, C., **Tongta, S.** and Rodtong, S. 2015. Evaluation of Different Resistant Starch Types for Stimulating Growth of the Dominant Lactic acid Bacteria Inhabiting Human Colon. *Journal of Food Science and Agricultural Technology*. 1(1): 197-200.
- Kiatponglarpa, W., **Tongta, S.**, Rolland-Sabaté, A., and Buléon, A. 2015. Crystallization and chain reorganization of debranched rice starches in relation to resistant starch formation. *Carbohydrate Polymers*. 122:108-144. (IF 4.074)

- Chaisiricharoenkul, J., **Tongta S.** and Intarapichet, K. 2011. Structure and chemical and physicochemical properties of Job's tear (*Coix lacryma-jobi* L.) kernels and flours. Suranaree J. Sci. Technol. 18(2):109-122.
- Boonna, S., **Tongta, S.** and Piyachomkwan, K. 2010. Effect of dehydration methods on digested starch fractions of retrograded debranched rice starch. Suranaree J. Sci. Technol. 17(4):359-368.
- Apirattananusorn, S., **Tongta, S.**, Cui, S.W., and Wang, Q. 2008. Chemical, molecular, and structural characterization of alkali extractable polysaccharides from Job's Tears. J. Agric. Food. Chem. 56:8549-8557.
- Rareunrom, K., **Tongta, S.** and Yongsawatdigul, J. 2008. Effect of soy protein isolate on chemical and physical characteristics of meat analog. Asian Journal of Food and Agro-Industry, 1(02):97-104.
- Phoungchandand, S., Bhulaidok, S., Nantachai, K., Woraphuttaporn, W., **Tongta, S.** and Suvannason, V. 2007. Influence of various cereal flours on physical properties of expanded extrudates. Khon Kaen University Research Journal. 12(4):431-441.
- Kiatponglar, W. and **Tongta, S.** 2007. Structural and Physical Properties of Debranched Tapioca Starch. Suranaree Journal of Science and Technology, 14(2):195-204.
- Rareunrom, K., **Tongta, S.** and Yongsawatdigul. 2007. Effect of full fat soy flour on characteristics of soy protein meat analog. Suranaree Journal of Science and Technology, 14(2):185-193.
- Pakdeechanuan, P., Intarapichet, K. and **Tongta, S.** 2007. Effect of extrusion parameters on conjugated linoleic acids of corn extrudate. J. Agric. Food. Chem., 55: 1463-1468.
- Tongta, S.**, Kiatponglar, W. and K. Sriroth, K. 2004. Effect of aging temperature on retrogradation of concentrated cassava starch gel. In ' Starch: Progress in Structural studies, Modifications and Applications' Tomasik, P., Yuryev, V.P. and Bertoft, E. (eds.). pp. 357-364. Drukarnia GS, Cracow.
- Sottirattanapan, P. and **Tongta, S.** 2003. Effect of extrusion parameters on physical characteristics of rice extrudate. Suranaree Journal of Science and Technology. 10(3):220-229.

- Nantachai, K. Srijesdaruk, V., **Wiryapirom, S.** and Tungwongchai, R. 1997. Sensory perceptions of sugarcane juices. *Khon Kaen University Research Journal*. 2(1):10-17.
- Prompiputtanapon, K., and Tongta, S. 2014. Modification of tapioca starch granule surface on soluble fiber formation. The 2<sup>nd</sup> International Conference on Agricultural and Agro-Industry. November 20-21, 2014. Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.
- Tananchai, C., Tongta, S., and Rodtong, S. 2014. Evaluation of different resistant starch types for stimulating growth of the dominant lactic acid bacteria inhabiting human colon. The 2<sup>nd</sup> International Conference on Agricultural and Agro-Industry. November 20-21, 2014. Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.
- Kiatponglarp, W., **Tongta, S.**, and Buleon, A. 2013. Resistant starch formation of rice from different varieties. The 5<sup>th</sup> ASIAHORCs Joint Symposium. November 26-28, 2013. Nusa Dua, Bali, Indonesia
- Kiatponglarp, W., **Tongta, S.**, and Buleon, A. 2013. Formation of sperulites from debranched rice starches and their digestibility. In *Proceeding of Starch Update 2013: The 7<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology*, p 182-187. November 21-22, 2012. Bangkok, Thailand.
- Jampatesh, S, and **Tongta, S.** 2013. Impacts of Heating Processes on Physical Properties of Resistant Citrate Rice Starch. In *Proceeding of Starch Update 2013: The 7<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology*, p.219-226. November 21-22, 2012. Bangkok, Thailand.
- Thanompolkrung, T., Tongta, S. and Yongsawatdigul, J. Effect of sodium sulfite on pasting and textural properties of aged rice. AACC International Meeting, September 29-October 2, 2013. Albuquerque, New Mexico U.S.A.
- Kiatponglarp, W., **Tongta, S.** and Buléon, A. 2012. Crystallization behavior of debranched waxy rice starch in relation to enzyme digestibility, thermal properties and microstructure. XIX International Starch Convention. September 18-20, 2012. Moscow, Russia.
- Kiatponglarp, W., **Tongta, S.**, Rugmai, S., and Soontaranon, S. 2012. Preliminary study of starch granular structure using synchrotron radiation WAXS and SAXS techniques. AOFSSRR 2012, the 6<sup>th</sup> Asia Oceania Forum for Synchrotron Radiation Research. August, 8-12, 2012. Bangkok, Thailand

- Yuwang, P. and **Tongta, S.** 2012. Enzymatic extraction of rice bran arabinoxylans and antioxidant property. Plant and Seaweed Polysaccharides workshop. July 17-20, 2012. Nantes, France.
- Tongta, S.** and Boonna, S. 2012. Effect of resistant rice starch supplementation on characteristics of rice noodle. Plant and Seaweed Polysaccharides workshop. July 17-20, 2012. Nantes, France.
- Lapkhoksung, A. and **Tongta, S.** and Piyachomkwan, K. 2012. Effects of pullulanase and isoamylase and rice varieties on resistant starch type III formation. In Proceeding of Starch Update 2011: The 6<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology, p 90-95. February 13-14, 2012. Bangkok, Thailand.
- Charoenporn, S. and **Tongta, S.** 2012. Physicochemical and rheological properties of extruded high amylose rice flour. In Proceeding of Starch Update 2011: The 6<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology, p 244-249. February 13-14, 2012. Bangkok, Thailand.
- Kiatpongarp, W. and **Tongta, S.** 2012. Formation of resistant starch type II and type III with hydrolysis of alpha-amylase. In Proceeding of Starch Update 2011: The 6<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology, p 340-345. February 13-14, 2012. Bangkok, Thailand.
- Tongta, S.**, Boonna, S., Kitiratanakornkul, C. and Nular, T. 2012. Dough and bread characteristics with supplementation of resistant rice starch. In Proceeding of Starch Update 2011: The 6<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology, p 346-351. February 13-14, 2012. Bangkok, Thailand.
- Tongta, S.** and Boonna, S. 2011. Characteristics of rice-based extruded snack with resistant starch supplementation. Poster presentation in IFT Annual Meeting, June 11-14, 2011, New Orleans, LA USA.
- Tongta, S.** and Kiatpongarp, W. 2010. Effect of acid dextrinization and annealing on resistant starch type III formation. Oral presentation XVIII International Starch Convention. June 21-25, 2010. Cracow, Poland.
- Thanompolkrung, T., **Tongta, S.** and Yongsawatdigul, J. 2010. Conformational changes of rice proteins affecting on pasting and textural properties of rice. Poster presentation in Food Innovation Asia Conference 2010. June 17-18, 2010. BITEC, Bangkok, Thailand.



- Chaisiricharoenkul, J. and **Tongta, S.** 2009. Effect of extrusion parameters on starch digestion and physicochemical properties of Job's Tear (*Coix lacryma jobi* L.) flour. In Proceeding of Starch Update 2009: The 5<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology. September 24-25, 2009. Bangkok, Thailand.
- Dalai, N. and **Tongta, S.** 2009. Physicochemical properties of waxy and high amylose rice flour during storage. In Proceeding of Starch Update 2009: The 5<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology. September 24-25, 2009. Bangkok, Thailand.
- Kiatpongarp, W. and **Tongta, S.** 2009. Comparative effect of different temperature cycling on resistant starch formation. In Proceeding of Starch Update 2009: The 5<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology. September 24-25, 2009. Bangkok, Thailand.
- Tongta, S.** and Boonna, S. 2009. Physical modification of rice flour by extrusion. In Proceeding of Starch Update 2009: The 5<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology. September 24-25, 2009. Bangkok, Thailand.
- Tongta, S.** and Kiatpongarp, W. 2009. Impact of enzyme concentration and hydrolysis time on resistant starch formation. In Proceeding of Starch Update 2009: The 5<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology. September 24-25, 2009. Bangkok, Thailand.
- Dalai, N. and **Tongta, S.** 2009. Physicochemical and textural properties of high amylose rice during storage In Proceeding of Food Innovation Asia Conference 2009. June 18-19, 2009. BITEC, Bangkok, Thailand.
- Boonna, S., **Tongta, S.** and Piyachomkwan, K. 2009. Effect of aging condition on resistant starch formation of rice starch. Poster presentation in 2009 IFT Annual Meeting. June 6-9, 2009. Anaheim, CA, USA.
- Dalai, N. and **Tongta, S.** 2008. Comparative study on physical properties of waxy and non-waxy rice during storage. . In Proceeding of The 34<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand. October 31-November 2, 2008. Bangkok, Thailand.
- Boonna, S. and **Tongta, S.** 2008. Effect of starch content and aging temperature on slowly digestible starch and resistant starch formation in debranched rice starch. . In Proceeding of The 34<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand. October 31-November 2, 2008. Bangkok, Thailand.

- Boonna, S. and **Tongta, S.** 2007. Effect of drum drying parameters on physical properties of pregelatinized rice flour. In Proceeding of Starch Update 2007: The 4<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology. November 6-7, 2007. Bangkok, Thailand.
- Kiatponglar, W. and **Tongta, S.** 2007. Structural and physical properties of enzyme-resistant starch produced from debranched and retrogradation of cassava starch. In Proceeding of Starch Update 2007: The 4<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology. November 6-7, 2007. Bangkok, Thailand.
- Siriboon, B. and **Tongta, S.** 2007. Effect of annealing on physicochemical properties of waxy and normal rice starches. In Proceeding of Starch Update 2007: The 4<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology. November 6-7, 2007. Bangkok, Thailand.
- Chaisiricharoenkul, J. and **Tongta, S.** 2007. Physicochemical and antioxidant properties of Job's Tear Flour. In Proceeding of The 9<sup>th</sup> Agro-Industrial Conference, Food Innovation Asia 2007. June 14-15, 2007. Bangkok, Thailand.
- Rareunrom, K., **Tongta, S.** and Yongsawatdigul, J. 2007. Effect of soy protein isolate on chemical and physical characteristics of meat analog. In Proceeding of The 9<sup>th</sup> Agro-Industrial Conference, Food Innovation Asia 2007. June 14-15, 2007. Bangkok, Thailand.
- Siriboon, B. and **Tongta, S.** 2007. Effect of Annealing on Physicochemical Properties of Waxy Rice. In Proceeding of The 9<sup>th</sup> Agro-Industrial Conference, Food Innovation Asia 2007. June 14-15, 2007. Bangkok, Thailand.
- Apirattanusorn, S., Cui, S.W., Wang, Q. and **Tongta, S.** 2006. Extraction and composition of water-unextractable arabinoxylans from Job's tears (*Coix lacryma-jobi* L.) (Abstract. pp. 238 and Poster presentation). 2006 CIFST/AAFC Joint Conference, May 28-30, 2006. Montreal, Canada.
- Kiatponglar, W. and **Tongta, S.** 2006. Effect of debranching on enzyme resistant starch formation in tapioca starch. In Proceeding of The 8<sup>th</sup> Agro-Industrial Conference. June 15-16, 2006. Bangkok, Thailand.
- Tongta, S.**, Ningsanond, S. and Boonna, S. 2006. Influence of hydrocolloids and soy milk solid on physical and textural qualities of soy yoghurt. In Proceeding of The 8<sup>th</sup> Agro-Industrial Conference. June 15-16, 2006. Bangkok, Thailand.

Rareunrom, K., **Tongta, S.** and Yongsawatdigul. 2004. Structure and texture characteristic of soy protein meat analog. In Proceeding of The 6<sup>th</sup> Agro-Industrial Conference. May 28-29, 2004. Bangkok, Thailand.

สถานที่ติดต่อ: สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000 โทรศัพท์ (044) 22-4266

