บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสกัดอะราบิโนไซแลนส่วนที่สกัดไม่ได้ด้วยน้ำ (water unextracable arabinoxylan, WUAX) จากรำข้าวและศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระในอะราบิโนไซแลนที่สกัดได้

อะราบิโนไซแลนส่วนที่สกัดไม่ได้ด้วยน้ำ ทำการสกัดจากรำข้าวปราศจากไขมัน จากนั้นทำการกำจัดสตาร์ชและโปรตีนออกด้วยเอนไซม์เอนโดไซลาเนส (endoxylanase) จาก *Bacillus subtilis* จากการศึกษาปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการสกัด คือ การให้ความร้อนภายใต้แรงดัน (autoclave) ปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อย พบว่า การให้ความร้อนภายใต้แรงดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนนำมาย่อยด้วยไซลาเนสจำนวน 5 ยูนิตต่อกรัม เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เป็นวิธีการเบื้องต้นที่เหมาะสมในการสกัดอะราบิโนไซแลน โดยให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงเท่ากับ 9.14 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสจะเพิ่มปริมาณฟีนอลิกยึดเหนี่ยวรวมและลดปริมาณฟีนอลิกอิสระในรำข้าว และกรดฟีนอลิกหลักที่พบคือกรดเฟอรูลิกรูปแบบฟีนอลิกยึดเหนี่ยว

อะราบิโนไซแลนจาก WUAX สามารถตกตะกอนด้วยเอทานอลออกเป็น 3 ส่วน ตามความเข้มข้นของเอทานอล ได้แก่ สารสกัดที่ตกตะกอนด้วยเอทานอลเข้มข้น 0-60 เปอร์เซ็นต์ (F60) สารสกัดที่ตกตะกอนด้วยเอทานอลเข้มข้น 60-90 เปอร์เซ็นต์ (F6090) และสารสกัดที่ตกตะกอนด้วยเอทานอลเข้มข้นมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (F90) การวิเคราะห์องค์ประกอบสารฟีนอลิกในอะราบิโนไซแลนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอทานอล พบว่า สารสกัด F60 และ F6090 มีกรดฟีนอลลิกชนิดยึดเหนี่ยวมากกว่ากรดฟีนอลลิกชนิดอิสระ โดยสารสกัด F60 และ F6090 มีกรดเฟอรูลิกที่อยู่ในรูปฟีนอลิกยึดเหนี่ยวเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนสารสกัด F90 มีปริมาณกรดเฟอรูลิกและกรดคูมาริกยู่ในรูปฟีนอลิกยึดเหนี่ยวใกล้เคียงกัน น้ำหนักโมเลกุลของสารสกัด F60 F6090 และ F90 วิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแยกขนาด พบว่า มีค่าเท่ากับ 5.786×10^{4}, 4.137×10^{4} และ 1.525×10^{3} กรัมต่อโมล ตามลำดับ การวิเคราะห์น้ำตาลด้วยวิธีเมทาโนไลซิส (methanolysis) พบว่าน้ำตาลหลักในสารสกัด F60 และ F6090 คือไซโลสและอะราบิโนส โดยปริมาณอะราบิโนไซแลนของสารสกัดทั้งสองส่วนมีค่าเท่ากับ 70.3 และ 73.8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนน้ำตาลหลักที่พบในสารสกัด F90 คือกลูโคสและไซโลส จากการศึกษาโครงสร้างของอะราบิโนไซแลนพบอะราบิโนสที่ส่วนกิ่งเชื่อมกับไซโลสด้วยพันธะ α-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 F60และ 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 perfomed by enzymatic treatment with *Bacillus subtilis* endoxylanase. The important factors affecting extraction such as autoclave condition, enzyme concenttration 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 oserved 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 5.786×10^{4}, 4.137×10^{4}, and 1.525×10^{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 α-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 μg/mL, followed by F60 and F90. Howeber, 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 μg/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 μg/mL. At 500 to 12,500 μg/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 IC_{50} value of 8,132 μg/mL.