

ชื่อเรื่อง	ผลของรำข้าวและรำข้าวหมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้และมะเร็งตับ
ชื่อผู้เขียน	นางสาวปิยนดา ประเสริฐสังข์
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ประธานกรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มงคล อธิบุญยานนท์

บทคัดย่อ

รำข้าวเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการสีข้าว รำข้าวอุดมไปด้วยสารที่มีคุณค่าทางโภชนาการและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวนมาก การศึกษาประสิทธิภาพฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการต้านมะเร็งของรำข้าวและรำข้าวหมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกในครั้งนี้ โดยการศึกษารำข้าวจากข้าวทั้งหมด 5 สายพันธุ์ คือ ข้าวเหนียวดำ หอมแดง หอมนิล หอมดอกมะลิ 105 และเหนียว กข 6 และทำการหมักรำข้าวด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* MP9 ผลการศึกษาพบว่ารำข้าวทุกสายพันธุ์ที่หมักจะมีปริมาณสารชนิดต่างๆ มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้หมัก เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดจากรำข้าวเหนียวดำ หอมแดง และหอมนิล มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่า โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 100.77, 139.06 และ 371.69 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ในขณะที่รำข้าวหมักพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่ารำข้าวไม่ได้หมัก 3 สายพันธุ์ คือ ข้าวหอมแดง หอมดอกมะลิ 105 และเหนียว กข 6 ปริมาณฟีนอลรวมในสารสกัดจากรำข้าวสายพันธุ์ต่างๆ พบว่ารำข้าวเหนียวดำ หอมแดง และหอมนิล มีปริมาณฟีนอลรวม เท่ากับ 62.89, 50.70 และ 17.71 mg gallic acid /g ตามลำดับ ในขณะที่รำข้าวหมักจะมีปริมาณฟีนอลรวมมากกว่ารำข้าวที่ไม่ได้หมัก 1 สายพันธุ์ คือ ข้าวหอมนิล ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG-2) ด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดจากรำข้าวทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้และเซลล์มะเร็งตับ เท่ากับ 43.38 - 64.37 และ 15.13 - 38.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่รำข้าวหมักมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้และเซลล์มะเร็งตับ เท่ากับ 32.36 - 46.77 และ 27.12 - 50.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการยับยั้งการ

(4)

เจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้และเซลล์มะเร็งตับกับรำข้าวที่ไม่ได้หมัก เท่ากับ 36.31 - 61.41 และ 45.42 - 66.57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารสกัดจากรำข้าวและผลิตภัณฑ์รำข้าวหมักด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติก ที่ได้จากงานวิจัยนี้ สามารถนำไปพัฒนาเป็นยาเพื่อป้องกันและรักษาโรคมะเร็งลำไส้และมะเร็งตับได้

Title	Effect of rice bran and rice bran fermented with probiotic bacteria on antiproliferation of colon and liver cancer cells
Author	Miss Piyanart Prasertsang
Degree of	Master of Science in Biotechnology
Advisory Committee Chairperson	Assistant Professor Dr. Mongkol Thirabunyanon

ABSTRACT

Rice bran is a by-product of the rice milling process. It is rich in nutritive values and bioactive compounds. This study on the efficiency as an antioxidant and antiproliferation of colon and liver cancer cells of rice bran and probiotic bacteria fermented rice bran was conducted using 5 rice varieties: Black Sticky, Red Hawn, Hom Nil, Hom Dawk Mali 105, and RD6. Rice bran was fermented by using probiotic bacteria *Bacillus subtilis* MP9. It was found that all the fermented rice bran varieties had more amounts of various kinds of substance than those in non-fermented varieties. When GC-MS was used for the analysis of the efficiency in antioxidation (DPPH method), it was found that the extracted substance from the rice bran of Black Sticky, Red Hawn and Hom Nil, rice varieties had more efficiency in antioxidation (IC_{50} value = 100.77, 139.06 and 371.69 $\mu\text{g/ml}$, respectively). In rice bran fermentation, it was found that fermented rice was more efficient in antioxidation than those without fermentation (Red Hawn, Hom Dawk Mali 105, and RD6). Regarding the total amount of phenol in the extracted substance from various varieties of rice bran, it was found that rice bran of Black Sticky, Red Hawn, and Hom Nil rice varieties had a total amount of phenol at 62.89, 50.70, and 17.71 mg gallic acid/g, respectively. Meanwhile, fermented rice bran had a total amount of phenol that was more than that of Hom Nil rice. Results of the study on the efficiency of the antiproliferation in colon cancer cells (Caco-2) and liver cancer cells (HepG2) by using MTT method, showed that all the rice bran

varieties had antiproliferation (43.38-64.37 and 15.13-38.51%, respectively, with fermented rice bran having efficiency in the antiproliferation in colon and liver cancer cells at 32.36-46.77 and 27.12-50.09%, respectively, whereas non-fermented rice bran had values equivalent to 36.31-61.41 and 45.42-66.57%, respectively.

The extracted substance obtained from the rice bran and bacteria probiotic fermented rice bran product of this study could be further developed as a medicine to prevent and treat colon and liver cancers.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มงคล อธิบุญยานนท์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.มธุรส ชัยหาญ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตติพรรณ จิมสุข กรรมการที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาพร้อมทั้งสนับสนุนในเรื่องของอุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนให้คำแนะนำ ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณคณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนเครื่องสีข้าวขนาดเล็ก

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณ คุณพ่อนุญยัง ประเสริฐสังข์ คุณแม่เข็มพร ประเสริฐสังข์ และญาติ พี่น้องทุกคนที่คอยให้การสนับสนุน ให้อุปการะการศึกษา ตลอดจนการอบรมสั่งสอนและให้กำลังใจในการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้เสมอมา

ปิยนดา ประเสริฐสังข์

กรกฎาคม 2557

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
สารบัญตาราง	(10)
สารบัญภาพ	(11)
สารบัญตารางผนวก	(12)
สารบัญภาพผนวก	(13)
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
โรคมะเร็ง	3
ข้าว	14
ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในทางการแพทย์	23
สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	23
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	33
วัสดุอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัย	33
วิธีวิจัย	37
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	43
ผลของการสกัดสารสกัดจากรำข้าวและรำข้าวหมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก	
<i>B. subtilis</i> MP9	43
ผลการทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ	56
ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง	66
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	75
สรุปผลการทดลอง	75

	หน้า
ข้อเสนอแนะ	77
บรรณานุกรม	78
ภาคผนวก	89
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์และอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย	90
ภาคผนวก ข สารเคมีและวิธีการเตรียม	93
ภาคผนวก ค หลักการการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)	98
ภาคผนวก ง วิธีการวิเคราะห์หาสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH และ Total phenolic	100
ภาคผนวก จ ภาพแสดงลักษณะของเมล็ดข้าว ข้าวสาร และรำข้าว 5 สายพันธุ์	112
ภาคผนวก ฉ ประวัติผู้วิจัย	109

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 ผลผลิตของสารสกัดจากรำข้าว รำข้าวหมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก <i>B. subtilis</i> MP9 และ รำข้าวไม่หมัก	44
2 การวิเคราะห์สารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย GC-MS ของรำข้าว เหนียวดำหมักและไม่ได้หมัก	46
3 การวิเคราะห์สารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย GC-MS ของรำข้าว หอมแดงหมักและไม่ได้หมัก	48
4 การวิเคราะห์สารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย GC-MS ของรำข้าวหอม นิลหมักและไม่ได้หมัก	50
5 การวิเคราะห์สารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย GC-MS ของรำข้าวหอม ดอกมะลิ 105 หมักและไม่ได้หมัก	52
6 การวิเคราะห์สารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย GC-MS ของรำข้าว เหนียว กข 6 หมัก และไม่ได้หมัก	54
7 เปอร์เซนต์การกำจัดอนุมูล DPPH จากสารสกัดจากรำข้าว 5 สายพันธุ์	57
8 ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากรำข้าว 5 สายพันธุ์ที่หมักด้วย แบคทีเรียโปรไบโอติกสายพันธุ์ <i>B. subtilis</i> MP9 และไม่ได้หมัก	61
9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดรำข้าวทั้งหมด 5 สายพันธุ์	63
10 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากรำข้าว 5 สายพันธุ์ต่อยับยั้งการเจริญของ เซลล์มะเร็งลำไส้ (Means $\pm$ SD, n=5)	67
11 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากรำข้าวหมักและไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> MP9 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2) (Means $\pm$ SD, n = 5)	70
12 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากรำข้าว 5 สายพันธุ์ ต่อยับยั้งการเจริญของ เซลล์มะเร็งตับ (Means $\pm$ SD, n = 5)	72
13 ประสิทธิภาพประสิทธิภาพของสารสกัดจากรำข้าวหมักและไม่ได้หมักด้วย แบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> MP9 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์ตับ (HepG2) (Means $\pm$ SD, n = 5)	74

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 กระบวนการพัฒนาของมะเร็งลำไส้	5
2 ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก <i>B. subtilis</i> MP9 ในรำข้าว สายพันธุ์ต่างๆ ที่นำมาหมัก	45
3 พิกของสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่วิเคราะห์ได้ด้วย GC-MS 1	47
4 พิกของสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่วิเคราะห์ได้ด้วย GC-MS 2	49
5 พิกของสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่วิเคราะห์ได้ด้วย GC-MS 3	51
6. พิกของสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่วิเคราะห์ได้ด้วย GC-MS 4	53
7 พิกของสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่วิเคราะห์ได้ด้วย GC-MS 5	55
8 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากรำข้าวทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ	58
9 ความเข้มของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ของสารสกัดจากรำข้าว และสารมาตรฐาน ascorbic acid	59
10 ค่าความเข้มของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูล DPPH 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ของ สารสกัดจากรำข้าวหมักสายพันธุ์ต่างๆ ที่หมักและไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรีย โปรไบโอติกสายพันธุ์ <i>B. subtilis</i> MP9	62
11 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจากรำข้าว 5 สายพันธุ์ที่หมักและ ไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก <i>B. subtilis</i> MP9 และไม่ได้หมัก	66

สารบัญตารางผนวก

ตารางผนวก		หน้า
1	การเปรียบเทียบความขุ่นของ McFarland เบอร์ต่างๆ	96
2	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณ สารประกอบฟีนอลรวม ที่ความเข้มข้น 330 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	107

สารบัญภาพผนวก

ภาพผนวก	หน้า
1 กราฟเชิงเส้นของเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH ของสารมาตรฐาน Ascorbic acid	101
2 กราฟเชิงเส้นของเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดรำข้าวเหนียวดำ	102
3 กราฟเชิงเส้นของเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดรำข้าวหอมแดง	103
4 กราฟเชิงเส้นของเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดรำข้าวหอมนิล	103
5 กราฟเชิงเส้นของเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดรำหอมดอกมะลิ 105	104
6 กราฟเชิงเส้นของเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดรำข้าวเหนียว กข 6	105
7 กราฟเชิงเส้นของสารมาตรฐาน gallic acid	106
8 ลักษณะของเมล็ดข้าว ข้าวสาร และรำข้าวเหนียวดำ	110
9 ลักษณะของเมล็ดข้าว ข้าวสาร และรำข้าวหอมแดง	110
10 ลักษณะของเมล็ดข้าว ข้าวสาร และรำข้าวหอมนิล	110
11 ลักษณะของเมล็ดข้าว ข้าวสาร และรำข้าวหอมดอกมะลิ 105	111
12 ลักษณะของเมล็ด ข้าวสาร และรำข้าวข้าวเหนียว กข 6	111