

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

จากสถานการณ์ในปัจจุบันพบว่าผู้ป่วยเป็นโรคมะเร็งมากขึ้นทุกปี จากรายงานทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล ปี 2554 ที่ผ่านมามีผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้และโรคมะเร็งตับเป็นโรคมะเร็งที่พบมากเป็นลำดับต้นๆ จากโรคมะเร็งทั้งหมด โดยพบโรคมะเร็งลำไส้ในผู้ป่วยเพศชายมากเป็นลำดับที่ 1 คิดเป็นร้อยละ 16.2 โรคมะเร็งตับพบเป็นลำดับที่ 3 คิดเป็นร้อยละ 15.3 ในขณะที่ผู้ป่วยเพศหญิงจะพบโรคมะเร็งลำไส้เป็นลำดับที่ 3 คิดเป็นร้อยละ 9.6 และพบโรคมะเร็งตับเป็นลำดับที่ 7 คิดเป็น ร้อยละ 3.6 ผู้ที่ป่วยด้วยโรคมะเร็งลำไส้จะมีสาเหตุมาจากการอุปนิสัยในการรับประทานอาหาร การถ่ายทอดทางพันธุกรรม ผู้ที่สูบบุหรี่ และผู้ที่ดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เป็นประจำ ในขณะที่ผู้ป่วยโรคมะเร็งตับจะมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV) หรือไวรัสตับอักเสบซี (HCV) ผู้ที่ดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เป็นประจำ ผู้ที่ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน และในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน นอกจากนี้อีกสาเหตุหนึ่งที่เป็นต้นเหตุให้เกิดโรคมะเร็ง คือ อนุมูลอิสระ เนื่องจากสภาวะความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ที่เกิดขึ้นทำให้เกิดภาวะไม่สมดุลระหว่างการสร้างและการทำลายของสารโปรออกซิเดนท์ ซึ่งสารชนิดนี้เมื่อกำจัดอนุมูลอิสระแล้วจะกลายเป็นอนุมูลอิสระแทนเสียเอง เริ่มจากที่อนุมูลอิสระค้นหาความเสถียรภาพโดยที่อิเล็กตรอนจะเข้าไปจับคู่กับโมเลกุลทางชีวภาพ ทำให้ร่างกายเกิดการเปลี่ยนแปลงนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ วิธีการรักษาโรคมะเร็งนั้นในทางการแพทย์จะทำการรักษาด้วยวิธีการผ่าตัด การทำเคมีบำบัด และการฉายรังสี โดยวิธีการรักษาเหล่านี้มีค่าใช้จ่ายสูงและยังมีอาการข้างเคียงที่เกิดขึ้นภายหลังการรักษา นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยหลายรายต้องขาดการรักษาเนื่องจากขาดทุนทรัพย์ซึ่งจะทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว

จากปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นนำมาสู่การหาแนวทางการแก้ปัญหา โดยการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการรักษาโรคมะเร็ง โดยไม่ส่งผลข้างเคียงแก่ผู้ที่ทำการรักษา และการค้นหาสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อช่วยลดสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถพบได้ในธรรมชาติ ดังนั้นการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันและรักษาโรค โดยจะทำการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากพืช ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากรำข้าว (rice bran) เนื่องจากรำข้าวเป็นเศษเหลือ (by – product) ที่ได้จากการสีข้าว ซึ่งมีราคาถูกและหาได้

ง่าย ในรำข้าวประกอบด้วยสารอาหารและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น โปรตีน (protein) วิตามิน (vitamins) แร่ธาตุ (minerals) คาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน (complex carbohydrates), phytonutrients, phospholipids กรดไขมันอิ่มตัว (essential fatty acids) และมีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) มากกว่า 120 ชนิด (Kahlon, 2009)

ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการต้านมะเร็งจากสารสกัดจากรำข้าว และการหมักรำข้าวด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากรำข้าวต่อการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco – 2) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG 2)
2. เพื่อศึกษาผลของการรำข้าวหมักด้วย *Bacillus subtilis* MP9 ต่อการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco – 2) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG 2)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบประสิทธิภาพของสารสกัดจากรำข้าวต่อการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้และมะเร็งตับ
2. ได้ทราบประสิทธิภาพของการรำข้าวหมักด้วย *B. subtilis* MP9 ต่อการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้และมะเร็งตับ

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

โรคมะเร็ง

โรคมะเร็ง หมายถึงโรคที่เกิดจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อในร่างกายมีการเปลี่ยนแปลงหรือแบ่งตัวกระจายอย่างรวดเร็ว โดยอาจลุกลามไปยังอวัยวะใกล้เคียงหรือแพร่กระจายไปตามอวัยวะที่สำคัญต่างๆ ได้ โรคมะเร็งเป็นโรคที่ไม่ติดต่อกันจากคนหนึ่งสู่อีกคนหนึ่ง แต่โรคมะเร็งบางชนิดอาจมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ (ศูนย์มะเร็งแห่งชาติ, 2552)

โรคมะเร็งลำไส้

ลำไส้ใหญ่เป็นส่วนหนึ่งของระบบย่อยอาหารภายในร่างกาย ลำไส้ใหญ่เป็นท่อน้ำหนักเนื้อที่มีขนาดใหญ่ยาวประมาณ 5 ฟุต เป็นที่เก็บของเสียต่างๆ เพื่อส่งต่อไปยังทวารหนัก ผนังเนื้อเยื่อของลำไส้ใหญ่และลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (rectum) สามารถพัฒนาเป็นเนื้องอกที่เรียกว่า polyps เนื้องอกชนิดนี้สามารถพัฒนาไปเป็นเนื้อร้าย (มะเร็ง) หรือ (benign) (ภาพ 1) เนื้องอกที่ไม่ใช่มะเร็งสามารถตัดออกได้ โดยปกติแล้ว benign polyps อาจพัฒนาไปเป็น adenomatous polyps ซึ่งประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ ของมะเร็งลำไส้ทั้งหมดพัฒนามาจาก adenomatous polyps ดังนั้นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งลำไส้ส่วนปลาย จึงเรียกรวมกันว่าโรคมะเร็งลำไส้ (American Cancer Society, 2005) โรคมะเร็งลำไส้พบมากทั้งผู้ป่วยเพศชายและเพศหญิง ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้มนุษย์เราเสียชีวิตเป็นลำดับต้นๆ ของโรคมะเร็งทั้งหมด (Ferlay et al., 2004)

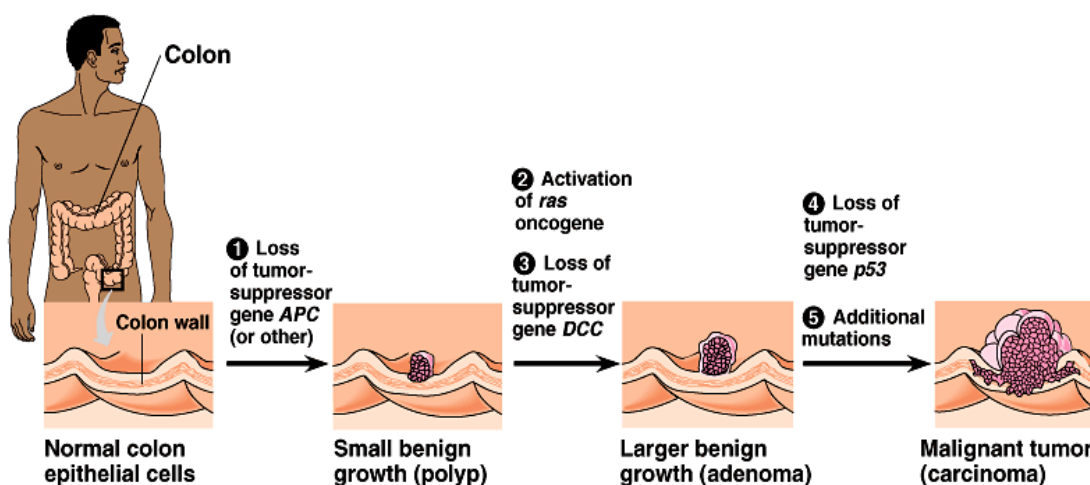
ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งลำไส้

1. การถ่ายทอดทางพันธุกรรม มะเร็งลำไส้เป็นโรคที่พบได้ทั้งที่เกิดขึ้นเองจากความผิดปกติในผู้ป่วยและการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ซึ่งเกิดจากได้รับยีนที่ผิดปกติมาจากบิดาหรือมารดา จากการศึกษาประวัติครอบครัวในผู้ที่เป็มะเร็งลำไส้จำนวน 100 คน พบว่ามีกลุ่มคน 75 คนที่ไม่มีบุคคลอื่นๆ ในครอบครัวเป็นโรคมะเร็งลำไส้ ในขณะที่อีกประมาณ 20 คน มีประวัติคนอื่นๆ ในครอบครัวเป็นโรคมะเร็งลำไส้ มะเร็งลำไส้ชนิดที่ถ่ายทอดในครอบครัวนั้น มักพบว่ามีบุคคลในครอบครัวมากกว่า 1 คนที่เป็นโรคมะเร็งลำไส้ มะเร็งลำไส้ชนิดที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมชนิดนี้จะ

พบได้ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ทั้งหมด แบ่งออกเป็น 2 ชนิดหลักๆ ได้แก่ familial adenomatous polyposis (FAP) และ hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)

1.1 Familial adenomatous polyposis (FAP) เป็นโรคมะเร็งลำไส้ที่ติดต่อทางพันธุกรรมที่พบได้น้อย กล่าวคือพบได้ประมาณ 0.5 - 1 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ ยีนที่เป็นสาเหตุของโรคนี้ คือ ยีน *APC* (adenomatous polyposis coli) ผู้ที่พบการกลายพันธุ์ของยีน *APC* จะเป็นผู้ที่มีโอกาสเป็นโรคมะเร็งลำไส้ที่เกิดจากพันธุกรรม โดยที่ผู้ป่วยได้รับยีนที่ผิดปกติมาจากพ่อหรือแม่ และเนื่องจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของโรคนี้มีลักษณะการถ่ายทอดผ่านยีนเด่น (autosomal dominant manner) หมายความว่าเกิดโรคได้เมื่อได้รับยีนที่ผิดปกติเพียงยีนเดียวก็เพียงพอต่อการทำให้เป็นโรคได้แล้ว ยีน *APC* นี้อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 5 ที่ตำแหน่ง 5q21 ประกอบด้วย 108,353 bases หรือ 2,843 amino acids หรือเท่ากับ 311.646 kDa ยีน *APC* นี้จัดเป็น tumor suppressor gene โดยโปรตีนที่สร้างจากยีนนี้เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ เป็น antagonist ต่อ Wnt signaling pathway ภาวะปกติโปรตีน *APC* จับกับโปรตีน Axin และ GSK3 รวมกันเป็น complex Axin/GSK3/*APC* มีความสามารถในการทำให้ β -catenin สลายตัว ในภาวะปกติ β -catenin ที่ผ่านจากไซโทพลาซึมเข้าไปในนิวเคลียสทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น transcription factor ที่จำเพาะกับ ยีนบางยีน ทำให้เกิดแสดงของยีนนั้นมากขึ้น การควบคุมของโปรตีน *APC* ที่มีต่อ β -catenin ทำให้ ยีนเหล่านั้นไม่สร้างมากเกินไปจนเป็นอันตรายต่อเซลล์ นอกจากนี้โปรตีน *APC* ยังเกี่ยวข้องกับ ขบวนการ cell migration, adhesion, transcriptional activation และ apoptosis อีกด้วย

Point mutation ที่พบได้บ่อยที่สุดในยีน *APC* คือ การเกิด deletion ของเบสจำนวน 5 เบส ที่ตำแหน่ง 1309 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในโปรตีน *APC* ที่สร้างขึ้น นอกจากนี้แล้วการเกิดการกลายพันธุ์บนยีน *APC* นั้น มักจะเกิดขึ้นที่บริเวณครึ่งแรกของ coding sequence โดย point mutation ที่พบเป็นส่วนใหญ่ในยีน *APC* มักจะเป็น transition จากเบส ไชโตไคน์ เป็นเบสอื่นๆ



ภาพ 1 กระบวนการพัฒนาของมะเร็งลำไส้

ที่มา: Robert (2007)

1.2 Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) หรือ Lynch syndrome นับเป็นโรคมะเร็งชนิดหนึ่งที่เกิดจากพันธุกรรม มีการถ่ายทอดในลักษณะ autosomal dominant เช่นเดียวกับ FAP แต่พบได้บ่อยกว่าคือประมาณ 3 – 5 เปอร์เซ็นต์ ผู้ป่วยที่เป็นโรค HNPCC นั้น มีชนิดและปริมาณของ microsatellite DNA sequence ที่หลากหลายแตกต่างไปจากคนปกติ และเรียกลักษณะแบบนี้ว่า microsatellite instability (MSI) หรือ Replication error (RER) โดยพบได้ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ ของผู้ป่วยซึ่งการค้นพบนี้นำไปสู่การค้นพบยีนกลายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุหลักของโรค HNPCC คือ การกลายพันธุ์ของยีน *MLH1* และ *MSH2* ซึ่งเป็นยีนในกลุ่มของ DNA mismatch repair genes (MMR) โดยระบบ MMR จะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบและซ่อมแซมความผิดพลาดอันเนื่องมาจากการทำงานของ DNA polymerase ขณะเกิด DNA replication โดยเฉพาะอย่างยิ่งตำแหน่งที่ลำดับเบสมีการซ้ำกันหลายๆ ตำแหน่ง จะทำการตรวจสอบตัดชิ้นส่วนที่ผิดพลาดทิ้งและใส่เบสที่ถูกต้องเข้าไปแทนที่ ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นหลังจากการสูญเสีย MMR นั้นคือการสูญเสีย proofreading activity และสูญเสียการแก้ไข small deletions และ insertion ในการซ่อมแซมส่วนของ DNA mismatch จะเริ่มจากการสร้าง heterodimer ของ Mut L ที่สร้างจาก *MLH1* และ *PMS2* ซึ่งพอพบว่ามี mismatch เกิดขึ้น Mut S ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ *MSH2* และ *MSH6* จะจับกับ DNA ที่เป็น heteroduplex จากนั้นจะกระตุ้น endonuclease activity ของ *PMS2* ให้ตัดส่วนของ DNA ที่มี mismatch ออกไป และมีขบวนการในการซ่อมแซมต่อไป ส่วนของ Mut L นั้นพบว่าจับกับ DNA polymerase III ดังนั้นสันนิษฐานว่า Mut L มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานของ DNA polymerase III และอาจเกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis ด้วย (Lindgren et al., 2001)

2. การสูบบุหรี่ เป็นปัจจัยเสี่ยงอีกทางหนึ่งที่ทำให้เป็นโรคมะเร็งลำไส้และยังรวมถึงผู้ที่สูบบุหรี่และไปป์ (Ernest et al., 1967) แต่ผู้ที่มีความเสี่ยงสูงจะขึ้นอยู่กับประวัติการสูบบุหรี่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ที่สูบบุหรี่เป็นเวลานาน โดยจากการศึกษาพบว่าการสูบบุหรี่จะมีผลต่อการเกิด adenomatous polyps (Giovannucci et al., 1994) ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ ส่วนมากจะพบในเพศชายที่สูบบุหรี่ (Giovannucci et al., 1996)

3. การดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ จากการศึกษาของ Potter (1997) ผู้ที่ดื่มแอลกอฮอล์เป็นประจำทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ โดยเฉพาะในกลุ่มของเพศชายมากกว่าเพศหญิง

4. อาหาร การบริโภคอาหารที่แตกต่างกันทำให้มีความเสี่ยงทำให้เกิดโรคมะเร็งลำไส้ เช่น การบริโภคอาหารจำพวกเนื้อแดงสูง แต่มีการบริโภคอาหารจำพวกผัก ผลไม้ และอาหารที่มีเส้นใยต่ำ (Heavey et al., 2004) มีรายงานเกี่ยวกับผู้หญิงที่มีการบริโภคอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ในปริมาณมาก จะมีความเสี่ยงเป็นโรคมะเร็งลำไส้มากกว่าผู้หญิงที่มีการบริโภคเนื้อสัตว์ในปริมาณน้อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Potter, 1997) การบริโภคเนื้อแดงและเนื้อสัตว์ปรุงสุก เช่น การทอด และระดับการสุกของเนื้อ พบว่าผู้บริโภคมีความเสี่ยงในการเป็นโรคมะเร็งลำไส้ต่อการเพิ่มขึ้นของ adenomatous polyps (Sinha et al., 1999) ผู้ที่รับประทานอาหารจำพวกผัก ผลไม้ สามารถลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ได้เกือบ 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่รับประทานอาหารที่มีเส้นใยต่ำ (Heavey et al., 2004)

5. การออกกำลังกาย การออกกำลังกายมีความสัมพันธ์ระหว่างการลดหรือเพิ่มความเสี่ยงเป็นโรคมะเร็งลำไส้ จากการศึกษาของ Potter (1997) พบว่าผู้ที่ออกกำลังกายเป็นประจำจะช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ โดยทำการศึกษากับผู้หญิงกลุ่มหนึ่งที่เข้าร่วมทำกิจกรรมมีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ต่ำ (Samad et al., 2005) และพบกลุ่มเสี่ยงเป็นโรคมะเร็งลำไส้ในกลุ่มของผู้ที่ไม่ออกกำลังกาย แต่การศึกษายังพบว่าการออกกำลังกายที่เพิ่มขึ้นไม่ได้ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ (Calton et al., 2006)

6. อายุ ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้จะมีอายุมากกว่า 65 ปี ซึ่งจะพบผู้ป่วยมะเร็งลำไส้เล็กน้อยมากในช่วงอายุน้อยกว่า 45 ปี ประมาณ 2 ต่อ 100,000 คนต่อปี ส่วนในกลุ่มอายุ 45-50 ปี มีอัตราการเพิ่มขึ้นของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ประมาณ 20 ต่อ 100,000 คนต่อปี (Lyon, 2001)

ระยะของมะเร็งลำไส้

มะเร็งลำไส้สามารถแบ่งออกเป็นระยะตั้งแต่ระยะ 0 ถึง 4 ตามการเจริญเติบโตของเนื้อมะเร็งจากผนังลำไส้ไปยังต่อมน้ำเหลืองและอวัยวะอื่นๆ โดยแบ่งเป็นระยะดังนี้

Stage 0

ในระยะ 0 นี้เซลล์ที่ผิดปกติจะพบเฉพาะบริเวณชั้นผิวเยื่อของลำไส้ใหญ่ (lamina propria) เท่านั้น หากปล่อยทิ้งไว้ก็จะมีการลุกลามไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียงได้ในระยะถัดไป ซึ่งระยะ 0 นี้เรียกอีกอย่างว่า *carcinoma in situ*

Stage I

ในระยะ 1 นี้เซลล์มะเร็งจะมีการลุกลามจากเนื้อเยื่อชั้นในสุดของผนังลำไส้ใหญ่ไปยังเนื้อเยื่อในชั้นกลาง ระยะ 1 นี้เรียกอีกอย่างว่า Dukes A colon cancer

Stage II

ในระยะที่ 2 นี้สามารถแบ่งออกได้เป็น ระยะ 2A และ 2B

ระยะ 2A เซลล์มะเร็งมีการลุกลามผ่านเนื้อเยื่อชั้นกลางของผนังลำไส้ใหญ่ หรือไปยังเนื้อเยื่อบริเวณใกล้เคียง ลำไส้ใหญ่และลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย

ระยะ 2B เซลล์มะเร็งมีการลุกลามไปยังอวัยวะใกล้เคียง ลำไส้ใหญ่ และหรือไปยังเยื่อในช่องท้อง (visceral peritoneum) ระยะที่ 2 นี้ บางครั้งอาจเรียกว่า Dukes B colon cancer

Stage III

ในระยะที่ 3 นี้สามารถแบ่งออกได้เป็น ระยะ 3A, 3B และ 3C

ระยะ 3A เซลล์มะเร็งมีการลุกลามจากเนื้อเยื่อชั้นในสุดของผนังลำไส้ใหญ่ ไปยังเนื้อเยื่อในชั้นกลางร่วมกับ มีการลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียงไม่เกิน 3 ต่อมน

- ระยะ 3B เซลล์มะเร็งมีการลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียงไม่เกิน 3 ต่อมน
- มีการลุกลามผ่านเนื้อเยื่อชั้นกลางของผนังลำไส้ใหญ่
- มีการลุกลามไปยังเนื้อเยื่อบริเวณใกล้เคียง ลำไส้ใหญ่และลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย
- มีการลุกลามไปยังอวัยวะใกล้เคียง ลำไส้ใหญ่ และหรือไปยังเยื่อในช่องท้อง

(visceral peritoneum)

- ระยะ 3C เซลล์มะเร็งมีการลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียงตั้งแต่ 4 ต่อมนขึ้นไป ร่วมกับ
 - มีการลุกลามผ่านเนื้อเยื่อชั้นกลางของผนังลำไส้ใหญ่ หรือ
 - มีการลุกลามไปยังเนื้อเยื่อบริเวณใกล้เคียง ลำไส้ใหญ่ และลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย หรือ
 - มีการลุกลามไปยังอวัยวะใกล้เคียง ลำไส้ใหญ่และหรือไปยังเยื่อในช่องท้อง (visceral peritoneum) ระยะที่ 3 นี้อาจเรียกว่า Duke C colon cancer

Stage IV

ในระยะที่ 4 นี้เซลล์มะเร็งจะมีการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียง และการกระจายไปยังอวัยวะอื่นที่อยู่ห่างไกลออกไป เช่น ตับหรือปอด ในระยะนี้บางครั้งอาจเรียกว่า Dukes D colon cancer

โรคมะเร็งตับ

ตับเป็นอวัยวะที่ใหญ่ที่สุดในร่างกาย ซึ่งถูกล้อมรอบด้วยแคปซูลที่มีลักษณะเหมือนเส้นใยและแบ่งเป็นชิ้นส่วนที่แยกออกมาที่เรียกว่า lobes จะอยู่ภายในช่องท้องข้างขวามือ โดยจะถูกล้อมรอบด้วยซี่โครงเพื่อป้องกันอันตรายต่อตับ ตับเป็นอวัยวะที่มีความสำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลและไขมันในร่างกายเพื่อให้ร่างกายสามารถนำมาใช้เป็นพลังงาน ช่วยกำจัดสารพิษที่เป็นอันตรายออกจากเลือด ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์และน้ำดีช่วยในการย่อยอาหาร และนอกจากนั้นยังเปลี่ยนอาหารให้เป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต (National cancer institute, 2009)

โรคมะเร็งตับเป็นมะเร็งชนิดหนึ่งที่เกิดภายในเนื้อเยื่อตับ ทำให้ตับมีลักษณะผิดปกติและตับไม่สามารถทำงานได้ (American cancer society, 2012) โรคมะเร็งตับจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ชนิดดังนี้

1. มะเร็งตับที่เกิดขึ้นในตับเอง หรือที่เรียกว่ามะเร็งตับปฐมภูมิ (Primary liver cancer) นั้น แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

1.1 มะเร็งเซลล์ตับ Hepato-cellular carcinoma (HCC) เป็นมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดในผู้ใหญ่ ซึ่งมีเซลล์เฮปาโตไซท์ (hepatocyte) เป็นต้นกำเนิด โดยที่ HCC จะสามารถมีรูปแบบการเจริญที่แตกต่างกัน จะเริ่มต้นเป็นเพียงเนื้องอกก้อนเดียวเริ่มมีขนาดใหญ่ จากนั้นก็จะ

แพร่กระจายไปทั่วตับ แต่บางคนอาจเริ่มต้นหลายๆ จุด ทั่วบริเวณไม่เป็นเพียงเนื้องอกก้อนเดียว ซึ่งเมื่อเกิดความเสียหายต่อตับอย่างต่อเนื่องทำให้กลายเป็นโรคตับแข็ง (cirrhosis) (American cancer society, 2012)

1.2 มะเร็งท่อน้ำดี (Cholangio carcinoma) เป็นมะเร็งที่เริ่มต้นจากท่อน้ำดี

2. มะเร็งทุติยภูมิ (Secondary liver cancer) หรือ เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า มะเร็งระยะแพร่กระจาย (metastatic cancer) คือ มะเร็งที่แพร่กระจายมาจากอวัยวะอื่น เช่น ปอด ตับ ลำไส้ โดยไม่ถือว่าเป็นมะเร็งตับ

ปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งตับ

1. การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV) หรือไวรัสตับอักเสบซี (HCV) หลังจากการติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดเป็นเวลาหลายปีจะสามารถพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับได้ ทั่วทั้งโลกพบว่าผู้ที่ติดเชื้อไวรัส HBV หรือ HCV ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคมะเร็ง โดยเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV) หรือไวรัสตับอักเสบซี (HCV) สามารถติดเชื้อจากคนสู่คนโดยผ่านทางเลือด เช่น การใช้เข็มร่วมกัน และทางเพศสัมพันธ์ ทารกสามารถติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหรือไวรัสตับอักเสบซีผ่านทางแม่ ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV) หรือไวรัสตับอักเสบซี (HCV) จะไม่แสดงอาการ ปัจจุบันจะตรวจสอบการติดเชื้อจากการตรวจเลือด ผู้ที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี หรือ ไวรัสตับอักเสบซี จะมีการป้องกันโดยการใช้วัคซีน (National cancer institute, 2009)

2 เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ พบว่าผู้ที่ดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ในปริมาณมาก และดื่มทุกวันเป็นเวลาหลายปี จะเป็นการเพิ่มปัจจัยเสี่ยงให้เป็นโรคมะเร็งตับ โดยพบจำนวนผู้ที่ดื่มแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นการเพิ่มปัจจัยเสี่ยงต่อโรคมะเร็งตับ (National cancer institute, 2009)

3. อะฟลาทอกซิน โรคมะเร็งตับอาจมีสาเหตุมาจากสารอะฟลาทอกซิน เป็นสารที่สร้างจากเชื้อราบางชนิด เช่น เชื้อราแอสเพอจีริสฟลาวัส (*Aspergillus flavus*) ที่ปนเปื้อนในอาหารที่เก็บไม่ถูกต้อง เช่น ถั่วลิสง ข้าวโพด และยังพบได้ในข้าวกล้องหรือแม้แต่พริกแห้งอีกด้วย ซึ่งจัดเป็นสารก่อมะเร็ง โดยจะจับกับดีเอ็นเอของเซลล์ตับทำให้เกิดการกลายพันธุ์จนเกิดโรคมะเร็งตับ ในที่สุด ถ้ามีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอยู่แล้ว ไวรัสจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของตับ เป็น

ระยะตั้งต้นของขบวนการเกิดโรคมะเร็ง ส่วนสารอะฟลาทอกซินเป็นปัจจัยเสริมทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งตับสูงขึ้น (Thailand Cancer Rehabilitation Club, 2553)

4. Iron storage disease เป็นโรคที่ร่างกายเกิดความผิดปกติ มีการสะสมธาตุเหล็กมากเกินไปในตับและอวัยวะอื่นๆ เกิดการพัฒนาเป็นโรคมะเร็งตับได้

5. โรคอ้วนและเบาหวาน เป็นอีกกรณีปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งตับได้ (National cancer institute, 2009)

ระยะของโรคมะเร็งตับ

มีทั้งหมด 4 ระยะ (Morrow et al., 2012)

Stage I

ในระยะที่ 1 (localized และ resectable) เป็นเนื้องอกเพียงก้อนเดียวอยู่บริเวณตับ วัณขนาดน้อยกว่า 2 เซนติเมตร ในระยะนี้สามารถผ่าตัดออกได้ ไม่มีการแพร่กระจายไปยังหลอดเลือด

Stage II

ในระยะที่ 2 เนื้องอกมีเพียงก้อนเดียว หรือมีเนื้องอกหลายก้อน แต่ละก้อนมีขนาดเล็กกว่า 2 เซนติเมตร ซึ่งอยู่เฉพาะตับซ้ายหรือตับขวา อย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น หรือเนื้องอกมีเพียงก้อนเดียว แต่มีขนาดมากกว่า 2 เซนติเมตร แต่ไม่มีการลุกลามเข้าสู่เส้นเลือด

Stage III

ในระยะที่ 3 ถูกแบ่งออกเป็นระยะ 3A และ 3B

ระยะ 3A เป็นระยะที่ยังไม่แพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ หรือไปยังต่อมน้ำเหลือง แต่อย่างไรก็ตามอยู่ 2 สถานการณ์ที่อาจเกิดขึ้นได้

- เนื้องอกก้อนเดียวที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 เซนติเมตร เส้นเลือดที่อยู่รอบๆ เนื้องอกจะได้รับผลกระทบ

- มีเนื้องอกจำนวนน้อยที่วัดได้ขนาดได้ 2 เซนติเมตร หรือน้อยกว่า 2 เซนติเมตร พบอยู่บริเวณกลีบตับเดียวกันและอาจมีผลกระทบต่อหลอดเลือดที่อยู่ใกล้เคียง

ระยะ 3B ในระยะนี้เนื้องอกจะมีขนาดใหญ่ อาจจะมีผลกระทบต่อหลอดเลือด หรือไม่มีก็ได้และมะเร็งได้แพร่กระจายไปยังหลอดเลือดน้ำเหลืองที่อยู่ติดกับมะเร็งแต่ไม่แพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ

Stage IV

ในระยะที่ 4 ถูกแบ่งออกเป็นระยะ 4A และ 4B

ระยะ 4A ในระยะนี้มะเร็งจะกระจายไปทั่วตับอาจแพร่กระจายไปยังหลอดเลือดน้ำเหลือง อวัยวะใกล้เคียง และเยื่อหุ้มช่องท้อง จากนั้นก็จะแพร่กระจายไปยังเส้นเลือดหลัก (portal vein และ hepatic artery)

ระยะ 4B ในระยะนี้มะเร็งจะแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือด เข้าสู่กลีบอื่นๆ และเข้าสู่อวัยวะอื่นๆ แพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ห่างจากจุดที่เป็นมะเร็ง

การรักษาโรคมะเร็ง

1. การผ่าตัด

ศัลยแพทย์จะตัดเอาก้อนมะเร็ง ร่วมกับลำไส้ใหญ่ปกติที่หุ้มก้อนมะเร็งอยู่ออกไป เพื่อให้มั่นใจว่าสามารถกำจัดเซลล์มะเร็งได้หมด ทั้งนี้ต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียงก้อนมะเร็งจะถูกตัดออกพร้อมกัน เพื่อส่งตรวจหาเซลล์มะเร็ง ศัลยแพทย์สามารถทำการผ่าตัดผ่านแผลผ่าตัดที่มีขนาดเล็ก ประมาณ 3 – 4 เซนติเมตร ด้วยเครื่องมือที่ได้รับการออกแบบพิเศษ โดยให้ผลการรักษาเทียบเท่าการผ่าตัดแบบดั้งเดิมที่ใช้แผลผ่าตัดที่ยาวกว่ามากประมาณ 20 – 25 เซนติเมตร ข้อดีของการผ่าตัดด้วยวิธีนี้ คือ ผู้ป่วยสามารถฟื้นตัวและทำกิจกรรมประจำวันตามปกติได้เร็วขึ้น

ทั้งนี้ผู้ป่วยแต่ละรายนั้นอาจจะมีรายละเอียดของการผ่าตัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้ที่แตกต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับระยะของโรค (staging) และความสมบูรณ์แข็งแรงของร่างกายผู้ป่วย ศัลยแพทย์จะเป็นผู้ประเมิน และวางแผนการรักษาร่วมกับผู้ป่วยและญาติต่อไป

2. เคมีบำบัด

เคมีบำบัด เป็นยาที่สามารถช่วยทำลายเซลล์มะเร็งที่อาจหลงเหลืออยู่ให้ลดจำนวนลงหรือหมดไป ส่วนใหญ่ใช้ภายหลังการผ่าตัด บางกรณีอาจใช้เพื่อควบคุมไม่ให้มะเร็งมีขนาดโต

ขึ้น ช่วยผู้ป่วยให้มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น หรืออาจใช้ร่วมกับรังสีรักษา ผลข้างเคียงของเคมีบำบัด คือ คลื่นไส้ อาเจียน แผลในปาก เพื่อย ผื่น และท้องเสีย เป็นต้น

3. รังสีรักษา

รังสีรักษา คือ พลังงานชนิดหนึ่งที่สามารถช่วยทำลายเซลล์มะเร็ง ส่วนใหญ่จะให้ภายหลังการผ่าตัด บางกรณีสามารถใช้ลดขนาดของก้อนมะเร็งก่อนการผ่าตัด ทำให้การผ่าตัดง่ายขึ้น และให้ผลการรักษาที่ดีขึ้น ผู้ป่วยในระยะแพร่กระจาย หรือก้อนมะเร็งมีขนาดใหญ่ รังสีรักษาอาจช่วยให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น และสามารถใช้ร่วมกับเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ ระยะที่ 2 ก่อนหรือหลังการผ่าตัด ปัจจุบันการรักษามะเร็งลำไส้ด้วยยาที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น การใช้ยาที่ออกฤทธิ์เฉพาะ (targeted drug therapy) ที่ยับยั้งโดยตรงต่อกลไกการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง เช่น ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ที่ลำเลียงสารอาหารสู่ก้อนมะเร็ง และยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง เป็นต้น ชนิดของยาที่ใช้ในการต้านมะเร็งยกตัวอย่าง เช่น bevacizumab, cetuximab และ panitumumab ซึ่งหากใช้ยากลุ่มนี้ร่วมกับยาเคมีบำบัดจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคให้เพิ่มขึ้นอีกด้วย (โรงพยาบาลกรุงเทพ, 2555)

4. ภูมิคุ้มกันบำบัด

ภูมิคุ้มกันบำบัดเป็นแนวทางการรักษาที่คาดว่าจะได้ผลดีที่สุด เนื่องจากปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันเป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูง จะทำลายแต่เฉพาะมะเร็งที่จำเพาะกันเท่านั้น (สิริฤกษ์, 2537) โดยหลักการในการรักษา คือ จะเพิ่มประสิทธิภาพการของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในการกำจัดเซลล์มะเร็งให้ดียิ่งขึ้น โดยจะถูกแบ่งออกเป็น

1. Non tumour-specific immunotherapy เป็นการใช้สารที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทั่ว ๆ ไป โดยเฉพาะระบบภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (CMI) ทำให้ macrophage หรือ T cell ทำงานได้ดีมากขึ้น กระตุ้นการสร้างและการหลั่ง lymphokines ชนิดต่างๆ กระตุ้น macrophage ให้กลายเป็น activated macrophage ซึ่งสามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น เป็นต้น การกระตุ้นอาจทำได้โดยการฉีดสารเข้าไปในก้อนมะเร็งโดยตรง หรือทาบนผิวของก้อนมะเร็งเพื่อให้เกิดผลเฉพาะที่ หรือนิยักร่างกายเพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทั่วร่างกาย สารที่ใช้ฉีดดังกล่าวนี้จะเรียกว่า immunoadjuvant เช่น BCG (mycobacterium bovis, BCG strain) สารเคมี dinitrochlorobenzene (DNCB) และ corynebacterium parvum ซึ่งใช้ได้ดีกับมะเร็งเม็ดเลือดขาว และมะเร็งผิวหนังชนิด malignant melanoma สารอื่นๆ ที่สามารถใช้ได้ ได้แก่ cell wall skeleton

ของ BCG, nocardia polysaccharides ที่เตรียมจากเห็ด สารน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น bestatin, levamisole, vitamin A derivatives และ muramyl dipeptide (MDP) เป็นต้น นอกจากนี้มีการใช้สาร lymphokines และสารน้ำอื่นๆ ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเรียกว่า biologic response modifier (BRM) เช่น IL-2, TNF และ IFN เป็นต้น ตัวอย่างการใช้ BRM เช่น การใช้ IFN ในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด hairy cell leukemia

2. Tumour-specific therapy เป็นการกระตุ้นหรือสร้างเสริมภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อมะเร็งชนิดนั้นๆ ซึ่งมีได้หลายรูปแบบด้วยกัน คือ active vaccination เป็นการฉีดวัคซีนที่ทำจากเซลล์มะเร็งหรือชิ้นส่วนของเซลล์ หรือฉีด anti-idiotypic antibody เพื่อให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันต่อเซลล์มะเร็งนั้นๆ adoptive transfer เป็นการให้เซลล์ที่มีความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็ง ซึ่งมี 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

T cell clone เป็นการนำ T cell ที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนนอกร่างกายจนมีปริมาณมากพอ จากนั้นจึงฉีดกลับเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วย

LAK cell เป็นการนำเอาลิมโฟไซต์มาเลี้ยงนอกร่างกายแล้วกระตุ้นด้วย IL-2 เซลล์จะเปลี่ยนแปลงเป็น lymphokine-activated killer cell (LAK cell) แล้วจึงฉีดกลับเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วย

Tumour infiltrating lymphocyte เป็นการแยกเอาเซลล์ลิมโฟไซต์ที่อยู่รอบๆ ก้อนมะเร็ง เชื่อว่าเซลล์เหล่านี้จะจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งและมีความสามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้สูง โดยนำมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนนอกร่างกายแล้วกระตุ้นด้วย IL-2 เช่นเดียวกับในกรณีของ LAK cell โดยจะพบว่ามีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็งได้สูงกว่า LAK cell ธรรมดา

Passive immunotherapy เป็นการใช้อะนติบอดีที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งฉีดเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วย ในปัจจุบันสามารถที่จะผลิต monoclonal antibody (mAb) ที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งได้ เมื่อฉีด mAb เข้าสู่ร่างกายก็จะไปจับกับเซลล์มะเร็งแล้วมีการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ แล้วมีกระบวนการ opsonized phagocytosis ทำลายเซลล์มะเร็งได้ หรืออาจเพิ่มประสิทธิภาพของ mAb ได้โดยการติดฉลากด้วยสารต่าง ๆ ที่มีคุณสมบัติในการทำลายเซลล์ เช่น สารรังสี (radioactive substance) สารพิษ (toxin) หรือยาพิษ (cytotoxic drug) เป็นต้น เรียกแอนติบอดีที่ติดสารต่าง ๆ เหล่านี้ว่า immunotoxin

ข้าว

ข้าวเป็นหนึ่งในธัญพืชที่มีความสำคัญมากที่สุดในโลก เนื่องจากข้าวจัดเป็นอาหารหลักของคนครึ่งของโลก โดยเฉพาะประชากรในทวีปเอเชีย ข้าวเป็นพืชตระกูลหญ้า จัดอยู่ในสกุลออไรซา (*Genus Oryza*) สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในเขตร้อน (tropical zone) และเขตอบอุ่น (temperate zone) ข้าวในสกุลออไรซามีถึง 20 ชนิด โดยปกติข้าวที่ขึ้นในท้องที่ต่างๆ มีเพียง 3 ชนิดใหญ่ คือ ออไรซา ซาไทวา (*Oryza sativa*) ซึ่งพบแหล่งกำเนิดในทวีปเอเชียและมีการปลูกทั่วไปในเขตต่างๆ ของโลก ออไรซา กลาเบอริมา (*Oryza glaberrima*) ซึ่งมีแหล่งกำเนิดและเพาะปลูกเฉพาะในแอฟริกา และข้าวป่า (wild rice) ซึ่งเป็นข้าวที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในประเทศต่างๆ ของทุกทวีปที่ปลูกข้าว เช่น ออไรซา เพอเรนนิส (*Oryza perennis*) ออไรซา ออฟฟิซินาลิส (*Oryza officinalis*) ออไรซา สปอนทาเนีย (*Oryza spontanea*) และมีเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่นำมาเพาะปลูกเป็นอาหารเพื่อใช้ในการบริโภค คือ ออไรซา ซาไทวา (*Oryza sativa*) และ ออไรซา กลาเบอริมา (*Oryza glaberrima*) โดยข้าวเป็นพืชที่สามารถปลูกได้ในสภาพน้ำท่วมได้ เนื่องจากต้นข้าวมีความสูง 80-130 เซนติเมตร อาจมีความสูงได้ถึง 5 เมตร ในพันธุ์ข้าวขึ้นน้ำ การขยายพันธุ์ข้าวจะขยายพันธุ์ด้วยการใช้เมล็ดในการเพาะปลูกในแปลงปลูกโดยตรง หากเป็นดินแห้งจะทำการเพาะปลูกแบบหยอดเมล็ด หรือการหว่านข้าวแห้ง ส่วนดินที่มีน้ำขังจะใช้วิธีการปัก การเจริญเติบโตของต้นข้าวจะมีระบบรากเป็นแบบรากฝอย มีรากพิเศษเจริญออกมาจากโคนต้น ลำต้นจะเจริญเป็นแบบแตกกอ ข้อดอกของข้าวจะเป็นแบบข้อแยกแขนงยาว 9 - 40 เซนติเมตร มีเกสรเพศผู้ 6 อัน มีรังไข่ 1 อัน ข้าวเป็นพืชที่ผสมตัวเอง ผลแบบธัญพืช (caryopsis หรือ grain) รูปร่างขนาดและสีจะแตกต่างกันออกไปตามสายพันธุ์ โดยลักษณะรูปร่างทั่วไปจะเป็นรูปไข่ รูปรี หรือทรงกระบอก (ชาญ, 2536; Vergara and De Datta, 1996) ส่วนที่นำไปบริโภคจะเป็นส่วนของเมล็ดข้าว ในส่วนของเมล็ดข้าวจะมีองค์ประกอบดังนี้ องค์ประกอบของเมล็ดข้าว ประกอบด้วย 2 ส่วนใหญ่

1. เปลือกหุ้มเมล็ดหรือแกลบ (Hull หรือ Husk) ซึ่งจะหุ้มข้าวกล้องมีอยู่ 2 ส่วน คือ กลีบดอกใหญ่หรือ เปลือกใหญ่ (lemma) ในส่วนนี้อาจจะมีหาง (awn) หรือไม่มีก็ได้ และ กลีบดอกเล็กหรือเปลือกเล็ก (palea) เป็นส่วนที่หุ้มเนื้อผลด้านหลัง กลีบดอกใหญ่ ทั้ง 2 ส่วนเมื่อผ่านกระบวนการสีข้าวจะเรียกว่าแกลบ

2. ข้าวกล้อง เมื่อผ่านกระบวนการสีข้าวเอาเปลือกด้านนอกออกจะพบส่วนที่เป็นเมล็ดด้านเรียกว่าข้าวกล้องจะพบเยื่อหุ้มผล (pericarp layer) และเยื่อหุ้มเมล็ดชั้นใน (seed coat หรือ testa) จะมีสีน้ำตาลอ่อน ถัดไปจะเป็นส่วนของ nucellus และ alerone layer) จะห่อหุ้มส่วนแป้งและจมูกข้าว เมื่อกระบวนการสีข้าวเสร็จสิ้นส่วนเยื่อหุ้มเหล่านี้จะถูกขัดออก เป็นส่วนที่เรียกว่ารำข้าว

จะเหลือเพียงเมล็ดที่เรียกว่าข้าวสาร โดยเมล็ดข้าวมีส่วนประกอบที่สำคัญหลักคือ จมูกข้าวหรือคัพพะ (embryo หรือ germ) และเมล็ดข้าวขาวหรือเมล็ดข้าวสาร (endosperm)

จมูกข้าวหรือคัพพะ (Embryo หรือ Germ) จะประกอบไปด้วยต้นอ่อนหรือเรดิเคิล (radical) รากอ่อนหรือพลูมิล (plumile) เชื้อหุ้มต้นอ่อน (coleoptiles) เชื้อหุ้มรากอ่อน (coleorhizae) ท่อน้ำท่ออาหาร (epiblast) และใบเลี้ยง (scutellum) คัพพะเป็นส่วนที่มีโปรตีนและไขมันสูง คัพพะจะเป็นส่วนที่จะเจริญเป็นต้นต่อไป

เมล็ดข้าวขาวหรือเมล็ดข้าวสาร (endosperm) ซึ่งเป็นส่วนที่นำมาบริโภคจะประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นแป้ง (starch endosperm) หรือส่วนที่เป็นข้าวสาร อยู่ชั้นในสุดของเมล็ด ประกอบด้วยแป้งเป็นส่วนใหญ่และมีโปรตีนอยู่บ้าง แป้งในเมล็ดข้าวมี 2 ชนิด คือ amylase และ amylopectin

ประเภทของข้าว

การแบ่งประเภทของข้าวจะแบ่งออกตามลักษณะการบริโภค หรือชนิดของแป้ง และตามลักษณะการเจริญเติบโต

แบ่งตามลักษณะการบริโภคสามารถหรือชนิดของแป้งแบ่งออกได้ 2 ประเภท

1. ข้าวเหนียว (glutinous rice หรือ waxy rice) เมล็ดข้าวเมื่อผ่านกระบวนการสีข้าวแล้ว เมล็ดข้างในจะมีสีขาวขุ่น เมื่อผ่านการนึ่งให้สุกแล้วเมล็ดข้าวจะจับตัวติดกันเหนียวแน่นและมีลักษณะใส จะมีการบริโภคส่วนใหญ่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือของประเทศไทย ในข้าวเหนียวจะประกอบไปด้วยแป้งชนิดอะไมโลเพ็คติน (amylopectin) เป็นส่วนใหญ่ จะมีแป้งอะไมโลส (amylose) อยู่เพียงเล็กน้อยหรือไม่มีเลย

2. ข้าวเจ้า (nonglutinous rice) เมล็ดข้าวเมื่อผ่านการสีข้าวเมล็ดข้างในจะมีสีขาวใส เมื่อนำไปหุงหรือนึ่งให้สุก เมล็ดจะมีสีขาวขุ่นและร่วนกว่าข้าวเหนียว ข้าวเจ้าแต่ละพันธุ์เมื่อหุงสุกแล้วจะมีความนุ่มเหนียวแตกต่างกัน มีการบริโภคเป็นส่วนใหญ่ในภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทย ในข้าวเจ้าจะประกอบด้วยแป้งอะไมโลสอยู่ประมาณ 7 – 33 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือจะเป็นอะไมโลเพ็คติน

แบ่งตามลักษณะการเจริญเติบโตที่เกี่ยวกับพื้นที่การปลูกแบ่งได้เป็น 3 ประเภท

1. ข้าวไร่ เป็นข้าวที่ขึ้นได้ในที่ดอนหรือที่สูงตามไหล่เขา ไม่ต้องมีน้ำขัง อาศัยน้ำจากน้ำค้าง น้ำฝน และความชื้นในดิน สามารถเจริญเติบโตออกรวงให้ผลผลิตได้ จึงถือได้ว่าข้าวไร่เป็นข้าวที่มีความสามารถในการทนแล้งได้ดีกว่าข้าวประเภทอื่น นิยมปลูกในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้

2. ข้าวสวน เป็นข้าวที่ขึ้นได้ดีในนาที่มีน้ำขัง และระดับน้ำจะต้องไม่ลึกเกิน 1 เมตร ข้าวสวนนี้จะมีการเพาะปลูกมาก โดยพบว่าการปลูกทั่วประเทศ

3. ข้าวขึ้นน้ำ เป็นข้าวที่สามารถเจริญเติบโตได้ในนาที่มีระดับน้ำลึก บางครั้งลึกถึง 3 เมตร ลักษณะพิเศษจะมีความสามารถในการยืดปล้องให้ลำต้นยาวขึ้นตามระดับน้ำที่สูงขึ้น คุณภาพของเมล็ดจะต่ำเนื่องจากนาสำหรับปลูกข้าวประเภทนี้มีระดับน้ำลึกมาก ทำให้การดูแลยาก ข้าวประเภทนี้มีพื้นที่การเพาะปลูกรองลงมาจากข้าวนาสวน โดยนิยมปลูกในภาคกลาง มีการเพาะปลูกเล็กน้อยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

แบ่งตามลักษณะการเจริญเติบโตที่เกี่ยวกับแสงแดดหรือต่อช่วงแสง แบ่งได้เป็น 2 ประเภท

1. ข้าวไวแสง (photoperiod sensitive rice) เป็นข้าวที่กำหนดออกดอกที่แน่นอนหรือถ้าคลาดเคลื่อนก็เพียงเล็กน้อย ถึงแม้จะปลูกในเวลาต่างกัน ข้าวไวแสงจัดเป็นพืชวันสั้นจะออกดอกในเวลาเที่ยงวันสั้นกว่ากลางวัน จะปลูกเป็นข้าวนาปี ปลูกในฤดูฝนเพื่อให้ออกดอกในฤดูหนาวเนื่องจากในฤดูหนาวช่วงเวลากลางวันจะสั้นกว่า 12 ชั่วโมง ข้าวประเภทนี้จะแบ่งแยกย่อยไปอีกคือ ข้าวเบา ข้าวกลาง และข้าวหนัก ข้าวเบาเป็นข้าวที่ออกดอกระหว่างเดือนกันยายน - ตุลาคม เป็นข้าวที่ไวต่อช่วงแสงน้อย ข้าวกลางออกดอกระหว่างปลายเดือนตุลาคม - พฤศจิกายน ส่วนข้าวหนักจะออกดอกในเดือนธันวาคม - มกราคม โดยพบว่าข้าวพื้นเมืองของประเทศไทยส่วนใหญ่จะถูกจัดอยู่ในกลุ่มข้าวประเภทนี้

2. ข้าวไมไวต่อแสง (photoperiod insensitive rice) เป็นข้าวที่ออกดอกตามอายุการปลูกสามารถปลูกได้ตลอดทั้งปีเพียงแค่นี้เพียงพอต่อการเจริญเติบโต จะได้ผลผลิตดีที่สุดหากทำการปลูกข้าวในฤดูกาลทำนาปรัง คือ ฤดูร้อน เพราะมีแสงมากกว่าฤดูอื่น อายุการปลูกอยู่ที่ 110 - 120 วัน ข้าวที่ปลูกในประเทศไทยจะเป็นพันธุ์ข้าวที่ผสมพันธุ์ระหว่างข้าวไทยกับข้าวจากต่างประเทศ

ในปัจจุบันนี้เกษตรกรในประเทศไทยหันมาสนใจเกษตรอินทรีย์กันมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากมนุษย์มีความห่วงใยในสุขภาพของตนมากขึ้น ด้วยเหตุที่ว่าผลผลิตทางการเกษตรใน

ปัจจุบันพบว่าการตกค้างของสารพิษจากปุ๋ยเคมีและยาฆ่าแมลง ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์เป็นอย่างมาก ดังนั้นมนุษย์จึงหันมาบริโภคพืชที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ ในข้าวก็เช่นเดียวกัน เพราะข้าวถือเป็นอาหารหลักของประชากรทั่วไป ทำให้เกษตรกรต้องหันมาปลูกข้าวแบบอินทรีย์เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค นิยามของเกษตรอินทรีย์ หรือ organic farming ซึ่งเป็นระบบเกษตรกรรมชนิดหนึ่งซึ่งมีพัฒนาการยาวนานและอาจถือได้ว่าเป็นระบบเกษตรกรรมยั่งยืน ซึ่งมีการส่งเสริมให้ทำการเพาะปลูกข้าวอินทรีย์ (organic rice) โดยมีหลักการผลิตข้าวอินทรีย์ดังนี้ การปลูกข้าวอินทรีย์เป็นระบบการผลิตข้าวที่ไม่ใช้สารเคมีทางการเกษตรทุกชนิด ผลผลิตที่ได้จะปลอดภัยจากสารพิษ การปลูกข้าวอินทรีย์จะเน้นเรื่องธรรมชาติ การฟื้นฟูความอุดมสมบูรณ์ของธรรมชาติ การรักษาสมดุลธรรมชาติ และการใช้ประโยชน์จากธรรมชาติเพื่อการผลิตอย่างยั่งยืน อาทิเช่น การใช้ปุ๋ยอินทรีย์ในไร่นาหรือจากแหล่งอื่น การจัดการสภาพแวดล้อมไม่ให้เหมาะสมต่อการระบาดของโรค แมลงและศัตรูข้าว เป็นต้น โดยวิธีผสมผสานที่ไม่ใช้สารเคมี การเลือกข้าวสำหรับปลูกให้เหมาะสมกับพื้นที่นั้นๆ ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ข้าวอินทรีย์เพื่อทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

คุณค่าทางโภชนาการและสารประกอบต่างๆ ในเมล็ดข้าว

1. แกลบ เป็นผลพลอยได้จากการสีข้าว มีอยู่ประมาณ 20 – 24 เปอร์เซ็นต์ ของเมล็ดข้าว โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่ในแกลบจะประกอบไปด้วย โปรตีน ไขมัน เยื่อใย คาร์โบไฮเดรต เถ้า สารซิลิกา แคลเซียม ฟอสฟอรัส ลิกนิน เซลลูโลส เพนโตแซน เฮมิเซลลูโลส และอื่นๆ (กรมการข้าว, 2557)

2. ข้าวกล้อง คือ เมล็ดข้าวที่ผ่านการสีเอาเปลือกออกแต่ไม่ได้ผ่านการขัดสี เมื่อนำข้าวกล้องไปทำให้งอก ในข้าวกล้องงอกจะมีส่วนประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญหลายชนิด อาทิเช่น γ -aminobutyric acid (GABA) เส้นใยอาหาร (dietary fibre) ferulic acid, tocotrienols แมกนีเซียม โพแทสเซียม สังกะสี γ -oryzanol (Kayahara et al., 2000) หากนำข้าวกล้องมาขัดเอาผิวออกจะได้ส่วนที่เป็นรำหยาบและจมูกข้าวประมาณ 5 – 8 เปอร์เซ็นต์ รำละเอียดและจมูกข้าวประมาณ 2 – 3 เปอร์เซ็นต์ และข้าวสารประมาณ 60 -73 เปอร์เซ็นต์ โดยองค์ประกอบหลักของเมล็ดข้าว คือ คาร์โบไฮเดรตหรือแป้งข้าว (starch)

3. คาร์โบไฮเดรตหรือแป้งข้าว ข้าวจะมีแป้งอยู่ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง มีเม็ดแป้ง 20 – 60 เม็ด อัดรวมกันอยู่ในอามิโลพลาสต์และล้อมรอบเม็ดแป้งด้วยโปรตีน

แป้งข้าวสามารถแยกออกเป็นองค์ประกอบย่อย 2 ชนิด ได้แก่ อมิโลเปคติน (amylopectin) และ อมิโลส (amylose)

3.1. อมิโลเปคติน เป็นแป้งที่เป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสมีโครงสร้างโมเลกุลเหมือนกิ่งไม้ โดยมีพันธะ α 1-4 D - glucose เชื่อมน้ำตาลกลูโคสเป็นเส้นยาว และพันธะ α 1-6 D - glucose เชื่อมน้ำตาลกลูโคสที่แตกแยกออกจากเส้นตรง คุณสมบัติของอมิโลเปคติน ทำปฏิกิริยากับสารไอโอดีนได้สีม่วงหรือน้ำตาลแดง ดูดซับไอโอดีนและเซลลูโลสได้ต่ำ และย่อยสลายด้วยเอนไซม์ β -amylase ได้ต่ำ

3.2. อมิโลส เป็นแป้งที่เป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสเช่นกัน มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นแบบเส้นตรงมีพันธะ α 1-4 D glucose เชื่อมน้ำตาลกลูโคสเป็นเส้นยาว คุณสมบัติของ อมิโลส คือ ทำปฏิกิริยากับสารไอโอดีนได้สีน้ำเงินเข้ม ดูดซับไอโอดีนและเซลลูโลสได้มาก และย่อยสลายด้วยเอนไซม์ β - amylase ได้ 100 เปอร์เซ็นต์

4. โปรตีน เมล็ดข้าวมีส่วนประกอบของโปรตีนอยู่ประมาณ 4.3 – 18.2 เปอร์เซ็นต์ หรือเฉลี่ย 9.5 เปอร์เซ็นต์ มีเป็นอันดับสองรองจากแป้ง ปริมาณโปรตีนที่พบในเมล็ดข้าวมีความแปรปรวนขึ้นอยู่กับสถานที่ปลูกและสภาพแวดล้อม โปรตีนในเมล็ดข้าวสามารถแบ่งเป็น 4 ชนิด ตามคุณสมบัติในการละลายได้แก่ อัลบูมิน (albumin) โกลบูลิน (globulin) โปรลามิน (prolamin) และกลูเตลลิน (glutelin)

5. ไขมัน ไขมันที่อยู่ในเมล็ดข้าวมักจะอยู่ในสภาพเป็นหยดไขมันเล็กๆ ขนาดเล็กกว่า 1.5 ไมครอน อยู่บริเวณเยื่อหุ้มผิวเมล็ด (รำหยาบและรำละเอียด) และจมูกข้าว (คัพภะ) เมล็ดข้าวมีไขมัน 1.6 – 2.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่อยู่ในรำข้าว ไขมันที่ได้จากข้าวเป็นไขมันชนิดที่มีคุณภาพดี มีกรดไขมันอิ่มตัว 18 เปอร์เซ็นต์ กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acid : MUFA) 45 เปอร์เซ็นต์ กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid : PUFA) 37 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันรำข้าวเหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการลดคอเลสเตอรอลที่ไม่ดี (LDL-C) เพราะมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (linoleic acid, oleic acid และ palmitic acid) มีสารแกมมา ออไรซานอล (gamma oryzanol) ช่วยในการควบคุมระดับโคเลสเตอรอลในเส้นเลือด

6. สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) สารประกอบที่มีอยู่ในเมล็ดข้าวและมีมากกว่าร้อยละ 5 สารต้านอนุมูลอิสระมีหลายประเภท ได้แก่ วิตามิน เอ บี ซี หรือเอ็นไซม์ มีประโยชน์ช่วยป้องกันร่างกายจากอนุมูลอิสระ (free radicals) โดยในเมล็ดข้าวมีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ

ได้แก่ แกมมา-ออไรซานอล (gamma oryzanol) โทโคฟีรอล (tocopherol) และโทโคไตรอีนอล (tocotrienol)

ข้าวเหนียวดำ

ประวัติ

ข้าวดำ (purple rice) เป็นข้าวพื้นเมืองของเอเชีย ซึ่งมีชื่อเรียกกันโดยทั่วไปว่าข้าวเหนียวดำ (black sticky rice) เป็นข้าวเหนียวที่ปลูกในฤดูกาลทำนาปีข้าวสายพันธุ์นี้เป็นข้าวสายพันธุ์โบราณของกลุ่มชาติพันธุ์ชาวม้ง อยู่ที่บ้านเอื้องพพระ จังหวัดตาก ทำการเพาะปลูกในพื้นที่แบบไร่สูงจากระดับน้ำทะเล 650 เมตร มีชาวม้งนำเมล็ดมาปลูกในบริเวณรอยต่อระหว่างอำเภอ นครไทย และ อำเภอชาติตระการ จังหวัดพิษณุโลก ต่อมาในปี พ.ศ. 2533 นายพนัส สุวรรณธาดา ตำแหน่งในขณะนั้น คือ เจ้าพนักงานการเกษตร 5 ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก ไปปฏิบัติราชการโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ภูเมี่ยง ภูสอยดาว บริเวณ อำเภอ นครไทยและอำเภอชาติตระการ จังหวัดพิษณุโลก จนได้พบเห็นพันธุ์ข้าวดังกล่าว ด้วยความสนใจจึงได้รวบรวมเมล็ดพันธุ์และนำมาปลูกเปรียบเทียบกับข้าวที่ปลูกจากแหล่งเดิมที่บ้านเอื้องพพระ จังหวัดตาก หลังจากนั้นได้ทำการคัดเลือกเมล็ดพันธุ์ให้บริสุทธิ์ในปี พ.ศ. 2534 – 2538 และได้มอบเมล็ดพันธุ์บริสุทธิ์ให้กับนายไชยวัฒน์ วัฒนไชย ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตร ในเวลาต่อมา นายพนัสได้ทำแปลงสำหรับผลิตเมล็ดพันธุ์บริสุทธิ์ในปี พ.ศ. 2539 แล้วนำเมล็ดพันธุ์ที่ได้ไปให้กลุ่มชาติพันธุ์ชาวม้ง ที่ตำบลรวมไทยพัฒนา อำเภอพพระ จังหวัดตาก เพื่อทำการปลูกขยายพันธุ์สำหรับนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป แต่เมื่อเวลาผ่านไป ด้วยวิธีการปลูกแบบชาวเขาที่มักปลูกข้าวหลายสายพันธุ์ใกล้กันหรือปลูกด้วยกัน ทำให้มีเมล็ดพันธุ์ข้าวพันธุ์อื่นปนและไม่เป็นพันธุ์บริสุทธิ์ ดังนั้นในปี พ.ศ. 2550 ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลกและศูนย์วิจัยข้าวแพร่ จึงได้เริ่มทำการคัดเลือกพันธุ์บริสุทธิ์อีกครั้ง และคัดเลือกไว้ในปี พ.ศ. 2551 เพื่อนำมาทำพันธุ์บริสุทธิ์ โดยปลูกแบบรวงต่อแถวแล้วนำไปเปรียบเทียบผลผลิตเบื้องต้นที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตร จังหวัดตาก โดยทดสอบการปรับตัวในแปลงเกษตรกรที่บ้านเอื้องพ คือ จังหวัดเพชรบูรณ์ ซึ่งปลูกเปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสถานี รวมถึงเปรียบเทียบกับ การปลูกในนาของราษฎร

ลักษณะประจำพันธุ์

ข้าวเหนียวดำหรือข้าวดำ เป็นข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวกล้องสีดำ เป็นข้าวไวแสงอายุสั้นเก็บเกี่ยวประมาณกลางเดือนตุลาคม ลักษณะการเจริญเติบโต ลักษณะกอตั้ง ต้นแข็ง ไม่ล้ม

ง่าย มีความสูงของต้นเฉลี่ยอยู่ที่ 137 เซนติเมตร กาบใบและใบสีเขียว ล้วนใบสีน้ำตาลอ่อน หูใบสีเหลืองน้ำตาล ใบตรงหักลง คอรวงยาว รวงค่อนข้างแน่น กลีบดอกกระชະออกรวง 50 เปอร์เซนต์ มีสีเขียวอ่อน เมื่อถึงระยะน้ำนม กลีบดอกจะเปลี่ยนสีเป็นแถบสีม่วงบนพื้นสีเขียวอ่อน ต่อมาเมื่อเข้าสู่ระยะแป้งแข็ง สีกลีบดอกจะเปลี่ยนเป็นสีฟางแถบม่วงดำและเมื่อข้าวถึงระยะสุกแก่ สีเปลือกเมล็ดเปลี่ยนเป็นสีฟางแถบดำ ข้าวเปลือกยาว 10.7 มิลลิเมตร หยา 1.9 มิลลิเมตร การปลูกจะต้องดูแลเป็นพิเศษเนื่องจากไม่ทนต่อน้ำท่วมขัง ค่อนข้างอ่อนแอต่อโรค และแมลงศัตรูข้าว

ข้าวหอมแดง

ประวัติ

ข้าวหอมแดง เป็นข้าวที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของข้าวดอกมะลิ 105 เมื่อปี พ.ศ. 2525 – 2527 นายบุญโฮม ชำนาญกุล ผู้อำนวยการสถานีทดลองข้าวสุรินทร์ ได้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 พบว่าในรวงข้าวจำนวนหนึ่งมีเมล็ดที่เป็นข้าวเหนียวปนอยู่ จึงแยกไปปลูกเป็นกอๆ และทำการศึกษาลักษณะของเมล็ดข้าวกล้อง พบว่ากอหนึ่งมีเชื้อหุ้มเมล็ดของข้าวกล้องมีสีแดงเรื่อๆ มีทั้งข้าวเหนียวและข้าวเจ้า

พ.ศ. 2531 นายบุญโฮม ได้นำเอาเมล็ดข้าวเจ้าแดงไปปลูกเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่พิษณุโลก และได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ดีเด่นไว้เพียง 2 สายพันธุ์ เป็นข้าวหนักและข้าวเบา

พ.ศ. 2535 เกษตรกรที่อยู่ใกล้ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลกได้นำข้าวสายพันธุ์ดีเด่น ไปปลูกและแปรรูปเป็นข้าวกล้องข้าวแดงจำหน่ายในชื่อข้าวสวย

พ.ศ. 2536 ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลกได้นำสายพันธุ์ข้าวหนักและข้าวเบา กลับไปคัดเลือกใหม่ จนปี พ.ศ. 2538 ได้สายพันธุ์ KDML 105 R-PSL-E-14 จนปี พ.ศ. 2542 ได้รับการขึ้นทะเบียนเป็นพันธุ์ข้าวทั่วไปมีชื่อว่าข้าวหอมแดง

ลักษณะประจำพันธุ์

เป็นข้าวเจ้า ที่ไวต่อช่วงแสง ลำต้นสูง 120 - 130 เซนติเมตร ต้นแข็งแรงปานกลาง กอตั้ง ใบสีเขียวอ่อน ใบโन्न ใบตรงคก ด้านทานเปลือกกระดกสีน้ำตาลและโรคใบไหม้ ให้รวง 12 รวงต่อกอ ลำต้นสูง 27 เซนติเมตร ระยะเก็บเกี่ยว 20 พฤศจิกายน ควรปลูกในพื้นที่เฉพาะเพื่อป้องกันปัญหาเมล็ดปะปนกับข้าวขาว

เมล็ดข้าวเปลือกสีฟาง เรียวยาว เมล็ดข้าวเปลือกยาว 9.6 มิลลิเมตร กว้าง 3.9 มิลลิเมตร หนา 2.3 มิลลิเมตร เมล็ดข้าวกล้องยาว 7.5 กว้าง 2.1 มิลลิเมตร หนา 1.7 มิลลิเมตร เชื้อหุ้ม เมล็ดข้าวกล้องมีสีแดงเข้ม ข้าวสุกนุ่มเหนียว และมีกลิ่นหอมเหมือนข้าวหอมดอกมะลิ 105 ปริมาณมิโลสในเมล็ด 16.9 เปอร์เซนต์ เมื่อนำมาหุงสุกข้าวจึงนุ่มค่อนข้างเหนียว มีกลิ่นหอม

ข้าวหอมนิล

ประวัติ

ข้าวเจ้าหอมนิล เป็นข้าวที่ได้รับคัดเลือกและพัฒนาจนได้ข้าวที่มีเมล็ดข้าวกล้อง เรียวยาว สีม่วงเข้ม การศึกษาเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายชนิด microsatellite จำนวน 48 ตำแหน่ง มาทำการตรวจสอบ พบว่าข้าวเจ้าหอมนิลมีความแตกต่างจาก ข้าวพันธุ์ Hei Bao และ Xua Bue Huq ที่เป็นข้าวเมล็ดสีดำของประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน จึงยืนยันได้ว่าข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่ได้เป็นพันธุ์เดียวกัน

ลักษณะประจำพันธุ์

ข้าวเจ้าหอมนิลเป็นข้าวนาสวน ไม่ไวแสง สามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี แตกกอดี ไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้งและแมลง โดยทั่วไปมีความสูงของต้น 75 เซนติเมตร สีของใบและ ลำต้นเขียวเข้มอมม่วง เปลือกหุ้มเมล็ดข้าวมีสีม่วงเข้ม เมื่อทำการสีเมล็ดข้าวกล้องมีสีม่วงดำยาว 6.5 มิลลิเมตร อายุการเก็บเกี่ยว 95 – 100 วัน ผลผลิตเฉลี่ย 400 – 700 กิโลกรัมต่อไร่ ต้านทานต่อโรคไหม้ (blast) ทนทานต่อสภาพแล้ง (drought) และดินเค็ม (salinity) ข้าวหอมนิลจะมีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่าข้าวหอมดอกมะลิ 105

ข้าวหอมดอกมะลิ 105

ประวัติ

ข้าวหอมดอกมะลิ 105 หรือที่คนไทยเรียกกันว่าข้าวหอมมะลิ มีถิ่นกำเนิดในตำบลแหลมประดู่ อำเภอบ้านโพธิ์ จังหวัดฉะเชิงเทรา คนแหลมประดู่เรียกข้าวพันธุ์นี้ว่าข้าวมะลิหอม เนื่องจากมีกลิ่นหอมคล้ายดอกมะลิ

เมื่อปี พ.ศ. 2493 - 2494 นายสุนทร สีหะเนิน เจ้าพนักงานข้าวได้รวบรวมพันธุ์ข้าวมะลิหอมจากอำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา ซึ่งชาวบางคล้าเรียกพันธุ์ข้าวนี้ว่า “ข้าวขาวมะลิ” โดยนายสุนทร รวบรวมมา 199 รวง นำมาคัดเลือกแบบคัดพันธุ์บริสุทธิ์ จนได้สายพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 4 - 2 - 105 เลข 4 หมายถึงสถานที่เก็บรวงข้าว คือ อำเภอบางคล้า เลข 2 หมายถึงพันธุ์ทดสอบที่ 2 (ข้าวดอกมะลิ) เลข 105 หมายถึง แถวหรือรวงที่ 105 จากจำนวน 199 รวง จึงเรียกชื่อพันธุ์นี้ว่าข้าวดอกมะลิ 105 ได้รับการรับรองพันธุ์เมื่อวันที่ 25 พฤษภาคม 2502

ลักษณะประจำพันธุ์

เป็นข้าวเจ้า ปลูกในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ลำต้นสูง 140 – 150 เซนติเมตร ลำต้นและใบค่อนข้างเล็ก สีเขียวอ่อน ไวต่อช่วงแสง ทนความแห้งแล้ง ทนดินเปรี้ยวและดินเค็มได้ดี อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 25 พฤศจิกายน

ลักษณะข้าวเปลือกยาวรี สีฟาง น้ำหนักเบา ส่วนข้าวสารมีลักษณะขาวใส เลื่อมมัน แข็งแกร่ง เมล็ดเรียวยาว เมล็ดข้าวเปลือกยาว 10.6 มิลลิเมตร ความกว้าง 2.5 มิลลิเมตร หนา 1.9 มิลลิเมตร ส่วนเมล็ดข้าวกล้องยาว 7.5 มิลลิเมตร ความกว้าง 2.1 หนา 1.8 มิลลิเมตร มีส่วนประกอบของอมิโลส 13 – 18 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดที่ผ่านการสีจะมีลักษณะเมล็ดข้าวสารใส คุณภาพการหุงต้มดี อ่อนนุ่มมีกลิ่นหอม

ข้าวเหนียว กข 6

ประวัติ

ข้าวเหนียว กข 6 ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ โดยการใช้รังสีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้รังสีแกมมาปริมาณ 20 กิโลแตรด อาบเมล็ดพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 แล้วนำมาปลูกคัดเลือกที่สถานีทดลองข้าวบางเขนและสถานีทดลองข้าวพิมาย จากการคัดเลือกได้ข้าวเหนียวหลายสายพันธุ์ในข้าวชั่วที่ 2 นำไปปลูกคัดเลือกจนอยู่ตัวได้สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงสุด คือ สายพันธุ์

KDML 105'65-G@U-68-254 นับเป็นข้าวพันธุ์ดีสายพันธุ์แรกของประเทศไทย ที่ค้นคว้าได้โดยใช้วิธีชักนำพันธุ์พืชให้เปลี่ยนกรรมพันธุ์โดยใช้รังสี (กรมการข้าว, 2557)

ลักษณะประจำพันธุ์

เป็นข้าวเหนียว สูงประมาณ 154 เซนติเมตร ใวต่อช่วงแสง ทรงกอกระจาย เล็กน้อย ใบยาวสีเขียวเข้ม ใบธงตั้ง เมล็ดยาวเรียว เมล็ดข้าวเปลือกสีน้ำตาล อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 5 สัปดาห์ เมล็ดข้าวเปลือกยาว 9.9 กว้าง 2.7 นน 2.0 มิลลิเมตร เมล็ดข้าวกล้อง ยาว 7.2 กว้าง 2.2 นน 1.7 มิลลิเมตร คุณภาพข้าวสุกเหนียวนุ่มมีกลิ่นหอม ผลผลิตประมาณ 666 กิโลกรัมต่อไร่ ให้ผลผลิตสูงและทนแล้งดีกว่าพันธุ์เหนียวสันป่าตอง คุณภาพการหุงต้มดีมีกลิ่นหอม ลำต้นแข็งปานกลาง ด้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาล

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในทางการแพทย์

จากบันทึกพบว่าการนำพืชสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคนับพันปี โดยพบบันทึกที่เก่าในยุค Mesopotamia ประมาณก่อน 2600 BC (Newman et al., 2000) การใช้สมุนไพรเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีความสำคัญมากที่สุดในการต่อต้านการติดเชื้อ (antinfective) และการต่อต้านมะเร็ง (anticancer) โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาต้านมะเร็ง การค้นหาที่ใช้ในการต้านมะเร็งโดยยาที่ใช้ในการรักษาจะต้องเฉพาะเจาะจงกับเซลล์มะเร็งเท่านั้น เพื่อลดความเสียหายที่อาจจะเกิดขึ้นกับเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็ง คือ เนื้องอกที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็ง แต่การลดความเป็นพิษต่อ เซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็ง ไม่ใช่เรื่องง่ายเนื่องจากเซลล์มีลักษณะคล้ายกับเซลล์มะเร็ง ถึงแม้ว่าจะมีผลข้างเคียงบ้างแต่ยาเหล่านี้ก็ได้รับอนุญาตให้ใช้ เนื่องจากประสบความสำเร็จเป็นอย่างมากในการรักษาโรคมะเร็งยาบางชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการรักษาโรคมะเร็งที่ได้เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ หรือสารประกอบที่ได้จากธรรมชาติ (Nicolau, 1999)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นสารประกอบที่เป็นสาร โภชนาการพิเศษ (extranutritional) ที่มีธรรมชาติผลออกมาในปริมาณน้อย พบในพืชและผลิตภัณฑ์อาหาร (Kris-Etherton et al., 2002) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชเป็นกลุ่มของสารทุติยภูมิของพืช เป็นสารนำมาใช้ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาในมนุษย์และสัตว์ (Bernhofs, 2010; Banthorpe, 1994) ดังนั้นสารทุติยภูมิ

(secondary metabolites) หมายถึงสารเคมีที่พืชสร้างขึ้นตามธรรมชาติโดยไม่ได้มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช แต่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต การกระจายตัวของสารเหล่านี้จะแตกต่างกันไปตามวงศ์พืชซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะตัว ในธรรมชาติสารทุติยภูมิทำหน้าที่ปกป้องพืชจากการทำลายของศัตรู เช่น แมลง หรือสัตว์ต่างๆ ส่วนใหญ่แล้วเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงถูกแยกสกัดออกมาจากส่วนต่างๆ ของพืชเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ (Buitelaar et al., 1992)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรำข้าว

รำข้าวเป็นเศษเหลือ (by – product) ที่ได้จากการกระบวนการสีข้าว มีราคาถูกรำข้าวจะอุดมไปด้วยสารอาหารต่างๆ เช่น วิตามินบี แร่ธาตุ และเยื่อใย (Juliano, 1985) นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยที่พบว่ารำข้าวยังมีส่วนประกอบของสารอาหารและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ อาทิ เช่น โพรตีน dietary fibers, tocopherols, tocotrienols, γ -oryzanol, phytic acid (Graf et al., 1987; Qureshi et al., 2002; Ryyanen et al., 2004; Ausman et al., 2005; Minhajuddin et al., 2005; Imsanguan et al., 2008) สารประกอบกลุ่ม phenolic (Hudson et al., 2000) คาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน (complex carbohydrates), phytonutrients, phospholipids กรดไขมันอิ่มตัว (essential fatty acids) และ antioxidants มากกว่า 120 ชนิดที่ (Kahlon, 2009) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้จะออกฤทธิ์แตกต่างกันออกไป เช่น anti-inflammatory และ anti-cancer (Adam et al., 2002).

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรำข้าวต่อการต้านมะเร็ง

จากรายงานการศึกษาของ Li et al. (2011) พบว่าผลของข้าวกล้อง รำข้าวและข้าวขัดขาว ต่อกลไกการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ พบว่าเมื่อหนูได้รับบริโภครำข้าวในระดับ 1.1 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดจำนวนของ aberrant crypt foci (ACF) อย่างมีนัยสำคัญ และลดจำนวนของ cyclooxygenase-2 (COX-2) ลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากรายงานการศึกษาของ Kong et al. (2009) พบว่าสารประกอบ polyphenol หมู่ cycloartenyl ferulate ในรำข้าวกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งลำไส้ของมนุษย์ (human colorectal adenocarcinoma, SW480) และกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งระยะแพร่กระจาย metastatic SW620 cell ไปเป็น tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) เพื่อให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส คือ เป็นกระบวนการตายของเซลล์ประเภทหนึ่ง ซึ่งทำให้เซลล์ตายอย่างมีลักษณะที่เฉพาะ โดยที่เซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ที่มี

ลักษณะเฉพาะ ได้แก่ เซลล์เกิดการหดตัวมีขนาดเล็กลง โครมาตินรวมตัวกันแน่นขึ้น มีการแตกหักของสายดีเอ็นเอ และเชื้อหุ้มเซลล์พองเป็นถุง (กัลยา, 2556) ทำให้เซลล์เกิดความเสียหายไม่สามารถซ่อมแซมได้โดยพบว่าในรากำวามีสารประกอบหมู่ฟีนอลิก เมื่อนำไปทดสอบพบว่าสารออกฤทธิ์ได้ผลมากที่สุดต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ของมนุษย์ (SW 480) แต่จะไม่ใช่เป็นพิษต่อเซลล์ลำไส้ปกติ CCD-18-Co cells และยังพบว่า cycloartenyl ferulate มีความไวต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งและต่อต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ (colon cancer SW620) ให้เป็น TRAIL เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส

หลักการทดสอบการตายของเซลล์ด้วยวิธี MTT

การตรวจสอบความสามารถในการฆ่าเซลล์มะเร็ง เป็นวิธีการคัดกรองยาเพื่อใช้ในการรักษาโรคนั้นๆ การศึกษาครั้งนี้จะวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT ซึ่งอาศัยวิธีการทำงานของเอนไซม์ โดยจะทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ dehydrogenase ใน mitochondria ของเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสาร (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide; MTT) ที่มีสีเหลือง เปลี่ยนเป็น formazan product ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงน้ำเงินหลังจากทำการละลายสีด้วย DMSO และทำการวัดหาปริมาณของ formazan product ที่เกิดขึ้นด้วยการวัดค่า optical density (OD) (Mosmann , 1983)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมโมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง แต่ละอิเล็กตรอนจะแยกกันอยู่เป็นอิเล็กตรอนเดี่ยวในแต่ละออร์บิทัล ทั้งนี้การสปินหรือการหมุนรอบตัวของอิเล็กตรอนทั้งสองจะสปินแบบคู่ขนานในทิศทางเดียวกัน อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสถานะเป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลในสถานะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ อนุมูลอิสระที่มีน้ำหนักรวมโมเลกุลต่ำจะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าอนุมูลที่มีน้ำโมเลกุลสูง เนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียรและพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่น ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงมีคุณสมบัติเฉพาะ คือ มีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องในทางชีววิทยา สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจน

เป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chlorine species, RCS) สารบางชนิดสามารถจัดอยู่ได้ 2 กลุ่ม (โอภา, 2549)

อนุมูลอิสระเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ ในปัจจุบันเนื่องจากสภาวะความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ที่เกิดขึ้นทำให้เกิดการไม่สมดุลระหว่างการสร้างและการทำลายเป็นกลางของสารโปรออกซิเดนท์ ซึ่งสารชนิดนี้เมื่อกำจัดอนุมูลอิสระแล้วจะกลายเป็นอนุมูลอิสระแทนเสียเอง เป็นผลพลอยได้ของปฏิกิริยาเคมีและกิจกรรมของเซลล์ในร่างกายที่ต้องดำเนินตามปกติ ซึ่งเป็นสารที่เร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ ดังนั้นสภาวะความเครียดออกซิเดชันจะเริ่มจากที่อนุมูลอิสระค้นหาความเสียหาย โดยที่อิเล็กตรอนจะเข้าไปจับคู่กับโมเลกุลทางชีวภาพ อาทิเช่น โปรตีน ไขมัน และดีเอ็นเอ ในเซลล์ของมนุษย์ที่มีสุขภาพดีก่อให้เกิดความเสียหายของสายพันธุกรรม (DNA damage) และยังเป็นสาเหตุของการเกิดออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) คือ การเกิดปฏิกิริยาระหว่างไขมันกับออกซิเจนภายในร่างกายเป็นผลทำให้ร่างกายเกิดการเปลี่ยนแปลงนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดเสื่อมและโรคอัมพาต (Braca, 2002) ดังนั้นการทำลายหรือควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระจะช่วยในการป้องกัน หรือรักษาโรคต่างๆ ที่เกิดขึ้น

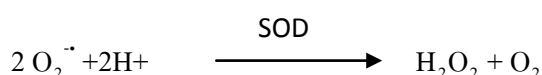
การป้องกันอันตรายและความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระเกิดขึ้นในเซลล์หลายชนิด มีทั้งที่เป็นประโยชน์และให้โทษอันประกอบด้วย อนุมูลอิสระที่หลุดรอดออกมาจากการเผาผลาญออกซิเจนเป็นพลังงาน อนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณต่อเซลล์ และอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ต่อการทำงานของเซลล์หรืออวัยวะ ในกรณีหลังจะมีประโยชน์แต่ออกฤทธิ์ในปริมาณมากเกินไปจนเกิดเป็นอันตรายและเสียหายหากมีอนุมูลอิสระในปริมาณมากเกินไป ดังนั้นร่างกายจึงมีกลไกเพื่อควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้สูงจนเกิดอันตราย กลไกสำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระมีกลไกหลักอยู่ 3 กลไก ทำหน้าที่ลดผลกระทบที่เป็นอันตรายของอนุมูลอิสระต่อเซลล์ ในสภาวะปกติกลไกเหล่านี้ถือว่าเพียงพอต่อการรักษาปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุลได้ กล่าวคือสามารถควบคุมได้แม้ว่าจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น อย่างไรก็ตามหากเกิดภาวะผิดปกติที่ทำให้กลไกการป้องกันเหล่านี้บกพร่องไม่สามารถที่จะควบคุมภาวะสมดุลได้ กลไกที่สำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุลมีดังต่อไปนี้ (โอภา, 2549)

1. เอนไซม์

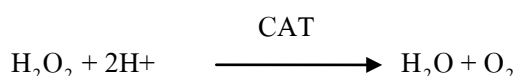
ในระดับเซลล์เอนไซม์เป็นกลไกสำคัญขั้นแรกที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะสมดุล เอนไซม์ที่สำคัญมีดังต่อไปนี้

เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase; SOD) เอนไซม์ SOD จะทำหน้าที่ขจัดอนุมูลอิสระเริ่มต้นที่เกิดขึ้นในร่างกาย คือ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{\cdot -}$) โดยการเปลี่ยนอนุมูล $O_2^{\cdot -}$ ให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์



ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกกำจัดต่อโดยเอนไซม์คาตาเลส และเอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส นอกจากนี้เอนไซม์ SOD ยังทำหน้าที่ปกป้องเอนไซม์ในกลุ่มดีไฮเดรต ได้แก่ เอนไซม์ไดไฮโดรแอซิดดีไฮเดรต เอนไซม์อะโคไนเตส เอนไซม์ฟอสโฟกลูโคเนตดีไฮเดรต เอนไซม์ฟumarate-ase และ เอนไซม์ฟumarate-ase ไม่ให้เอนไซม์เหล่านี้ถูกอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนทำลาย

เอนไซม์คาตาเลส (Catalase; CAT) เอนไซม์คาตาเลสเป็นเอนไซม์ซึ่งมีฮีม คือ ferriprotoporphyrin เป็นองค์ประกอบ โครงสร้างเอนไซม์คาตาเลสจะประกอบด้วยหน่วยย่อยของโปรตีนฮีม 4 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน แต่ละหน่วยมีขนาด 60 กิโลดัลตัน การจัดเรียงตัวของหน่วยทั้งสี่เป็นแบบเตตระฮีดรัล ดังนั้นเอนไซม์นี้มีฮีมจำนวน 4 กลุ่มต่อ 1 โมเลกุลของเอนไซม์ มีน้ำหนักโมเลกุลรวมเท่ากับ 240 กิโลดัลตัน เอนไซม์คาตาเลสทำหน้าที่เปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นโมเลกุลของน้ำและออกซิเจน



เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase; GPx) เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะมีธาตุ ซิลิเนียมเป็นองค์ประกอบสำคัญอยู่ใน โครงสร้างของเอนไซม์ เอนไซม์ GPx ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ ลิพิดเปอร์ออกไซด์ (ROOH) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยมีกลูตาไทโอน (GSH) รวมในปฏิกิริยาดังนี้ เอนไซม์นี้ ปกป้องเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่ให้ถูกทำลายหรือเสียหายจากภาวะที่ร่างกายถูกออกซิไดซ์ หรืออนุมูลอิสระมากเกินไป



2. สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นคำศัพท์ที่แปลงมาจากคำว่า antiradical ในปัจจุบันได้ถูกบัญญัติใหม่เป็นสารขจัดหรือกำจัดอนุมูล (radical scavenger) แต่อย่างไรก็ตามยังคงใช้คำว่าสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เพื่อกำจัดอนุมูลให้หมดไป หรือปฏิกิริยาถูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อ สารขจัดอนุมูลที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เช่น ยูริค บิลิรูบิน จะกำจัดอนุมูลอิสระ ส่วนวิตามินซี วิตามินอี กลูตาไทโอน เบตาแคโรทีน และ ยูบิควิโนน จะหยุดปฏิกิริยาถูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระประเภทหลังมีบทบาทสำคัญในการทำให้อิทธิพลของออกซิเดชันสิ้นสุดลง สารต้านอนุมูลอิสระที่กล่าวมามีโครงสร้างเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกัน

สารต้านอนุมูลอิสระในอุดมคติควรมีคุณสมบัติที่สำคัญดังนี้

1. มีความเฉพาะเจาะจงสูงในการเข้าจับอนุมูลอิสระโดยตรงและกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดสิ้นไป (quenching)

2. สามารถเกิดทำปฏิกิริยาคีเลทกับโลหะได้

3. เป็นสารต้านออกซิเดชัน

4. ไม่มีผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน

นอกจากนี้ยังมีเกณฑ์ที่สำคัญอื่นๆ ที่ใช้บ่งชี้ถึงความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี ได้แก่ ความสามารถในการดูดซึมหรือส่งผ่านเข้าสู่ทั้งภายในเซลล์ ภายนอกเซลล์ และที่เนื้อเยื่อต่างๆ โดยมีความเข้มข้นเพียงพอที่สามารถออกฤทธิ์ได้ สารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ ที่มีในธรรมชาติ จึงมีการศึกษาค้นคว้าหาสารต้านอนุมูลอิสระ โดยจะแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม คือ สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการสังเคราะห์ และสารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ แต่จะพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการสังเคราะห์มีผลข้างเคียงที่อาจก่อให้เกิดมะเร็ง (Choi, 2007; Adeolu, 2009) ดังนั้นจึงหันมา

สนใจศึกษาค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากธรรมชาติ เพื่อนำมาเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากการศึกษาทางระบาดวิทยาจำนวนมากยืนยันถึงการลดอัตราเสี่ยง และเพิ่มอัตราการป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง โรคเกี่ยวกับหลอดเลือดและหัวใจ รวมถึงโรคอื่นๆ ที่มีความสัมพันธ์กับอนุมูลอิสระจากการบริโภคผักผลไม้ ซึ่งผลดังกล่าวมาจากความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารประเภทวิตามินซี เบต้า-แคโรทีน (β -carotene) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) รวมถึงสารกลุ่มโพลีฟีนอลิก (polyphenolics) เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoids) และยังพบว่าในรำข้าวเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ที่สามารถทำหน้าที่เป็นตัวดักจับอนุมูลอิสระ (free radical scavengers)

จากการศึกษาของ Akiri et al. (2010) พบว่าสารสกัดหยาบจากรำข้าวโดยใช้เมทานอลเป็นตัวสกัด พบว่าข้าวสายพันธุ์ Njavara มีสารต้านอนุมูลอิสระและเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวทั้งหมดสามสายพันธุ์ โดยพบว่า Njavara มีสารประกอบพวกโพลีฟีนอล ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการใช้วิธีทดสอบสองวิธี คือ nitric oxide และ 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) และยังมีฤทธิ์ในการลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง และยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งสมองชนิด C6 glioma cells

จากรายงานผลการศึกษา Panunto et al. (2010) พบว่าสารสกัดจากรำข้าวสองสายพันธุ์คือ ข้าวสังข์หยด และ ข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวทั้งสองสายพันธุ์มีสารประกอบฟีนอลิกอยู่ในช่วง 220.1 – 753.4 ไมโครกรัม gallic acid ต่อสารสกัด 1 กรัม และยังพบสารประกอบฟลาโวนอยด์ อยู่ในช่วง 39.59 - 135.09 ไมโครกรัม rutin hydrate ต่อสารสกัด 1 กรัม ในส่วนของข้าวสังข์หยดจะมีสารประกอบทั้งสองชนิดมากกว่าข้าวหอมดอกมะลิ 105 ประมาณ 2 - 3 เท่า และเมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดจากรำข้าวทั้งสองชนิดสามารถกำจัดอนุมูลอิสระและหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระโดยดูจากค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 26 – 357 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้วิธีการทดสอบ DPPH นอกจากนี้ยังมีการทดสอบกับเซลล์ โดยพบการทำลายสารต้านอนุมูลอิสระ (ROS) ค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 0.6 - 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดน้ำของข้าวสังข์หยดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าข้าวหอมดอกมะลิ 105 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

แบคทีเรียโปรไบโอติก

แบคทีเรียโปรไบโอติกเป็นชื่อเรียกของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์และสัตว์ จุลินทรีย์เหล่านี้จะมีบทบาทสำคัญในการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งมีผลต่อการรักษาสุขภาพมีบทบาทต่อการป้องกันจุลินทรีย์ที่เป็นอันตราย และช่วยเสริมระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย จุลินทรีย์โปรไบโอติกจะประกอบไปด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Pediococcus* และ ยีสต์ (Soccoll et al., 2010)

โปรไบโอติกที่อยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* spp. ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อนสามารถสร้างสปอร์ได้ จากการศึกษาค้นคว้าพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. subtilis* ที่พบในผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่านัตโตะของประเทศญี่ปุ่น เมื่อมีการบริโภคผลิตภัณฑ์นี้จะสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและการลดลงของการแข็งตัวของเลือดในขั้นตอนการสลายลิ่มเลือด (Sumi et al., 1995; Hosoi and Kiuchi, 2004) และยังพบ *B. subtilis* ในถั่วเน่าซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่นิยมบริโภคในภาคเหนือของประเทศไทย เมื่อทำการหมักถั่วเหลือง โดยแบคทีเรียสายพันธุ์นี้จะพบการทำงานของเอนไซม์ประเภทโปรติโอไลติก จะช่วยย่อยโปรตีนในถั่วเหลือง ผลิตภัณฑ์ที่ได้ก็คือแอมโมเนียและกรดอะมิโน (Ohta, 1986; Sakar et al., 1993; Streinkraus, 1996)

จากรายงานการศึกษาของ Thirabunyanon and Thongwittaya (2007) ได้คัดเลือก *B. subtilis* MP9 เป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดแยกมาจากถั่วเน่า ซึ่งผ่านการจำแนกสายพันธุ์โปรไบโอติกด้วยการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA กับฐานข้อมูลใน GenBank ซึ่ง 16S rRNA gene คล้ายกับ *B. subtilis* 99 เปอร์เซ็นต์ และทำการศึกษาผลของโปรไบโอติกดังกล่าวต่อโภชนาการทางอาหารของถั่วเหลืองหมักพบว่าหลังจากการหมักถั่วเหลือง 24 - 48 ชั่วโมงสามารถเพิ่มปริมาณเปอร์เซ็นต์ของโปรตีน ปริมาณ soluble protein และปริมาณ reducing sugar มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ทำการหมักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

B. subtilis มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย มีศักยภาพที่ดีต่อการใช้งานด้านเทคโนโลยีชีวภาพและการผลิตภัณฑ์เภสัชภัณฑ์ชีวภาพและยังรวมถึงสาร surfactin, fengycin, iturin, mycosubtilins และ bacillomycins ซึ่งสารเหล่านี้จัดอยู่ในกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ และยังพบว่าสารลดแรงตึงผิวเหล่านี้ยังมีความสามารถในการต้านไวรัส ด้านมะเร็ง และด้านการแข็งตัวของเลือด และการละลายของลิ่มเลือด (Ghribi et al., 2012) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. subtilis* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอส ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ (Christian, 2010) และยังมีรายงานเกี่ยวกับ *B. natto* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เมื่อมีการ

เจริญเติบโตเต็มที่ โดยพบว่าเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นได้เหล่านี้ไม่เพียงแต่มีความสามารถในการย่อยสลายสารที่มีโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต แต่เมื่อผ่านกระบวนการหมักสารเหล่านี้จะถูกทำให้เปลี่ยนเป็นสารอาหารที่มีความสามารถดูดซึมได้ เช่น กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ได้อย่างง่าย ยังสามารถช่วยผสมวิตามินและสารประกอบที่ทำหน้าที่เป็นสารเสริมอาหาร (physiologically active substances) เช่น วิตามิน ซี วิตามิน บี 1 วิตามิน บี 2 และวิตามิน บี 6 ในระหว่างกระบวนการแปรรูป (Hong et al., 2012)

กระบวนการหมัก

การหมัก หมายถึงการสร้างพลังงานจากกระบวนการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์หรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์เนื่องจากเอนไซม์ โดยมีการอินทรีย์เป็นทั้งตัวให้และตัวรับอิเล็กตรอน ในขณะที่การหมักในทางจุลชีววิทยาอุตสาหกรรมหมายถึงกระบวนการผลิตผลผลิตใดๆ ก็ตามที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จำนวนมาก (mass culture) ซึ่งจะครอบคลุมทั้งกระบวนการแบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจน ในขณะที่การหมักทางชีวเคมีจะหมายถึงเฉพาะกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจนเท่านั้น

ผลการศึกษาการหมักข้าวด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก

จากรายงานการศึกษาของ Ryan et al. (2010) พบว่าข้าวหมักด้วย โปรไบโอติกสายพันธุ์ *Saccharomyces boulardii* สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ โดยสามารถแปลงเปลี่ยนปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างมากทั้งชนิดและปริมาณ นอกจากนั้นเมื่อนำข้าวที่หมักแล้วมาสกัดและทดสอบกับเซลล์มะเร็ง (lymphomas B) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้หมัก

จากรายงานการศึกษาของ Kook et al. (2010) ได้ศึกษาการเพิ่มขึ้นของ γ -aminobutyric acid (GABA) โดยใช้ข้าวสากัดหมักด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus sakei* B2-16 เมื่อนำข้าวสากัดด้วยน้ำไปทำการหมักด้วย *L. sakei* B2-16 พบว่าสาร GABA เพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 660 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นข้าวสากัดจึงเหมาะที่จะนำมาผลิต GABA เนื่องจากข้าวสากัดมีราคาถูกและสามารถหาได้ง่ายเหมาะสำหรับการนำไปผลิตสาร GABA จากการศึกษาสามารถนำไปผลิต GABA ใช้ในเชิงพาณิชย์ได้

จากรายงานการศึกษาของ Zhixiong et al. (2010) ทำการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำหมัก microorganism-X (EM-X) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มบำรุงสุขภาพซึ่งเป็นที่นิยมกันมาในประเทศแถบเอเชียตะวันออก โดยเฉพาะประเทศญี่ปุ่น โดยมีการปรับปรุงสูตรใหม่ด้วยการหมักรำข้าว สาหร่ายทะเลและกีวีฟรุต โดยจะหมักด้วยจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการหมักประกอบไปด้วย แบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์ และแบคทีเรียสังเคราะห์แสง และได้เป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ คือ EM-YU เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ 1.8 เปอร์เซ็นต์เทียบเท่ากับวิตามินซี 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Escherichia coli* O157:H7 และ *Pseudomonas aeruginosa* PA01 และยังสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ tyrosinase อีกด้วย

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัย

เซลล์มะเร็ง

1. เซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2, ATCC)
2. เซลล์มะเร็งตับ (HepG2, ATCC)

แบคทีเรียที่ใช้ในการหมักข้าว

1. *Bacillus subtilis* MP9

อาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

1. DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimal medium) (Gibco™)
2. Fetal bovine serum (Gibco™)

ยาปฏิชีวนะ

1. Penicillin (Gibco™)
2. Streptomycin (Gibco™)

อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

- Nutrient broth (NB) CRITERION™

เมล็ดพันธุ์ข้าว/พันธุ์

1. ข้าวเหนียวดำ
2. ข้าวหอมแดง
3. ข้าวหอมนิล
4. ข้าวหอมดอกมะลิ 105
5. ข้าวเหนียว กข 6

สารเคมีที่ใช้ปรับความขุ่นของแบคทีเรียด้วยสารมาตรฐาน McFarland ประกอบด้วย

1. Sulfuric acid
2. Barium chloride

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดร้ำข้าวและร้ำข้าวหมัก

1. Methanol
2. Isopropanol
3. Acetonitrile

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

1. Methoxyamine hydrochloride (Sigma, USA)
2. N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide
3. Trimethylchlorosilane (Sigma, USA)

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้และมะเร็งตับด้วยวิธี MTT

1. MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2Hterazoliumbromide)
(Sigma, Germany)
2. DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Sigma, USA)

สารเคมีที่ใช้ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

1. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)
2. Ascorbic acid
3. Folin-Ciocalteus's phenol reagent

4. Sodium carbonate

5. Gallic acid (GA)

อุปกรณ์ในการเตรียมสารสกัด

1. Syringe filter ยี่ห้อ Sartorius
2. เครื่องโซนิเคเตอร์ □ (Sonicator)

ภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์

1. ถาดหลุม 24 หลุม (24 well plate)
2. ถาดหลุม 96 หลุม (96 well plate)
3. ฟลasks เลี้ยงเซลล์

เครื่องแก้ว และอุปกรณ์อื่นๆ

1. จานเพาะเชื้อ
2. หลอดทดลอง
3. ขวดรูปชมพู่
4. ปิเปตแก้ว
5. บีกเกอร์
6. ขวดปริมาตร
7. กระจกบอทดวง
8. ขวดรูปชมพู่
9. โถดูดความชื้น

เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดสารสกัดจากรำข้าว

1. เครื่องระเหยสุญญากาศ Vacuum evaporator (Rotavapor, รุ่น R-205, BUCHI)
2. เครื่อง Freeze dry (รุ่น FREEZER, USA)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์หาค่าประกอบทางเคมีในสารสกัดจากรำข้าวและรำข้าวหมัก

1. เครื่อง GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
2. Gas Chromatography, GC (Agilent, รุ่น 6890 series, USA)
3. Mass Spectrometer, MS (Agilent, รุ่น 5973 series, USA)

เครื่องมืออื่นๆ

1. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
2. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Binder GMBH, รุ่น ED115 (E2), USA)
3. เครื่องโซนิเคเตอร์ □ (Sonicator) (ยี่ห้อ CREST, รุ่น D)
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ Water bath (Memmert รุ่น WNB 2221)
5. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง (Balance) (Sartorius, รุ่น BSA 224S-CW, Germany)
6. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) (Olympus, รุ่น UM 500, Japan)
7. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope) (Olympus, รุ่น ULWCD 0.30, Japan)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (Harrier 18/80)
9. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
10. ตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) (Forma Scientific, รุ่น 3111, USA)
11. ตู้เป่าเชื้อ (Horizontal type laminar flow) (Triwork 2000, รุ่น CLEAN H2-3)
12. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Orbital incubator รุ่น SI50)
13. เครื่องวัดค่า pH (pH meter) (Sartorius, รุ่น PP-50, Germany)
14. เครื่องวัดความชื้น Kett moisture meter (KETT Japan รุ่น PM-700)
15. เครื่องสีข้าวกล้องและข้าวขาว บริษัท นาทวีเทคโนโลยี

วิธีวิจัย

1. การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรำข้าว

1.1 การเตรียมรำข้าว

จัดซื้อเมล็ดพันธุ์ข้าวจากแหล่งที่ปลูกข้าวแบบอินทรีย์ ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ คือ ข้าวเหนียวดำ ข้าวหอมแดง ข้าวหอมนิล ข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวเหนียว กข 6 แหล่งที่มาของเมล็ดข้าว ข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียว กข 6 เป็นข้าวที่ปลูกในพื้นที่อำเภอกุฉินารายณ์ จังหวัดกาฬสินธุ์ ส่วนข้าวหอมแดง หอมนิล และหอมดอกมะลิ 105 ปลูกที่อำเภอฟัว จังหวัดเชียงใหม่ โดยทำการคัดเลือกเมล็ดข้าวแยกเอาเศษต่างๆ ที่ปนเปื้อนออกให้เหลือเพียงเมล็ดข้าว ก่อนที่จะทำการสีข้าวจะต้องนำเมล็ดข้าวมาวัดความชื้นด้วยเครื่อง Kett moisture meter โดยที่ความชื้นจะต้องไม่เกิน 8 เปอร์เซ็นต์ ถ้าหากเกินจะต้องนำเมล็ดข้าวไปตากแดดให้ความชื้นลดลงและมาวัดอีกครั้งเมื่อได้ค่าความชื้นที่ต้องการแล้วจะทำการสีด้วยเครื่องสีข้าวขนาดเล็ก โดยจะแยกเอาเฉพาะส่วนของรำข้าวและทำการชั่งน้ำหนักรำข้าว จากนั้นจะนำรำข้าวที่ผ่านกระบวนการสีข้าวมาทำการกรองผ่านตะแกรงเบอร์ 60 mesh โดยจะใช้ตะแกรงร้อนที่ได้มาตรฐานมีขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลาง 354 ไมครอน เพื่อแยกเอาเศษของแกลบและส่วนของปลายข้าวออกให้เหลือแต่ส่วนของรำข้าว จากนั้นจะนำรำข้าวไปทำการ heat stabilized โดยนำรำข้าวไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เก็บใส่ถุงพลาสติกมัดให้แน่นแล้วนำไปเก็บในตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.2 การสกัดรำข้าวด้วยเมทานอล

ทำการชั่งรำข้าว 5 กรัม เติลงในขวดลูกผสมฟุ้งขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติมตัวทำละลาย เมทานอลที่มีความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการกรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของสารสกัดที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบางไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 g เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปทำการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ไปทำการระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นนำไปทำให้แห้งโดยเครื่องระเหิดด้วยเครื่อง freeze dry และเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สูตรการคำนวณหาค่าร้อยละของผลผลิต (yield) ของสารสกัด (Phrompittayarat et al., 2007) เป็นการเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดที่ได้กับปริมาณที่เริ่มต้น เพื่อให้ทราบต้นทุนการผลิตในแต่ละครั้ง

$$\text{ร้อยละของผลผลิต} = \left(\frac{\text{น้ำหนักของสารสกัด}}{\text{น้ำหนักแห้งของรำข้าว}} \right) \times 100$$

1.3. การหมักรำข้าว

ทำการชั่งรำข้าว 1.5 กรัม แล้วเทใส่ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยทำทั้งหมด 3 ซ้ำๆ ละ 9 หลอด จากนั้นทำการเตรียมแบคทีเรียโปรไบโอติก โดยจะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร NB (nutrient broth) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงแล้วทำการดูดแบคทีเรียโปรไบโอติกใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบที่ 4,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการเทส่วนของอาหารทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนของแบคทีเรียโปรไบโอติก ทำการดูดเอาส่วนของตะกอนมาทำการปรับความเข้มข้นของแบคทีเรีย โดยให้เทียบกับความเข้มข้นของ McFarland ที่ความเข้มข้น 6×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 6×10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นปริมาตรเริ่มต้นของแบคทีเรียที่ใช้ เมื่อได้ความเข้มข้นที่ต้องการแล้วทำการเติมแบคทีเรียโปรไบโอติก 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่เตรียมไว้พร้อมกับเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายในตู้บ่มเชื้อ โดยทำการนับจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นชั่วโมงที่ 0 และชั่วโมงที่ 24 โดยวิธีการแบบ spread-plate หลังจากบ่มครบ 24 ชั่วโมง จะทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเมทานอล (methanol) 80 เปอร์เซ็นต์ และน้ำกลั่นในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 สารสกัดส่วนนี้จะนำไปใช้สำหรับการทดสอบกับเซลล์มะเร็ง และในส่วนของการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะใช้สารละลาย isopropanol ต่อ acetonitrile ต่อ water (3 : 2 : 2) โดยจะใช้เวลาในการสกัดเป็นเวลา 5 นาที ภายใต้อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 g เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสมาทำการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บสารสกัดที่ได้ไว้ตู้แช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส ส่วนที่สกัดด้วยเมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ จะนำไปทำการระเหย ด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นนำไปทำให้แห้งโดยเครื่องระเหิดด้วยเครื่อง freeze dry และเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

นำสารสกัดจากรำข้าวหมักและไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* MP9 มาตัวอย่างละ 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย methoxyamine hydrochloride 50 ไมโครลิตร ที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเติม N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide และ trimethylchlorosilane 1% (MSTFA + 1% TMCS) ทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทำการปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 g เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเอาเฉพาะส่วนใสใส่ลงในหลอดเก็บรักษา และนำส่วนใสที่มีสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปใช้ในการวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเครื่อง GC-MS (Ryan, 2010) โดยใช้คอลัมน์ 30 m TG-5MS ที่มีอุณหภูมิสำหรับโปรแกรม 80 องศาเซลเซียส 0.5 นาที ความเร็วในการวิเคราะห์ที่ 15 องศาเซลเซียส จนถึง 310 องศาเซลเซียสต่อนาที

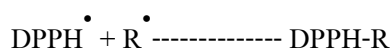
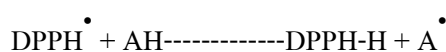
3. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

3.1 การเตรียมสารสกัดเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ทำการเตรียมสารสกัดจากรำข้าวและรำข้าวหมักละลายในสารละลายเมทานอลที่มีความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปเขย่าให้เข้ากันด้วย เครื่องโซนิเคเตอร์ □ แล้วเติมเมทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อปรับความเข้มข้นของสารสกัดให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมสารสกัดให้เข้ากันและทำการเจือจางสารสกัดให้ได้ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการกรองด้วย syringe filter ขนาด 45 ไมครอน แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

3.2 DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) scavenging assay (Rao, 2010)

การวิเคราะห์ด้วย DPPH เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ และให้ความถูกต้องแม่นยำสูง (พรณี, 2550) โดยที่สาร DPPH จะใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายซึ่งสารจะมีสีม่วง และมีความสามารถในการดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515 – 517 นาโนเมตร โดยสาร DPPH จะเข้าทำปฏิกิริยาถ่ายทอดไฮโดรเจนอะตอม โดยจะเกิด ปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species ($R^\bullet$)



เมื่อสาร DPPH ทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สีของสารละลายสีม่วงจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง โดยจะทำการเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (พรณี, 2550; Huang et al., 2005)

วิธีการวิเคราะห์โดยการนำสารสกัดที่เตรียมไว้จากข้อที่ 3.1 มาเตรียมใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติม DPPH 2.5 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ จากนั้นทำการบ่มในที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ค่าดูดกลืนแสง 517 นาโนเมตร โดยจะใช้เมทานอลเป็น blank เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

3.3 การทดสอบหาปริมาณสารฟีนอลรวม

สารประกอบฟีนอลเป็นสารที่พบในธรรมชาติในพืชต่างๆ สารฟีนอลมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ในธรรมชาติจะมีอยู่หลายชนิดแตกต่างกันออกไปตามชนิดของพืช การทดสอบหาสารฟีนอลรวมจะใช้สาร Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นรีดิวซ์และมีความเป็นกรด สารฟีนอลเข้าทำปฏิกิริยาในสภาวะต่างกับสาร Folin-Ciocalteu reagent ทำให้เกิดสีน้ำเงิน โดยมีโซเดียมคาร์บอเนต เป็นตัวที่ทำให้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอยู่ในสภาวะเป็นด่าง ผลที่ได้จะนำมาคำนวณกับกราฟมาตรฐาน โดยในการทดลองนี้จะใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งสารนี้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในอาหารแต่ไม่จัดเป็นเอนไซม์ เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของกรดฟีนอลิก ซึ่งก็จัดเป็นสารประกอบฟีนอล

การทดลองครั้งนี้นำสารสกัดที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 มาทำการทดสอบตามวิธีของ Jun (2012) โดยนำสารสกัดปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติม Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้สารทั้งสองชนิดเข้ากันประมาณ 1 นาที จากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนต ที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร ลงในคิวเวทเพื่อนำไปวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ค่าดูดกลืนแสง 760 นาโนเมตร ใช้เมทานอลเป็น blank ทำการบันทึกผล ส่วนกราฟมาตรฐานจะใช้ gallic acid นำสารมาตรฐานที่เตรียมไว้ตามความเข้มข้นต่างๆ มาทำการทดสอบเช่นเดียวกับขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น จากนั้นไปวิเคราะห์ทำเป็นกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก)

4. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้และมะเร็งตับ

4.1 ขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

นำเซลล์แซ่แข็งที่เก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว มาทำการอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าเซลล์จะละลาย จากนั้นดูดเซลล์ในหลอดแซ่แข็งเก็บรักษาเซลล์ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นดูดอาหารแซ่แข็งเก็บรักษาเซลล์ทิ้งเหลือเฉพาะเซลล์ เติมน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้ลงในหลอดทำการดูดขึ้นลงเบาๆ แล้วดูดใส่ลงในฟลasks เลี้ยงเซลล์ จากนั้นทำการเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ให้ครบ 5 มิลลิลิตร แล้วเติมยาปฏิชีวนะเพิ่ม 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการบำรุงดูแลรักษาเซลล์จนกว่าเซลล์จะมีจำนวนเพียงพอสำหรับการทดลอง

4.2 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

เตรียมสารสกัดรากข้าวและรากข้าวหมักโดยชั่งสารสกัดตามความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นทำการละลายใน DMSO ที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการเขย่าสารสกัดให้เข้ากันด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ □ หลังจากนั้นเติมน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อเป็นการปรับความเข้มข้นของสารละลายให้ได้ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาเจือจางตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ต้องการ

คือ 50, 100 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจะทำการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน นำสารสกัดไปเก็บแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.3 การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งด้วย MTT assay (ตามวิธีของ Thirabunyanon et.al., 2009)

วิธีการวิเคราะห์โดยการนำเซลล์มะเร็งที่เติมที่เจริญแล้วและเกาะเป็นแผ่นชั้นเดียวกับพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยง มาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ Trypsin EDTA 0.25 เปอร์เซ็นต์ เพื่อย่อยให้เซลล์เป็นเซลล์เดี่ยวๆ จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอา เอนไซม์ ออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 3 มิลลิลิตร ทำการนับจำนวนเซลล์โดยใช้ฮีโมไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) จากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วทำการเติมเซลล์ลงในถาดหลุมขนาด 96 หลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเติมสารสกัดที่เตรียมไว้ที่ระดับความเข้มข้นที่ต่างกันลงในหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจะทำการเติม MTT 10 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อสารละลาย DMSO 1 มิลลิลิตร) บ่มเพาะเลี้ยงในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และทำการเติม DMSO 100 ไมโครลิตรเพื่อละลายผลึก formazan บ่มต่อเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ดังนี้

$$\% \text{ cell viability} = (\text{sample O.D}/\text{control O.D}) \times 100$$

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

ผลของการสกัดสารสกัดจากรำข้าวและรำข้าวหมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* MP9

ผลผลิตของสารสกัดจากรำข้าว รำข้าวหมัก และรำข้าวไม่ได้หมัก

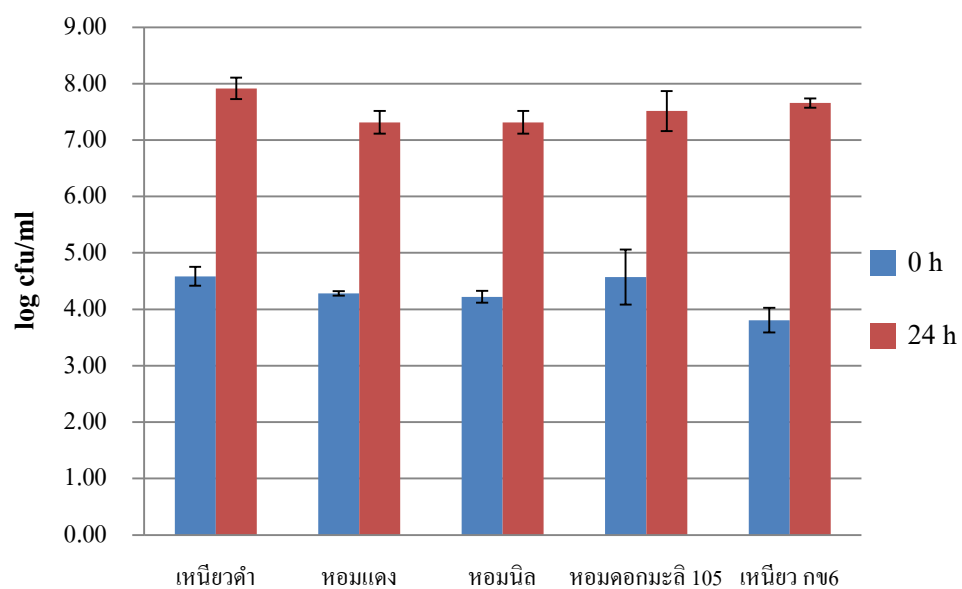
ผลจากการนำรำข้าวทั้งหมด 5 สายพันธุ์ มาทำการสกัดเอาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลที่มีความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้รำข้าวทั้ง 20 กรัม และการนำรำข้าวไปหมักและไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* MP9 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งรำข้าวที่นำมาใช้ในการสกัดมีน้ำหนักทั้งหมด 13.5 กรัม จากนั้นนำมาสกัดต่อด้วยตัวทำละลายเมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดมีเปอร์เซ็นต์ผลผลิตสูงสุด คือ รำข้าวหอมนิลมีผลผลิต 2.83 กรัม หรือร้อยละ 14.14 ของน้ำหนักแห้ง เช่นเดียวกับส่วนของรำข้าวหอมนิลหมักและไม่ได้หมักมีผลผลิตที่ได้เท่ากับ 3.62 และ 3.41 กรัม หรือร้อยละ 26.79 และ 25.24 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ รองลงมา ได้แก่ รำข้าวเหนียวดำ หอมแดง เหนียว กข 6 และหอมดอกมะลิ 105 ตามลำดับ (ตาราง 1)

การเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก

ผลจากการนำรำข้าวมาหมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกสายพันธุ์ *B. subtilis* MP9 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากถั่วเน่า แบคทีเรียมีความสามารถในการหมักรำข้าวโดยสังเกตจากการเจริญของแบคทีเรียจากจำนวนเริ่มต้นโดยเฉลี่ย 4.29 log cfu/ml เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมานับจำนวนอีกครั้งพบว่าแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเป็นโดยเฉลี่ย 7.54 log cfu/ml (ภาพ 2) แบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการหมักถั่วเหลือง ซึ่งในถั่วเหลืองมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นโปรตีน เช่นเดียวกับรำข้าวที่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย และยังอุดมไปด้วยสารต่างๆ หลายชนิด แบคทีเรียสายพันธุ์ *B. subtilis* นี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเชิงซ้อนที่มีอยู่ในวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น กากเมล็ดฝ้ายและกากน้ำตาล (ไวรุจน์ และคณะ, 2550) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอส เพื่อนำเอนไซม์นี้ไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ (Degering et al., 2010)

ตาราง 1 ผลผลิตของสารสกัดจากรำข้าว รำข้าวหมักและไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก
B. subtilis MP9 (Means $\pm$ SD, n = 3)

สายพันธุ์ข้าว	แหล่งของสารสกัด	น้ำหนักของสารสกัด	ร้อยละของน้ำหนักแห้ง
เหนียวดำ	รำข้าว	2.7	13.72
	รำข้าวหมัก	2.73 $\pm$ 0.27	20.20 $\pm$ 2.00
	รำข้าวไม่ได้หมัก	2.54 $\pm$ 0.23	18.82 $\pm$ 1.40
หอมแดง	รำข้าว	2.50	12.51
	รำข้าวหมัก	1.78 $\pm$ 0.35	13.19 $\pm$ 2.59
	รำข้าวไม่ได้หมัก	1.47 $\pm$ 0.31	10.86 $\pm$ 2.26
หอมนิล	รำข้าว	2.83	14.14
	รำข้าวหมัก	3.62 $\pm$ 0.78	26.79 $\pm$ 2.09
	รำข้าวไม่ได้หมัก	3.41 $\pm$ 0.29	25.24 $\pm$ 5.80
หอมดอกมะลิ 105	รำข้าว	1.28	6.40
	รำข้าวหมัก	1.90 $\pm$ 0.32	14.07 $\pm$ 2.4
	รำข้าวไม่ได้หมัก	1.74 $\pm$ 0.06	12.86 $\pm$ 0.45
เหนียว กข 6	รำข้าว	2.34	11.69
	รำข้าวหมัก	2.10 $\pm$ 0.32	15.56 $\pm$ 2.4
	รำข้าวไม่ได้หมัก	1.94 $\pm$ 0.13	14.40 $\pm$ 0.96



ภาพ 2 ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* MP9 ในรำข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ที่นำมาหมัก

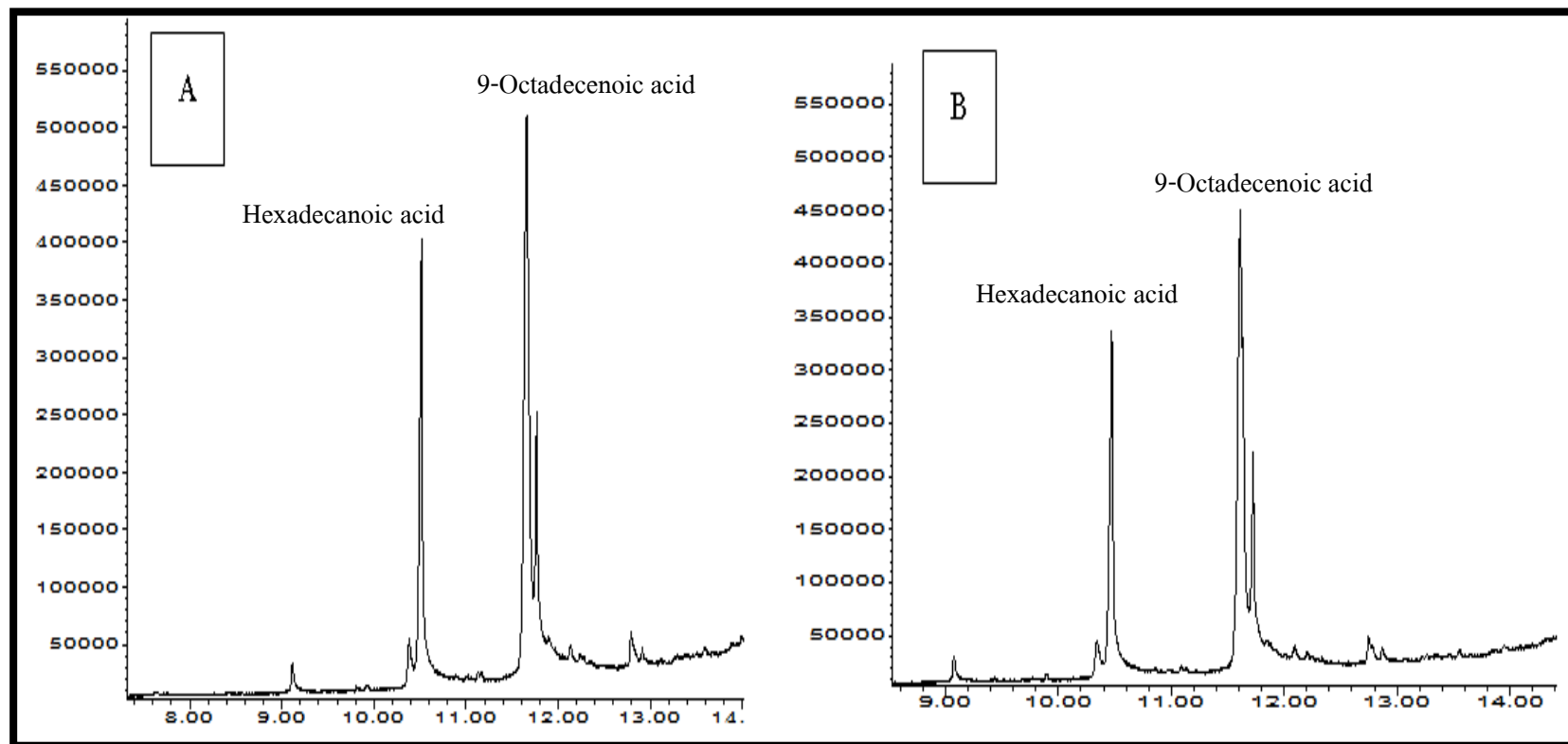
ผลการวิเคราะห์สารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย GC-MS

ผลการนำรำข้าวไปหมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกสายพันธุ์ *B. subtilis* MP9 แล้วทำการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่วิเคราะห์ได้จากรำข้าวทั้งหมด 5 สายพันธุ์ มีค่าต่างกันออกไป โดยมีช่วงเวลาและเปอร์เซ็นต์ที่พบ ดังมีรายละเอียดในแต่ละพันธุ์ ดังนี้

สารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในข้าวเหนียวดำหมัก (ตาราง 2) คือ สาร hexadecanoic acid (กรดปาล์มติก) octadecanoic acid (กรดสเตียริก) จัดเป็นประเภทกรดไขมันอิ่มตัว และ 9-octadecenoic acid หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า กรดโอเลอิก (oleic acid) จัดเป็นประเภทกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวจะพบว่าสารทั้งสามชนิดมีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้หมัก นอกจากนี้รำข้าวที่ไม่ได้หมักยังพบว่าสาร tetradecanoic acid หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า กรดไมริสติก (myristic acid) แต่ไม่พบสารชนิดนี้ในรำข้าวที่หมัก (ภาพ 3) ซึ่งสารเหล่านี้เมื่อนำไปเทียบกับสารมาตรฐานที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของเครื่อง GC-MS จะมีความถูกต้อง 90 – 99 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 2 ปริมาณสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย GC-MS ของรำข้าวเหนียวดำหมักและไม่ได้หมัก

ข้าวเหนียวดำหมัก			ข้าวเหนียวดำไม่ได้หมัก		
เวลา	ปริมาณสารต่อ	ชื่อสาร	เวลา	ปริมาณสารต่อ	ชื่อสาร
	1 ไมโครลิตร (เปอร์เซ็นต์)			1 ไมโครลิตร (เปอร์เซ็นต์)	
10.38	2.303	9-Hexadecenoic acid	9.07	2.010	Tetradecanoic acid
10.52	18.715	Hexadecanoic acid	10.35	2.527	9-Octadecenoic acid
11.66	34.018	9-Octadecenoic acid	10.49	20.180	Hexadecanoic acid
11.77	8.555	Octadecanoic acid	11.63	34.913	9-Octadecenoic acid
14.54	-0.870	di-(9-octadecenoyl)-glycerol	11.74	8.523	Octadecanoic acid
			12.75	2.240	Oleic acid



ภาพ 3 พิกของสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่วิเคราะห์ได้ด้วย GC-MS 1

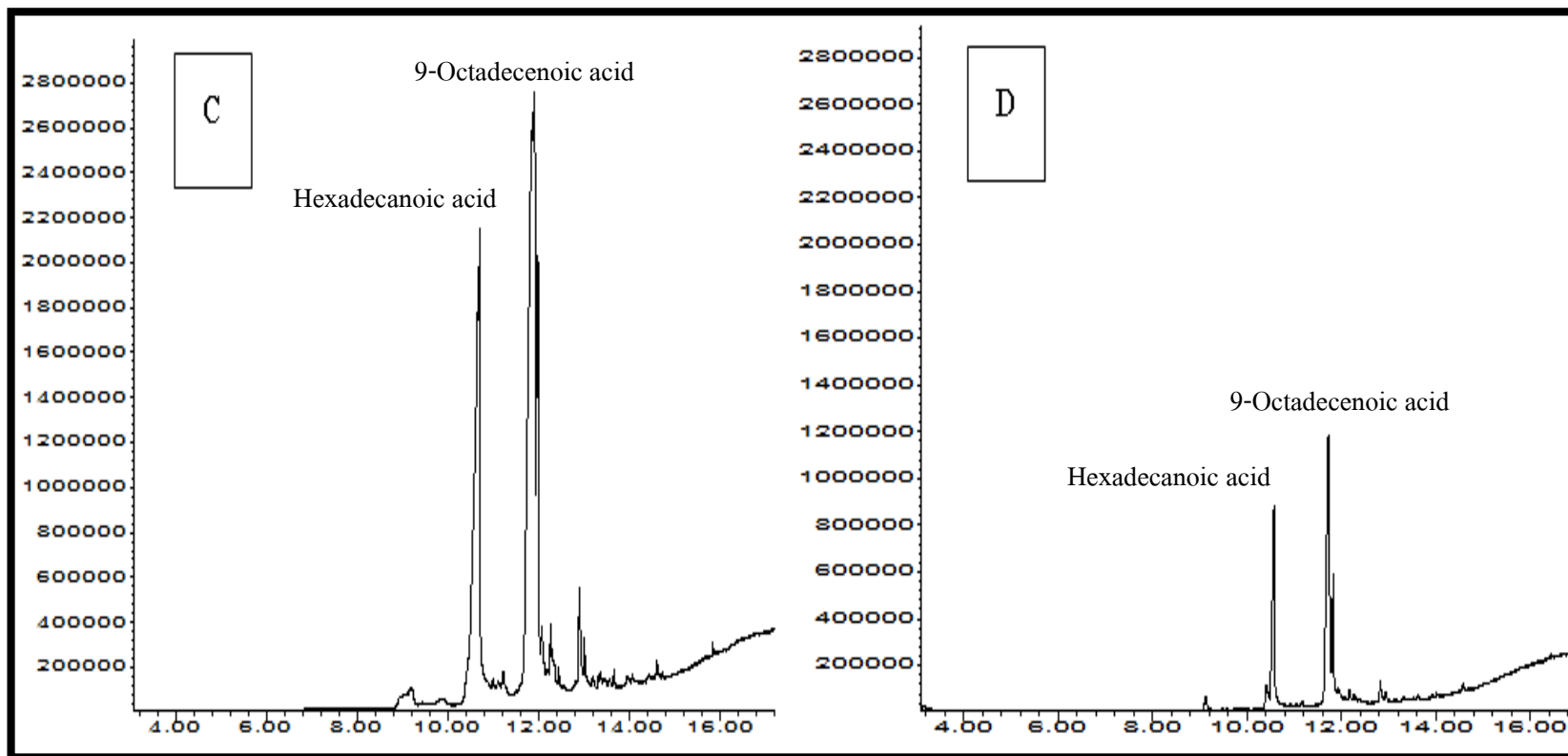
(A) ราข้าวเหนียวดำที่หมักด้วยแบคทีเรียโอบิดัก *B. subtilis* MP9

(B) ราข้าวเหนียวดำที่ไม่ได้การหมัก

สารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในข้าวหอมแดงหมักและรำข้าวไม่ได้หมัก (ตาราง 3) คือ hexadecenoic acid, octadecanoic acid, tetradecanoic acid, oleic acid และ octadecanoic acid รำข้าวที่หมักจะมีปริมาณสูงกว่ารำข้าวที่ไม่ได้หมัก นอกจากนี้รำข้าวหมักยังพบสาร linoleic acid (กรดลิโนเลอิก) 9-hexadecenoic acid หรือกรดพาล์มิทอลิอิก (palmitoleic Acid) จัดเป็นประเภทกรดไขมันไม่อิ่มตัว กรดไขมันประเภทนี้จะพบมากในน้ำมันพืช แต่ในขณะที่ในรำข้าวไม่ได้หมักจะไม่พบสารเหล่านี้ และในรำข้าวไม่ได้หมักจะพบสาร eicosanoic acid และ 9,12-octadecadienoic acid ซึ่งจะมีปริมาณมากกว่ารำข้าวหมัก (ภาพ 4) ซึ่งสารเหล่านี้เมื่อนำไปเทียบกับสารมาตรฐานที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของเครื่อง GC-MS จะมีความถูกต้อง 90 – 99 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 3 ปริมาณสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย GC-MS ของรำข้าวหอมแดงหมักและไม่ได้หมัก

ข้าวหอมแดงหมัก			ข้าวหอมแดงไม่ได้หมัก		
เวลา	ปริมาณสารต่อ	ชื่อสาร	เวลา	ปริมาณสารต่อ	ชื่อสาร
	1 ไมโครลิตร (เปอร์เซ็นต์)			1 ไมโครลิตร (เปอร์เซ็นต์)	
9.12	1.220	Tetradecanoic acid	9.14	0.913	Tetradecanoic acid
10.43	2.840	9-Hexadecenoic acid	10.42	1.988	15-Hexadecanolide
10.7	45.027	Hexadecanoic acid	10.58	14.770	Hexadecanoic acid
11.9	46.640	9-Octadecenoic acid	11.73	27.310	9-Octadecenoic acid
11.98	9.033	Octadecanoic acid	11.83	6.263	Octadecanoic acid
12.06	2.230	9,12-Octadecadienoic acid	11.95	3.150	9,12-Octadecadienoic acid
12.27	1.030	Linoleic acid	12.83	1.283	Oleic acid
12.84	1.850	Oleic acid	12.95	0.710	Eicosanoic acid
13.32	0.140	Eicosanoic	14.58	0.650	9-Octadecenal
14.61	0.340	9-Octadecenoic acid			



ภาพ 4 พิกของสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่วิเคราะห์ได้ด้วย GC-MS 2

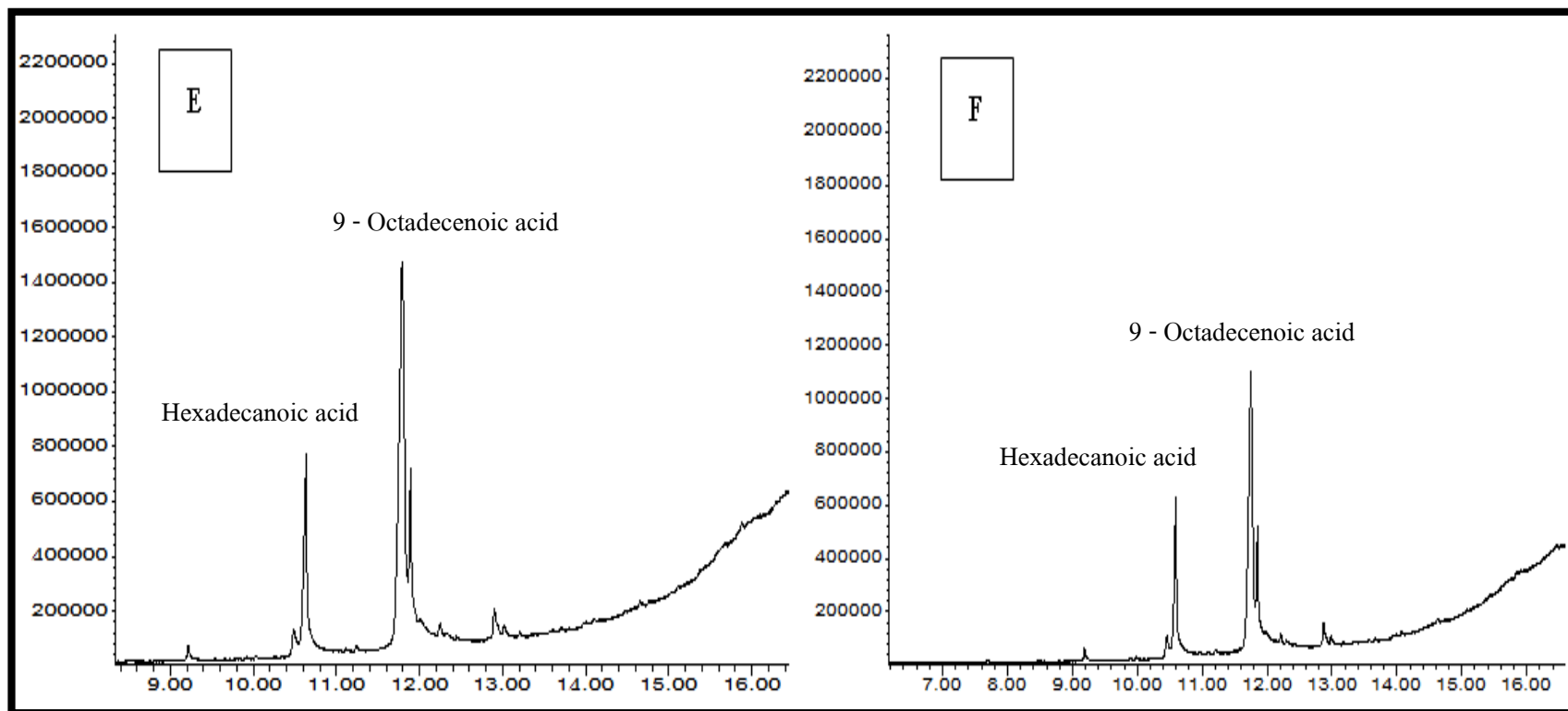
(C) ราข้าวหอมแดงที่หมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* MP9

(D) ราข้าวหอมแดงที่ไม่ได้หมัก

สารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในข้าวหอมนิลหมักและรำข้าวไม่ได้หมัก (ตาราง 4) คือ tetradecanoic acid, 15-hexadecanolide, hexadecanoic acid, 9-octadecenoic acid และ oleic acid รำข้าวที่หมักจะมีปริมาณต่ำกว่ารำข้าวที่ไม่ได้หมัก และยังพบสาร octadecanoic acid ในรำข้าวที่ไม่ได้หมักมีปริมาณมากกว่ารำข้าวที่หมัก นอกจากนี้รำข้าวหมักยังพบสาร linoleic acid และ 9,17-octadecadienal แต่ไม่พบในรำข้าวที่ไม่ได้หมัก (ภาพ 5) ซึ่งสารเหล่านี้เมื่อนำไปเทียบกับสารมาตรฐานที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของเครื่อง GC-MS จะมีความถูกต้อง 90 – 99 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 4 ปริมาณสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย GC-MS ของรำข้าวหอมนิลหมักและไม่ได้หมัก

ข้าวหอมนิลหมัก			ข้าวหอมนิลไม่ได้หมัก		
ปริมาณสารต่อ 1			ปริมาณสารต่อ 1		
เวลา	ไมโครลิตร	ชื่อสาร	เวลา	ไมโครลิตร	ชื่อสาร
	(เปอร์เซ็นต์)			(เปอร์เซ็นต์)	
9.24	0.615	Tetradecanoic acid	9.2	0.780	Tetradecanoic acid
10.51	1.555	15-Hexadecanolide	10.47	2.065	15-Hexadecanolide
10.65	11.740	Hexadecanoic acid	10.59	17.167	Hexadecanoic acid
11.82	30.913	9-Octadecenoic acid	11.77	34.708	9-Octadecenoic acid
11.92	8.650	Octadecanoic acid	11.89	8.005	Octadecanoic acid
12.02	2.243	9,17-Octadecadienal	12	4.740	9-Octadecenoic acid
12.27	0.477	Linoleic acid	13	0.793	Oleic acid
13.04	0.505	9-Octadecenal	14.62	0.730	9-Octadecenoic acid
13.62	0.865	Oleic acid			
14.67	2.24	9-Octadecenoic acid			



ภาพ 5 พิกของสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่วิเคราะห์ได้ด้วย GC-MS 3

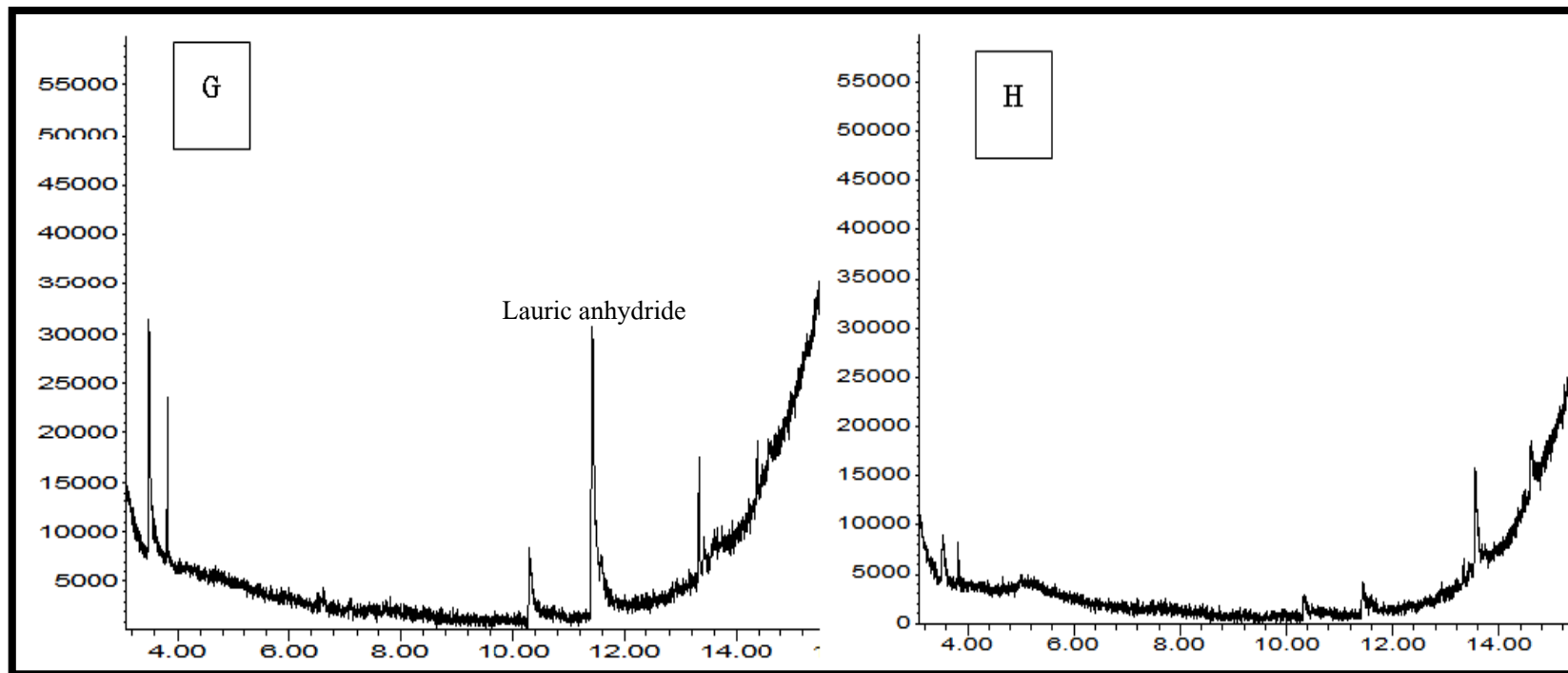
(E) ราข้าวหอมนิลที่หมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* MP9

(F) ราข้าวหอมนิลที่ไม่ได้หมัก

สารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในข้าวหอมดอกมะลิหมัก 105 และ ข้าวขาวไม่ได้หมัก (ตาราง 5) คือ สารชนิดใหม่ที่ไม่พบในฐานข้อมูลในช่วงเวลา 3.49, 10.32, 11.42 และ 14.61 แต่จะไม่พบสารเหล่านี้ในข้าวที่ไม่ได้หมัก ส่วนในข้าวที่ไม่ได้หมักจะพบสารในช่วงเวลา 13.56 และสารที่พบทั้งในข้าวหมักและไม่ได้หมักในช่วงเวลา 3.82 และ 3.83 มีปริมาณสารของข้าวหมักมากกว่าข้าวขาวไม่ได้หมัก (ภาพ 6)

ตาราง 5 ปริมาณสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย GC-MS ของข้าวหอมดอกมะลิ 105 หมักและไม่ได้หมัก

ข้าวหอมดอกมะลิ 105 หมัก			ข้าวหอมดอกมะลิ 105 ไม่ได้หมัก		
เวลา	ปริมาณสารต่อ 1 ไมโครลิตร (เปอร์เซ็นต์)	ชื่อสาร	เวลา	ปริมาณสารต่อ 1 ไมโครลิตร (เปอร์เซ็นต์)	ชื่อสาร
3.49	3.933	Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	3.82	0.353	Cyclotetrasiloxane
3.83	1.400	Cyclotetrasiloxane	13.56	2.080	1H-Indole, 2- methyl-3-phenyl-
10.32	1.810	Lauric anhydride	15.61	2.085	Cyclotrisiloxane
11.42	9.357	9,17-Octadecadienal	15.73	2.550	Cyclotrisiloxane
11.58	1.467	7-Hexadecenoic acid	15.83	2.760	2-(Acetoxymethyl)- 3-(methoxycarbon
14.61	1.090	Arsenous acid	15.89	3.090	Cyclotrisiloxane
15.53	3.380	Silicic acid	15.93	8.565	2-(Acetoxymethyl)- 3-(methoxycarbon
15.60	2.300	2-(Acetoxymethyl)- 3-(methoxycarbon	15.97	3.100	Cyclotrisiloxane
16.31	2.500	Cyclotrisiloxane			
16.39	3.290	Tetrasiloxane			



ภาพ 6 พิกของสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่วิเคราะห์ได้ด้วย GC-MS 4

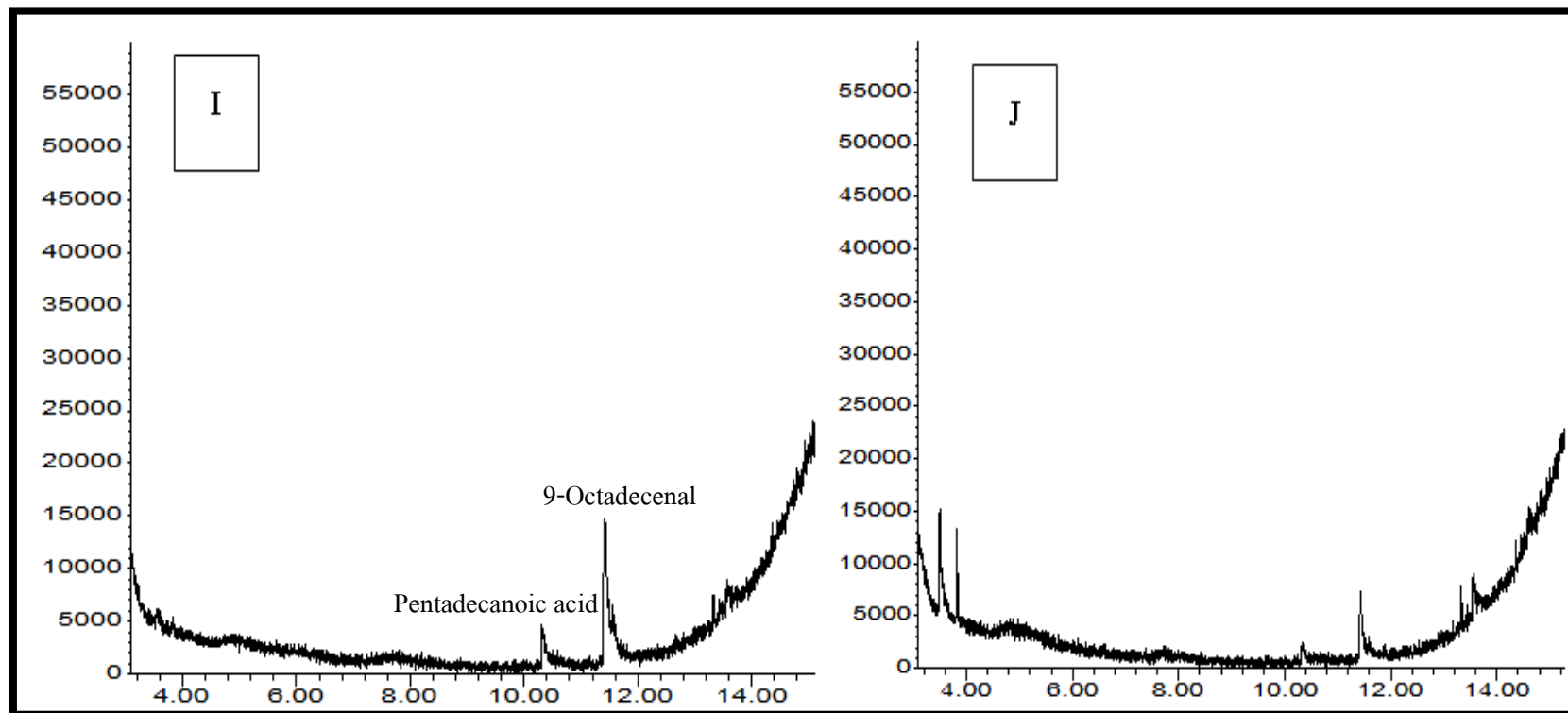
(G) รำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่หมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* MP9

(H) รำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่ไม่ได้หมัก

สารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในข้าวเหนียว กข 6 หมักและรำข้าวไม่ได้หมัก (ตาราง 6) คือ สารชนิดใหม่ที่ไม่อยู่ในฐานข้อมูลในช่วงเวลา 10.31, 14.36 และ 15.11 แต่ไม่พบในรำข้าวที่ไม่ได้หมัก ส่วนรำข้าวที่หมักจะพบสารในช่วงเวลา 3.5, 3.83 และ 14.61 สารที่พบทั้งรำข้าวหมักและไม่ได้หมักในช่วงเวลา 11.42 - 11.43 ปริมาณสารที่พบของรำข้าวหมักจะมีปริมาณสูงกว่ารำข้าวที่ไม่ได้หมัก (ภาพ 7)

ตาราง 6 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย GC-MS ของรำข้าวเหนียว กข 6 หมักและไม่ได้หมัก

ข้าวเหนียว กข 6 หมัก			ข้าวเหนียว กข 6 ไม่ได้หมัก		
เวลา	ปริมาณสารต่อ 1 ไมโครลิตร (เปอร์เซ็นต์)	ชื่อสาร	เวลา	ปริมาณสารต่อ 1 ไมโครลิตร (เปอร์เซ็นต์)	ชื่อสาร
10.31	-0.235	Pentadecanoic acid	3.5	2.485	Cyclotrisiloxane
11.42	6.315	9-Octadecenal	3.83	1.170	Cyclotetrasiloxane
14.36	1.180	Silicic acid	11.43	2.365	9,12- Octadecadienoyl chloride
15.11	1.350	Silicic acid	14.61	1.950	Silicic acid
15.29	1.850	Cyclotrisiloxane	15.3	1.430	2- (Acetoxymethyl)- 3-(methoxycarbon
15.46	1.515	Hexylidencyclohexane	15.61	4.830	Cyclotrisiloxane
15.78	4.285	Cyclotrisiloxane	15.81	6.150	Silicic acid
15.86	3.610	Cyclotrisiloxane	15.9	4.295	Cyclotrisiloxane
15.97	3.120	Cyclotrisiloxane	15.92	2.225	Cyclotrisiloxane
16.1	24.790	Cyclotrisiloxane	16.02	2.040	Cyclotrisiloxane
			16.06	3.210	Cyclotrisiloxane
			16.15	2.955	Silicic acid



ภาพ 7 พีคของสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่วิเคราะห์ได้ด้วย GC-MS 5

(I) ราข้าวเหนียว กข 6 ที่หมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *B subtilis* MP 9

(J) ราข้าวเหนียว กข 6 ที่ไม่ได้หมัก

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH

1. ผลของรำข้าวสากัดด้วยเมทานอล 5 สายพันธุ์ ต่อการต้านอนุมูลอิสระ

รำข้าวเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้มาจากธรรมชาติโดยจะพบว่าข้าวแต่ละสายพันธุ์จะมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยทำการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดจากรำข้าวทั้งหมด 5 สายพันธุ์ คือ ข้าวเหนียวดำ ข้าวหอมแดง ข้าวหอมนิล ข้าวหอมดอกมะลิ 105 และ ข้าวเหนียว กข 6 โดยที่รำข้าวจะผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาเตรียมให้ได้ความเข้มข้นทั้งหมด 5 ความเข้มข้น คือ 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่ารำข้าวสากัดจากรำข้าวเหนียวดำจะมีสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด และตามด้วยข้าวหอมแดง หอมนิล หอมดอกมะลิ 105 และเหนียว กข 6 ตามลำดับ (ตาราง 7) โดยจะพบว่าที่ความเข้มข้นที่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 50.44 ± 1.69 , 34.99 ± 1.49 , 16.46 ± 1.49 , 10.21 ± 0.88 และ 10.24 ± 0.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งค่าการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH จากรำข้าวแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ระหว่างข้าวหอมดอกมะลิ 105 กับเหนียว กข 6 มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ภาพ 8) การทดสอบครั้งนี้จะสังเกตได้ว่าข้าวที่มีเมล็ดสี คือ ข้าวเหนียวดำ หอมแดง และหอมนิล จะมีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าข้าว 2 สายพันธุ์ที่ไม่มีเมล็ดสี

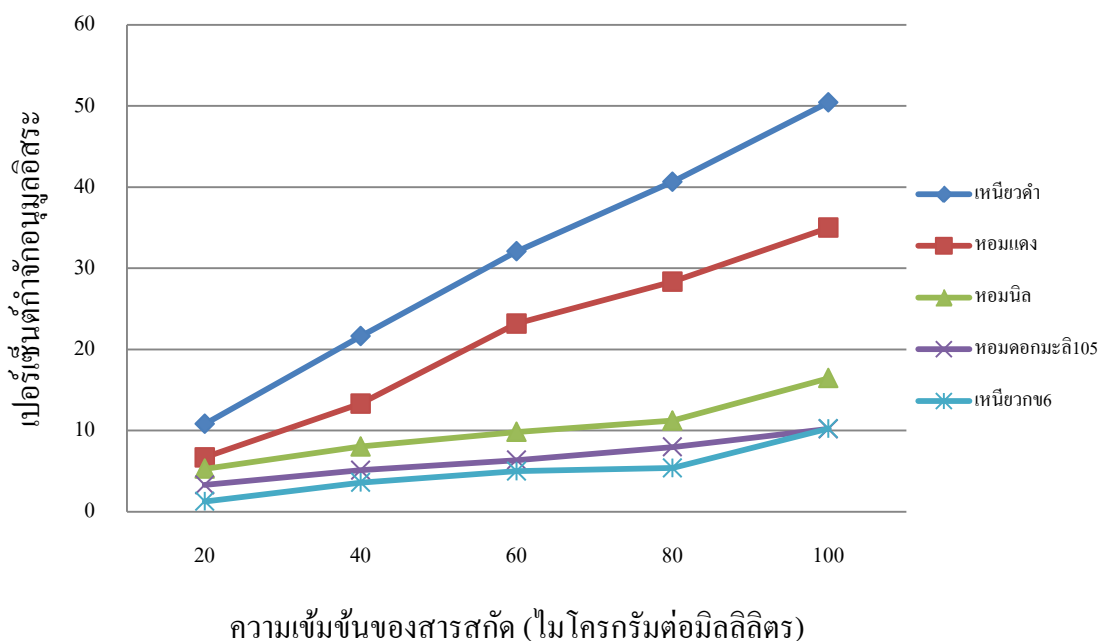
สารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่จะพบในพืชที่มีสี โดยพบว่าในข้าวบางพันธุ์จะมีความเข้มข้นของสีที่แตกต่างกันซึ่งพบอยู่ในชั้นของรำข้าว เม็ดสีของข้าวจะแบ่งออกเป็น สีดำ สีแดง และสีเขียว ซึ่งสารประกอบไปด้วย แอนโทไซยานิน (anthocyanin) และ โปรแอนโทไซยานิน (proanthocyanidin) (Rao et al., 2010; Finocchiaro et al., 2010; Laokuldilok et al., 2011) ข้าวสีดำจะมีส่วนประกอบของ แอนโทไซยานิน และสารประกอบกลุ่ม polyphenolic มากกว่าข้าวสีขาว (Ryu et al., 1998; Zhang et al., 2003) ซึ่งสารแอนโทไซยานินนั้นเป็นสารที่ให้สีตามธรรมชาติในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่มีขนาดใหญ่ จึงทำให้มีความแตกต่างกันทั้งทางเภสัชวิทยาและชีววิทยา เช่น เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ช่วยต้านอนุมูลอิสระ สามารถลดอาการอักเสบ (antiinflammatory) โดยเพิ่มความแข็งแรงของเส้นใยโปรตีน

ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) และกระดูกอ่อน (cartilage) โดยช่วยลดการทำลายจากอนุมูลอิสระที่สำคัญ ได้แก่ DPPH•, O₂⁻, OH•, O₂ และ H₂O₂ (Peng et al., 2006)

ตาราง 7 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH จากสารสกัดจากรำข้าว 5 สายพันธุ์
(Means ± SD, n = 6)

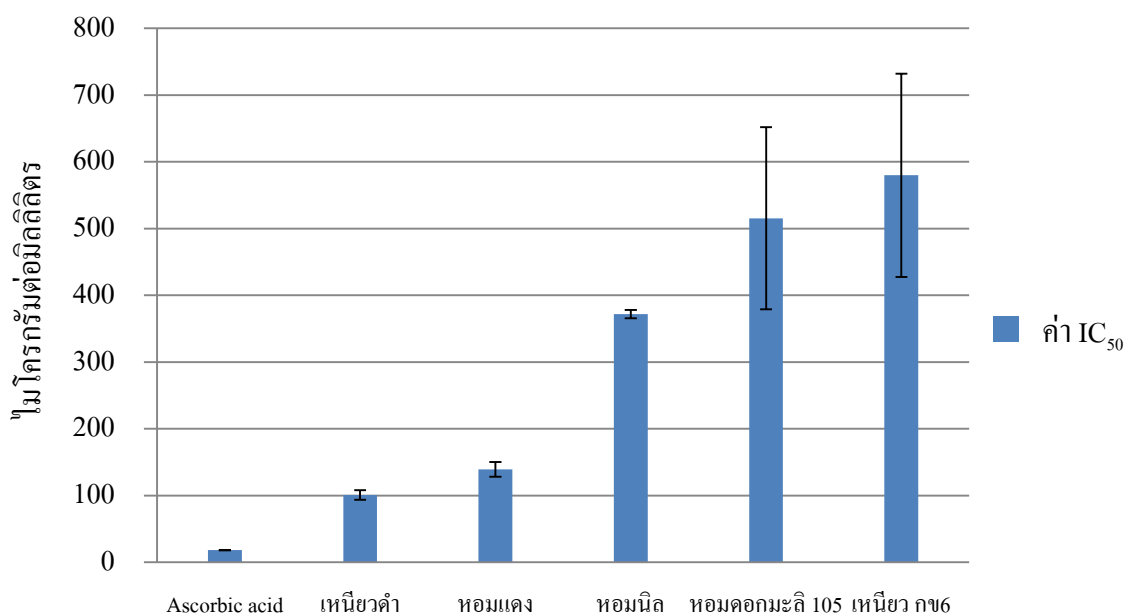
ความเข้มข้น ของสารสกัด (ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร)	สารสกัดจากรำข้าว				
	เหนียวดำ	หอมแดง	หอมนิล	หอมดอก มะลิ 105	เหนียว กข 6
20	10.81 ± 0.25 ^a	6.82 ± 0.42 ^b	6.48 ± 0.7 ^b	3.30 ± 0.41 ^d	1.27 ± 0.97 ^d
40	21.62 ± 0.49 ^a	13.31 ± 1.22 ^b	8.51 ± 0.97 ^c	5.11 ± 0.396 ^d	3.73 ± 0.434 ^d
60	32.08 ± 1.1 ^a	23.18 ± 1.52 ^b	9.82 ± 0.65 ^c	6.34 ± 0.63 ^d	5.00 ± 0.24 ^d
80	40.64 ± 1.12 ^a	28.34 ± 1.39 ^b	10.67 ± 1.02 ^c	7.98 ± 0.81 ^d	5.80 ± 0.43 ^d
100	50.44 ± 1.69 ^a	34.99 ± 1.49 ^b	16.46 ± 1.49 ^c	10.21 ± 0.88 ^d	10.23 ± 0.74 ^d

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละแถวแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
($P < 0.05$)



ภาพ 8 เปอร์เซนต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากรำข้าวทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากการคำนวณหาค่า IC_{50} (inhibitory concentration) ความเข้มของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง (antagonist) ได้ 50 เปอร์เซนต์ ของสารสกัดจากรำข้าวสกัดทั้งหมด 5 สายพันธุ์ และสารมาตรฐาน ascorbic acid (ภาคผนวก ก) เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานพบว่าสารมาตรฐานมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด รองลงมา ได้แก่ ข้าวเหนียวดำ หอมแดง หอมนิล หอมดอกมะลิ 105 และเหนียว กษ 6 (ภาพ 9) ค่าที่ได้มีปริมาณ 18.23, 100.77, 139.06, 371.69, 515.39 และ 579.85 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



ภาพ 9 ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ของสารสกัดจากรำข้าว และสารมาตรฐาน ascorbic acid

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระนั้น มีรายงานของ Muntana and Prason, (2010) ที่ได้การเปรียบเทียบระหว่างข้าวสีแดง ข้าวสีดำ และข้าวขาวที่ผ่านการสกัดด้วยเมทานอล พบว่าข้าวสีแดงจะมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าข้าวทั้งสองสี โดยเปรียบเทียบจากค่า IC_{50} ซึ่งข้าวสีแดงจะมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 0.0057 ส่วนข้าวสีดำจะอยู่ที่ 0.0218 และข้าวขาวจะอยู่ที่ 0.2582 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร และจากรายงานของ Jun et al. (2012) ที่ได้ทดสอบรำข้าว 3 ชนิด คือ ข้าวสีดำ สีแดง และสีเขียว โดยสกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตน พบว่าค่า EC_{50} (effective concentration) ของข้าวสีแดงมีค่าต้านอนุมูลอิสระดีกว่าข้าวทั้งสองสี 112.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวจะสอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ คือ ข้าวสีแดงจะมีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด

2. ผลของรำข้าวหมักและไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ *B. subtilis* MP9 ต่อการต้านอนุมูลอิสระ

การนำรำข้าวมาหมักด้วยด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ *B. subtilis* MP9 เพื่อต้องการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียชนิดนี้ว่ามีความสามารถในการหมักรำข้าว และมีประสิทธิภาพการเพิ่มขึ้นของสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งปริมาณและชนิดหรือไม่ ดังนั้นจึงได้ทำการเปรียบเทียบสารสกัดจากรำข้าวที่หมักและไม่ได้หมัก ผลการทดสอบความสามารถในการต้านทานอนุมูลอิสระของรำข้าวที่หมักด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ *B. subtilis* MP9 พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของรำข้าวเหนียวดำและหอมนิลที่หมักที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร มีค่าการต้านอนุมูลอิสระลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับรำข้าวที่ไม่ได้หมัก โดยมีเปอร์เซ็นต์ การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ $(39.09 \pm 0.59; 48.03 \pm 1.65)$ และ $(8.27 \pm 1.00; 10.85 \pm 2.65)$ ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่รำข้าวหอมแดง หอมดอกมะลิ 105 และเหนียว กข 6 ที่หมักและไม่ได้หมักเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ $(23.29 \pm 0.59; 17.35 \pm 2.65)$, $(11.07 \pm 1.35; 9.65 \pm 0.42)$ และ $(10.32 \pm 1.13; 7.71 \pm 0.79)$ ตามลำดับ (ตาราง 8)

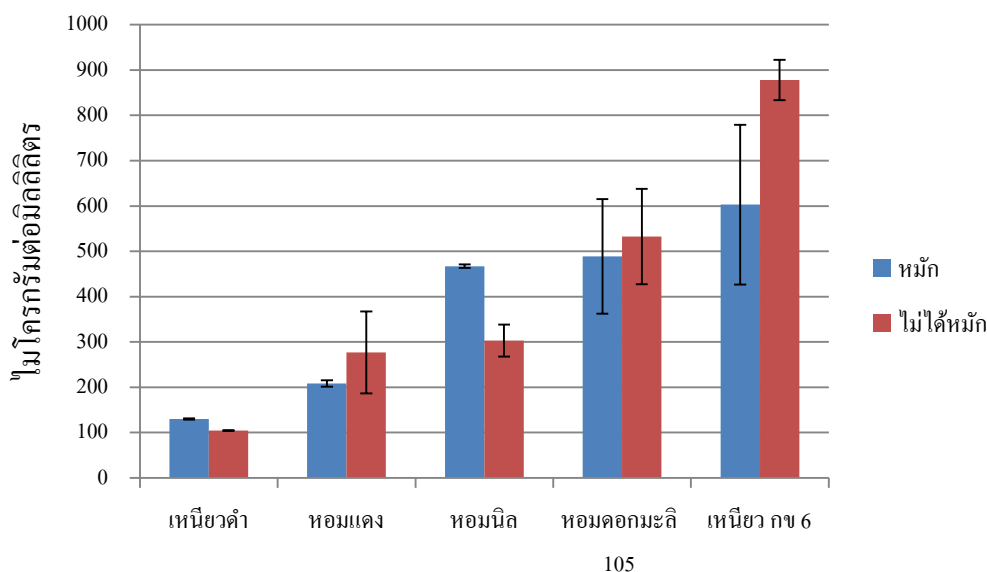
รำข้าวที่ผ่านการหมักจะเกิดกลิ่นที่เหม็นคล้ายๆ กับข้าวบูดเน่า เนื่องจากเกิดกิจกรรมต่างๆ ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการหมัก รำข้าวที่หมักด้วยแบคทีเรียจะมีแก๊สเกิดขึ้น เมื่อทำการคำนวณหาค่า IC_{50} (ภาคผนวก ค) รำข้าวเหนียวดำ หอมแดง หอมนิล หอมดอกมะลิ 105 และ เหนียว กข 6 หมักและไม่ได้หมัก จะมีค่าอยู่ที่ (129.84; 104.53) (208.14; 276.71) (461.23; 302.81) (488.67; 532.25) และ (602.94; 877.90) ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ โดยพบว่ารำข้าวเหนียวดำและหอมนิลหมักจะมีค่า IC_{50} สูงกว่ารำข้าวที่ไม่ผ่านการหมัก ส่วนข้าวหอมแดง หอมดอกมะลิ 105 และเหนียว กข 6 ค่า IC_{50} ของรำข้าวหมักจะมีค่าต่ำกว่ารำข้าวที่ไม่ได้หมัก (ภาพ 10)

ตาราง 8 ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากรำข้าว 5 สายพันธุ์ ที่หมักและไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกสายพันธุ์ *B. subtilis*

MP 9 (Means $\pm$ SD, n=6)

ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	เหนียวดำ		หอมแดง		หอมนิล		หอมดอกมะลิ105		เหนียว กข6	
	หมัก	ไม่ได้หมัก	หมัก	ไม่ได้หมัก	หมัก	ไม่ได้หมัก	หมัก	ไม่ได้หมัก	หมัก	ไม่ได้หมัก
20	6.10 $\pm$	6.28 $\pm$	3.25 $\pm$	2.44 $\pm$	-1.14 $\pm$	-5.62 $\pm$	1.75 $\pm$	1.99 $\pm$	3.77 $\pm$	2.72 $\pm$
	1.02 ^a	0.76 ^b	0.66 ^a	0.78 ^a	0.48 ^a	2.32 ^b	1.67 ^a	0.86 ^a	1.31 ^a	0.9 ^a
40	12.48 $\pm$	15.35 $\pm$	6.40 $\pm$	5.33 $\pm$	3.175 $\pm$	2.06 $\pm$	2.17 $\pm$	3.75 $\pm$	5.79 $\pm$	6.13 $\pm$
	0.64 ^a	0.73 ^b	0.72 ^a	0.56 ^a	0.73 ^a	0.75 ^b	1.16 ^a	0.61 ^a	1.00 ^a	1.60 ^a
60	19.89 $\pm$	26.47 $\pm$	11.142 $\pm$	9.61 $\pm$	5.13 $\pm$	7.52 $\pm$	5.23 $\pm$	7.24 $\pm$	6.86 $\pm$	4.74 $\pm$
	0.99 ^a	0.98 ^b	0.1 ^a	1.07 ^a	0.36 ^a	0.15 ^b	1.29 ^a	0.91 ^a	0.68 ^a	1.47 ^a
80	28.80 $\pm$	36.91 $\pm$	17.26 $\pm$	12.86 $\pm$	5.87 $\pm$	9.46 $\pm$	6.39 $\pm$	7.43 $\pm$	8.53 $\pm$	6.95 $\pm$
	0.69 ^a	1.63 ^b	0.69 ^a	1.63 ^a	0.60 ^a	0.12 ^b	0.54 ^a	1.04 ^a	0.99 ^a	0.95 ^a
100	39.09 $\pm$	48.03 $\pm$	23.29 $\pm$	17.35 $\pm$	8.27 $\pm$	10.85 $\pm$	11.07	9.65 $\pm$	10.32	7.71 $\pm$
	0.59 ^a	1.65 ^b	0.59 ^a	2.65 ^a	1.00 ^a	0.56 ^b	$\pm$ 1.35 ^a	0.42 ^a	$\pm$ 1.1 ^a	0.79 ^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละแถวแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพ 10 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) ของสารสกัดจากรำข้าวหมักสายพันธุ์ต่างๆ ที่หมักและไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* MP9

จากการรายงานของ Hong et al. (2008) ที่ได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดจากรำข้าวหมักด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus natto* (*B. subtilis*) และสารสกัดจากรำข้าวที่สกัดด้วยน้ำ พบว่าสารสกัดจากรำข้าวหมักมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดรำข้าวด้วยน้ำ 0.3 ถึง 10 เท่า รำข้าวที่หมักด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* ในสถานะที่เหมาะสมเมื่อนำไปศึกษาพบว่ามียกระดับของโปรตีนและแร่ธาตุเพิ่มขึ้น แต่จะส่งผลให้กรดไฟติก (phytic acid) ลดลง เนื่องจากกรดไฟติกมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Wizna et al., 2012) และเมื่อทำการหมักรำข้าวด้วย *B. natto* เป็นเวลา 64 ชั่วโมง และนำน้ำหมักที่ได้มาทำการวิเคราะห์หากรดไฟติก พบว่ากรดไฟติกมีปริมาณลดลง (Hong et al., 2009)

รำข้าวที่หมักด้วยโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Saccharomyces boulardii* เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC – MS พบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด อาทิเช่น salicylic, *p*-coumaric, ferulic, caffeic acid, α -tocopherol และ β -sitosterol รำข้าวสกัดจากพันธุ์ Wells ที่ไม่ได้หมักจะมีปริมาณ salicylic acid มากกว่าข้าวพันธุ์ Red Wells และ Neptune ในขณะที่ข้าวพันธุ์ Red well มีปริมาณ ferulic acid มากกว่า Neptune แต่พันธุ์ Neptune มีปริมาณสาร β -sitosterol น้อยกว่า

พันธุ์ Red well และ Well ในขณะที่รำข้าวที่หมักจะมีปริมาณของสาร p-coumaric acid ในข้าวพันธุ์ Red well ลดลง แต่มีสาร ferulic acid เพิ่มขึ้นในรำข้าวพันธุ์ Neptune และ Wells (Ryan et al., 2011)

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม

1. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวมในสารสกัดจากรำข้าว 5 สายพันธุ์

สารฟีนอลจัดเป็นสารที่มีความสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ ในการทดสอบครั้งนี้จะนำรำข้าว 5 สายพันธุ์ มาทำการสกัดและเตรียมสารสกัดให้ได้ความเข้มข้น 330 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอล ผลที่ได้พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจากรำข้าวเหนียวดำ หอมแดง หอมนิล หอมดอกมะลิ 105 และเหนียว กข 6 เท่ากับ 62.89 ± 1.06 , 50.70 ± 0.77 , 17.71 ± 1.36 , 10.34 ± 0.43 และ 10.64 ± 0.46 มิลลิกรัม gallic acid ต่อสารสกัด 1 กรัม ตามลำดับ (ตาราง 9) โดยพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมจากรำข้าวสายพันธุ์ที่แตกต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่รำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวเหนียว กข 6 มีปริมาณฟีนอลไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตาราง 9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจากรำข้าวทั้งหมด 5 สายพันธุ์
(Means $\pm$ SD, n = 6)

พันธุ์ข้าว	ฟีนอลรวม (มิลลิกรัม gallic acid ต่อสารสกัด 1 กรัม)
เหนียวดำ	62.89 ± 1.06^a
หอมแดง	50.70 ± 0.77^b
หอมนิล	17.71 ± 1.36^c
หอมดอกมะลิ 105	10.36 ± 0.43^d
เหนียว กข 6	10.66 ± 0.46^d

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

สารประกอบฟีนอลจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญ เป็นสารที่พบตามธรรมชาติในพืชหลากหลายชนิด สารประกอบฟีนอลพบได้ในส่วนของช่องว่างภายในเซลล์ แวกคิวโอลและในส่วนต่างๆ ของพืช ซึ่งพืชสร้างขึ้นมาเพื่อการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ของพืชแต่ละชนิด นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เกี่ยวกับการต้านทานต่อโรค โดยสารฟีนอลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิดได้ สารฟีนอลมีผลต่อการมีรสฝาดของผลไม้หลายชนิด ซึ่งจะขึ้นอยู่กับปริมาณสารฟีนอลในผล ในส่วนของรสมันก็มาจากสารในกลุ่มของฟีนอลเช่นเดียวกัน พืชที่มีสีที่มาจากสารแอนโทไซยานิน ก็เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลด้วยเช่นเดียวกัน

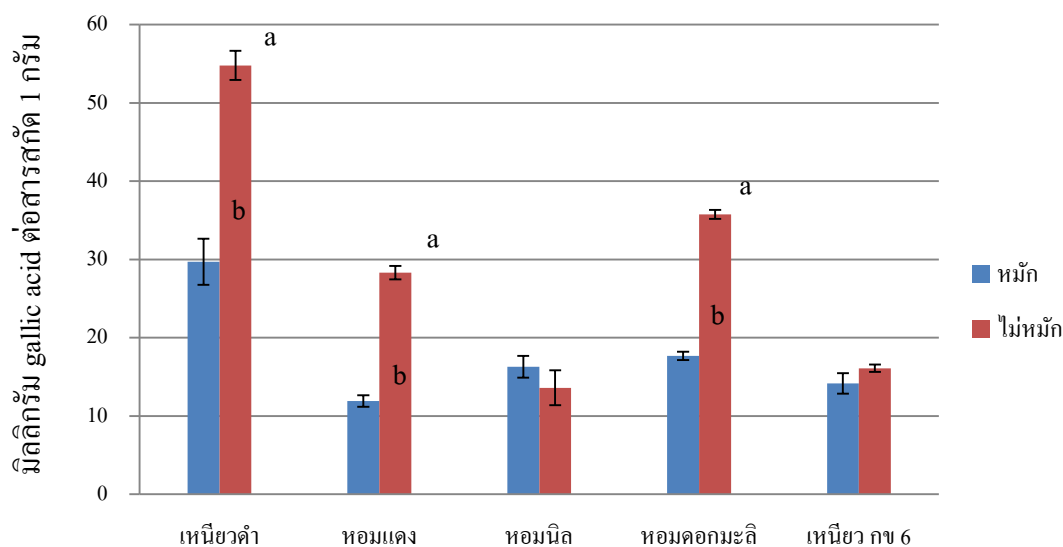
เมล็ดข้าวจัดเป็นเมล็ดธัญพืชที่สามารถพบสารประกอบฟีนอลเช่นเดียวกับพืชชนิดอื่น โดยพบว่ามีข้าวหลายสายพันธุ์และข้าวยังมีสีของเมล็ดที่แตกต่างกันออกไป เช่น สีดำ แดง น้ำตาล และเขียว ซึ่งแต่ละสีก็จะมีสารให้สีที่แตกต่างกันออกไป ข้าวที่มีสีดำและแดงจะมีองค์ประกอบของเมล็ดสีมากกว่าข้าวสีขาว โดยเมล็ดสีที่พบในเมล็ดข้าวจะมีผลต่อการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าข้าวที่ไม่มีเมล็ดสีหรือมีแต่น้อย จากการศึกษาของ Jun et al. (2012) ได้ทำการสกัดสารจากรำข้าวโดยใช้ตัวทำละลายสามชนิด คือ เมทานอล เอทานอล และอะซิโตน ผลการศึกษาพบว่ารำข้าวที่ได้จากข้าวสีแดงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมอยู่ที่ 256.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ส่วนข้าวสีดำมีปริมาณฟีนอลอยู่ที่ 225.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ในข้าวสีเขียวกว่า 40.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และข้าวสีน้ำตาล 59.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ซึ่งพบว่าข้าวสีแดงและสีดำจะมีปริมาณสารฟีนอลมากกว่าข้าวสีเขียวกว่าและสีน้ำตาล นอกจากสารฟีนอลที่พบว่าเกี่ยวข้องกับเมล็ดสีแล้ว ในรำข้าวสกัดยังพบว่าสารประกอบ ferulic, vanillic และ p-coumaric acids ดังนั้นข้าวสีแดงและข้าวดำจึงถือได้ว่าเป็นข้าวที่มีความสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด

นอกจากสารที่เกี่ยวข้องกับเมล็ดสีของข้าวแล้ว ในเมล็ดข้าวยังประกอบด้วยสารฟีนอลชนิดอื่นๆ ที่มีความสำคัญต่อการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลที่พบในรำข้าว อาทิ เช่น p-coumaric, ferulic, caffeic, sinapic, chlorogenic และ cinnamic acids ปริมาณของฟีนอลรวมจะมีปริมาณแตกต่างกันออกไปตามส่วนต่างๆ ของเมล็ดพืช ฟีนอลรวมที่พบในส่วนองเมล็ดข้าวสาร (endosperm) พบว่ามีปริมาณฟีนอลรวมอยู่ที่ 7.3-8.7 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม ส่วนในรำข้าวมีอยู่ 177.6 – 319.8 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม ในเมล็ดข้าวกล้องมีอยู่ 20.8 – 78.3 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม และในส่วนองแกลบมีอยู่ 477.6 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม และในส่วนองสารประกอบที่อยู่ในกลุ่มของฟีนอล พบว่าในส่วนองเมล็ดข้าวขาว รำข้าว และเมล็ดข้าวกล้องจะมีปริมาณ ferulic acids อยู่ที่ 56 – 77 เปอร์เซ็นต์ ของสารประกอบฟีนอลรวม รองลงมาได้แก่ p-coumaric acid 8 – 24 เปอร์เซ็นต์ sinapic acid 2 – 12 เปอร์เซ็นต์ gallic acid

1 – 6 เปอรฺ์เซ็นต์ protocatechuic acid 1 – 4 เปอรฺ์เซ็นต์ p-hydroxybenzoic acid 1 – 2 เปอรฺ์เซ็นต์ vanillic acid 1 เปอรฺ์เซ็นต์ และ syringic acid 1 เปอรฺ์เซ็นต์ และองค์ประกอบรองลงมาจากสารข้างต้นที่พบในเมล็ดข้าว คือ caffeic, chlorogenic, cinnamic และ ellagic acids 1 เปอรฺ์เซ็นต์ของสารประกอบฟีนอลรวมทั้งหมดที่พบในเมล็ดข้าว และในแกลบจะมีปริมาณ p-coumaric acid 71 เปอรฺ์เซ็นต์ ferulic acid 23 เปอรฺ์เซ็นต์ vanillic acid 3 เปอรฺ์เซ็นต์ และ syringic acid 1 เปอรฺ์เซ็นต์ (Goufo and Trindade, 2014) ดังนั้นรำข้าวจึงจัดว่าเป็นแหล่งที่มีสารประกอบฟีนอลมากอีกแหล่งหนึ่ง

2. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวมในสารสกัดจากรำข้าวหมักและไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* MP9

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในรำข้าวหมักและไม่ได้หมัก โดยจะนำค่า OD ที่วัดได้นำไปคำนวณหาปริมาณฟีนอลรวม จากกราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid (ภาคผนวก ค) พบว่ารำข้าวทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ ข้าวเหนียวดำ หอมแดง หอมนิล หอมดอกมะลิ 105 และ ข้าวเหนียว กข 6 ที่หมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกสายพันธุ์ *B. subtilis* MP9 และ ไม่ได้หมัก มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเท่ากับ 29.69 ± 2.94 ; 54.79 ± 1.86 , 11.91 ± 0.75 ; 28.32 ± 0.85 , 16.28 ± 1.4 ; 13.61 ± 2.21 , 17.67 ± 0.52 ; 35.75 ± 0.58 และ 14.17 ± 1.31 ; 16.10 ± 0.48 ตามลำดับ ซึ่งพบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของรำข้าวเหนียวดำ หอมแดง หอมดอกมะลิ 105 ที่หมักมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมลดลง เมื่อเทียบกับรำข้าวที่ไม่ได้หมัก แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่รำข้าวหอมนิลและเหนียว กข 6 ที่หมักและไม่ได้หมัก จะไม่พบความแตกต่างของปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (ภาพ 11) ทั้งนี้อาจจะมาจากรำข้าวที่ผ่านการหมักจะมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารเคมีบางชนิด ซึ่งสังเกตได้จากปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของรำข้าว 3 สายพันธุ์ที่หมักปริมาณฟีนอลลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจนส่งผลทำให้ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระลดลง



ภาพ 11 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจากรำข้าว 5 สายพันธุ์ที่หมักและไม่ได้หมัก ด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* MP9 (Means $\pm$ SD, n = 12)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

1. ผลของสารสกัดจากรำข้าว 5 สายพันธุ์ ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2)

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ โดยใช้สารสกัดจากรำข้าวที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ด้วยวิธี MTT ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากรำข้าวสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ โดยสารสกัดจากรำข้าวที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งดีที่สุดที่สุด คือ สารสกัดจากรำข้าวหอมนิล เหนียวดำ หอมดอกมะลิ 105 หอมแดง และเหนียว กข 6 พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์ เท่ากับ 64.37 ± 2.86 , 61.25 ± 3.61 , 55.34 ± 3.06 , 49.81 ± 2.88 และ 43.38 ± 5.34 ตามลำดับ (ตาราง 10) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่ข้าวหอมแดงและเหนียว กข 6 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตาราง 10)

ตาราง 10 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากรำข้าว 5 สายพันธุ์ต่อยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้
(Means $\pm$ SD, n=5)

สายพันธุ์ข้าว	อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (เปอร์เซ็นต์)
เหนียวดำ	61.25 $\pm$ 3.61 ^a
หอมแดง	49.81 $\pm$ 2.88 ^{ab}
หอมนิล	64.37 $\pm$ 2.86 ^a
หอมดอกมะลิ 105	55.34 $\pm$ 3.06 ^a
เหนียว กข 6	43.38 $\pm$ 5.34 ^b

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

มะเร็งลำไส้เป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตของมนุษย์ทั้งเพศชายและเพศหญิง สาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดมะเร็งชนิดนี้ คือ การบริโภคอาหารและสิ่งแวดล้อมทั่วไป (American Cancer Society, 2008; Anand et al., 2008) โดยพบว่ามีจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นทุกปี แต่ในขณะที่การรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันนี้ค่อนข้างจะมีค่าใช้จ่ายมาก ดังนั้นการค้นหายาหรือออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติ ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคมะเร็งที่จะมีราคาถูกและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เป็นจำนวนมาก โดยปกติแล้วในรำข้าวจะอุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ อาทิเช่น tocotrienols ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยของวิตามิน อี ซึ่งพบมากในรำข้าวและรำข้าวสาลี (Sookwong et al., 2007)

จากรายงานพบว่า tocotrienols มีความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด ได้แก่ เต้านม ต่อมลูกหมาก กระเพาะ ดับ และลำไส้ (Agarwal et al., 2004; Sakai et al., 2006; Srivastava and Gupta, 2006; Sun et al., 2009; Xu et al., 2009) กลไกในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งต่างชนิดกันจะเกี่ยวข้องกับวิถีอะพอพโทซิส (apoptotic pathways) ยังรวมไปถึงการควบคุมการแสดงออกของ p53 (Shah and Sylvester, 2004; Agarwal et al., 2004; Ahn et al., 2007) และจากการศึกษาของ Bi et al. (2010) ที่พบว่าภาวะเลือดมีออกซิเจนน้อยเป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับมะเร็งชนิดเป็นก้อน (solid tumors) และส่งผลให้เซลล์มะเร็งมีอัตราการเจริญเร็ว โดยพบว่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์มาจากโปรตีนชนิดหนึ่งที่เรียกว่า HIF-1 α ซึ่งเป็นยีนที่เป็นตัวกระตุ้นการสร้างเส้นเลือดใหม่ ยีนชนิดนี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีภาวะ

เลือดขาดออกซิเจน และโปรตีน vascular endothelial growth factor (VEGF) ซึ่งมีหน้าที่เป็นสารกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดดำใหม่ โดยโปรตีนทั้งสองชนิดจึงมีบทบาทสำคัญในควบคุมการสร้างเส้นเลือดฝอยใหม่เพื่อนำไปเลี้ยงก้อนมะเร็งและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นจึงมีการศึกษาการยับยั้งการหลั่ง โปรตีน HIF-1 α ในสภาวะที่จำลองการขาดออกซิเจนในเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร SGC-7901 ซึ่งพบว่าการสะสมของโปรตีน HIF-1 α มากขึ้น และตามด้วยการหลั่งของ VEGF โดยพบว่าในเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณ 150 ไมโครโมลต่อลิตร เมื่อทดสอบโดยการเติมสาร γ - tocotrienol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่มีความเข้มข้น 60 ไมโครโมลต่อลิตร ผลปรากฏว่าสามารถยับยั้งการแสดงออกของ HIF-1 α ลงอย่างชัดเจน และยังสามารถลดการหลั่งของ VEGF อีกด้วย ซึ่งสารชนิดนี้มีคุณสมบัติที่จะนำไปใช้เป็นยาในการรักษาโรคมะเร็งต่อไป

รำข้าวมีสารประกอบฟีนอล ซึ่งสารชนิดนี้จะมีมากในส่วนองเมล็ดพืช โดยผู้ที่บริโภคเมล็ดพืชเป็นประจำ พบว่ามีอัตราการเสี่ยงต่อการเป็นเนื้องอกในระบบทางเดินอาหารลดลง รวมไปถึงเนื้องอกในกระเพาะอาหาร ลำไส้ และถุงน้ำดี (Chatenoud et al., 1998) สารฟีนอลที่พบในเมล็ดพืชจึงจัดเป็นสารที่มีประโยชน์ โดยสารฟีนอลมีคุณสมบัติเป็นสารมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งได้หลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งมะเร็งลำไส้ (Glade, 1999) สารประกอบฟีนอล cycloartenyl ferulate (CF) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ SW480 ซึ่ง CF เป็นสารประกอบที่สำคัญของ gamma-oryzanol จากการศึกษาของ Kong et al. (2009) พบว่าสารประกอบฟีนอลและ CF สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW480) แต่จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (CCD-18-Co) และยังพบว่า CF จะกระตุ้นให้มะเร็งระยะแพร่กระจายและเซลล์มะเร็งลำไส้ SW620 ให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส

รำข้าวยังมีองค์ประกอบของกรดไฟติก (phytic acid) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอีกชนิดหนึ่งที่สำคัญเกี่ยวกับการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง กรดไฟติกเป็นคาร์โบไฮเดรตที่เป็นวงแหวน 6 วง โดยมีหมู่ phosphate groups ติดอยู่กับคาร์บอนแต่ละตัว (สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีโมเลกุลเป็นน้ำตาล) โดยจะพบว่ามีในเมล็ดธัญพืชจะประกอบด้วยกรดไฟติก 1 – 5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักทั้งหมดในเมล็ด ซึ่งจะพบสารชนิดนี้ในน้ำมันพืชตระกูลถั่วและเมล็ดข้าว ในรำข้าวจะพบกรดไฟติก 9.5 – 14.5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักทั้งหมดในรำข้าว กรดไฟติกจึงเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ในการต้านอนุมูลอิสระและการต้านมะเร็ง (Jariwalla, 2001) จากผลการศึกษาของ Norazalinaa et al. (2010) ที่ทำการทดสอบการยับยั้งมะเร็งลำไส้ในหนู โดยหนูจะได้รับสาร azoxymethane (AOM) เป็นสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งที่ลำไส้ โดยทำการฉีดสารชนิดนี้ให้กับหนูผ่านทางช่องท้อง จากนั้นทำการทดสอบโดยใช้สารสกัดกรดไฟติกที่ได้จากการสกัดจากรำข้าวและสารที่ได้จากการสังเคราะห์ เพื่อทำการยับยั้งการเกิดมะเร็งลำไส้ โดยทำการผสม

กรดไฟติกในน้ำดื่มให้หนูกินที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นจะนำส่วนของลำไส้หนูมาทำการวิเคราะห์หาการเกิดรอยโรคของมะเร็งลำไส้ (aberrant crypt foci, ACF) พบว่าที่ความเข้มข้นที่ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ของสารสกัดกรดไฟติกที่ได้จากรำข้าว มีผลทำให้ระยะเริ่มต้นของการเกิด ACF ลดลงมากที่สุด และพบว่ากรดไฟติกที่ใช้ในเชิงพาณิชย์ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการลดการเกิด ACF ได้ถึง 71 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรดไฟติกที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นที่ 0.2 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการลดการเกิด ACF ได้ 61 เปอร์เซ็นต์ จึงสรุปได้ว่ากรดไฟติกที่ได้จากรำข้าวมีศักยภาพในการลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ได้ดีที่สุด

การศึกษาของ Forster et al. (2013) พบว่าในข้าวแต่ละสายพันธุ์จะมีองค์ประกอบที่แตกต่างกันออกไปตามสายพันธุ์ โดยศึกษาข้าวสีน้ำตาล 4 สายพันธุ์ Wells (PI 612439), Cypress (PI 561734) และ Jasmine 85 (PI 595927) เป็นข้าวที่นิยมปลูกในประเทศสหรัฐอเมริกา และ Shufeng 121 ที่นิยมปลูกในประเทศจีน และข้าวสีแดง 2 สายพันธุ์ คือ Red Wells เป็นข้าวที่กลายพันธุ์มาจาก Wells และ IL 121-1-1 เป็นข้าวที่อยู่ในเขตร้อนในประเทศมาเลเซีย ในรำข้าวสีแดงจะพบสาร proanthocyanidins ที่ถูกควบคุมด้วยยีน Rc โครโมโซมคู่ที่ 7 (Sweeney et al., 2006) และข้าวสีม่วงอีกหนึ่งสายพันธุ์ คือ IAC 600 ปลูกกันมาในประเทศบราซิล ในข้าวสีม่วงจะพบสาร anthocyanins (Min and Chen, 2011) โดยนำรำข้าวทั้งหมด 7 สายพันธุ์มาทำการสกัดเอาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29, Caco-2 และ SW-480) โดยพบว่าสารสกัดจากรำข้าวสกัดมีความสามารถในการลดการเจริญของเซลล์ Caco-2 ได้ดีที่สุด ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยรำข้าวสายพันธุ์ Jasmine 85 มีค่าอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ต่ำที่สุด อยู่ที่ 1.62 เปอร์เซ็นต์ และตามด้วยสายพันธุ์ IL 121-1-1 10.82 เปอร์เซ็นต์ Red Wells 11.86 เปอร์เซ็นต์ Cypress 40.92 เปอร์เซ็นต์ และ IAC 600 44.3 14.03 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสายพันธุ์ Wells และ Shu 121 ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ Caco-2

2.ประสิทธิภาพของสารสกัดจากรำข้าวหมักและไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรีย *โพรไบโอติก B. subtilis* MP9 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco – 2)

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ จากสารสกัดจากรำข้าวหมักและไม่ได้หมัก ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากรำข้าวหมักและไม่ได้หมัก 5 สายพันธุ์ คือ ข้าวเหนียวดำ หอมแดง หอมนิล หอมดอกมะลิ 105 และเหนียว กข 6 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ มีอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ 46.76 ± 5.14 : 61.41 ± 2.4 , 32.26 ± 3.34 : 36.31 ± 3.87 , 33.05 ± 3.27 : 41.85 ± 4.84 และ 44.97 ± 4.54 : 46.68 ± 1.08 ตามลำดับ (ตาราง 11) โดยสารสกัดจากรำข้าว 4 สายพันธุ์ คือ ข้าวหอมแดง หอมนิล หอมดอกมะลิ 105 และเหนียว กข 6 ที่หมักและไม่ได้หมัก มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้โดยไม่มี ความแตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่สารสกัดจากรำข้าวเหนียวดำที่หมักมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ ต่ำกว่ารำข้าวที่ไม่ได้หมักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตาราง 11 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากรำข้าวหมักและไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* MP9 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2) (Means $\pm$ SD, n = 5)

สายพันธุ์ข้าว	อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (เปอร์เซ็นต์)	
	หมัก	ไม่ได้หมัก
เหนียวดำ	46.77 ± 5.14^a	61.41 ± 2.40^b
หอมแดง	32.36 ± 3.34^a	36.31 ± 3.87^a
หอมนิล	33.05 ± 3.27^a	41.85 ± 4.84^a
หอมดอกมะลิ 105	44.97 ± 4.54^a	56.20 ± 5.57^a
เหนียว กข 6	40.24 ± 2.35^a	46.68 ± 1.08^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละแถวแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งนั้น อาจเกิดจากชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ในการหมัก จากรายงานการหมักรำข้าวด้วย *B. amyloliquefaciens* พบว่ารำข้าวที่หมักมีระดับของโปรตีนและแร่ธาตุเพิ่มขึ้น แต่จะส่งผลให้กรดไขมันลดลง (Wizna et al., 2012) จาก

รายงานการวิจัยเกี่ยวกับการใช้แบคทีเรียหมักรำข้าวที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง คือ เชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus oryzae* เนื่องจากเชื้อราชนิดนี้ี้จะมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ชนิดใหม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการย่อยสลายสารชีวโมเลกุล และยังสามารถในการย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาล กระบวนการย่อยสลายโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนและเปปไทด์ โดยพบว่าเมื่อนำเอาข้าวกล้องและรำข้าวมาหมักด้วย เชื้อรา *A. oryzae* เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูป เนื่องจากรำข้าวหมักด้วย *A. oryzae* มีประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งได้หลายชนิด เช่น มะเร็งลำไส้ มะเร็งตับ มะเร็งกระเพาะอาหาร และกระเพาะปัสสาวะ นอกจากนี้ยังพบว่ารำข้าวหมักมีประสิทธิภาพในการต้านทานอนุมูลอิสระ โดยรำข้าวหมักจะไปยับยั้งการก่อตัวของสาร azoxymethane (AOM) ที่เหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งที่ลำไส้ ทำให้รอยโรคของมะเร็งลำไส้ (ACF) ที่เป็นสาเหตุของโรคมะเร็งลดลง 81 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารก่อมะเร็งเพียงอย่างเดียว (Katayama et al., 1999; Katayama et al., 2002; Kuno et al., 2004; Kuno et al., 2006) รำข้าวที่หมักด้วยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. subtilis* MP9 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลดลง เนื่องจากเมื่อผ่านการหมักไปแล้วส่งผลให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางชนิดลดลง แต่ก็ยังคงมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้เช่นเดียวกัน อาจจะเป็นกลุ่มของสารประกอบฟีนอลที่ลดลง สืบเนื่องจากผลการทดสอบหาสารประกอบฟีนอลรวมของรำข้าวที่หมักมีปริมาณฟีนอลรวมลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้หมัก ซึ่งสารประกอบฟีนอลนี้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของมะเร็งลำไส้ (Glade, 1999)

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ

1. ผลของสารสกัดจากรำข้าว 5 สายพันธุ์ ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2)

ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ พบว่าสารสกัดที่ได้จากรำข้าว คือ 5 สายพันธุ์ คือ ข้าวเหนียวดำ หอมแดง หอมนิล หอมดอกมะลิ 105 และเหนียว กข 6 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ โดยมีอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ 36.77 ± 1.26 , 38.51 ± 5.09 , 23.42 ± 1.48 , 17.32 ± 3.13 และ 15.13 ± 2.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยพบว่าข้าวเหนียวดำและหอมแดง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับดีกว่าข้าวเหนียว กข 6 หอมดอกมะลิ 105 และหอมนิล ซึ่งแตกต่างกันอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่สารสกัดจากรำข้าวเหนียว กข 6 หอมดอกมะลิ 105 และ หอมนิล อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตาราง 12)

ตาราง 12 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากรำข้าว 5 สายพันธุ์ ต่อยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (Means $\pm$ SD, n = 5)

สายพันธุ์ข้าว	อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (เปอร์เซ็นต์)
เหนียวดำ	36.77 $\pm$ 1.26 ^a
หอมแดง	38.51 $\pm$ 5.09 ^a
หอมนิล	15.13 $\pm$ 2.28 ^b
หอมดอกมะลิ 105	17.32 $\pm$ 3.13 ^b
ข้าวเหนียว กข 6	23.42 $\pm$ 1.48 ^b

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

พืชที่มีอยู่ตามธรรมชาติและส่วนประกอบต่างๆ ในพืช จะทำหน้าที่ในการต่อต้านการเกิดเนื้องอก (anti-tumorigenicity) (Hemaiswarya, 2006) ดังนั้นจึงพบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะถูกนำไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบอาหารเป็นยา (nutraceutical) โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้จะประกอบไปด้วย aromatic alcohols เช่น สารประกอบ polyphenols และ acidic (phenolic acids) ซึ่งมีฤทธิ์ในการรักษาโรคเกี่ยวกับหัวใจ หลอดเลือด และมะเร็ง (Kris-Etherton et al., 2002) นอกจากนี้ยังพบว่ารำข้าวมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสำคัญ อาทิเช่น tocotrienols, tocopherols, oryzanol, minerals, lipid, protein, vitamins และ phytic acid (Rohrer and Siebenmorgen, 2004)

รำข้าวที่มีเมล็ดสีจะมีองค์ประกอบของสารแอนโทไซยานิน โดยพบว่าสาร cyaniding และ malvidin ที่แยกได้จากรำข้าวที่มีเมล็ดสีที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Ichikawa, 2001) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Nam et al. (2005) ที่พบว่าเมล็ดข้าวที่นำมาทดสอบที่มีสีแตกต่างกัน คือ สีม่วงและสีน้ำตาล โดยพบว่ารำข้าวสายพันธุ์ Chuchung ที่มีสีน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (lymphoblastoid B95-8) 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับรำข้าวสายพันธุ์ Suwon 415 ที่มีสีม่วง ที่

ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 60 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ารำข้าวสีม่วงที่มีความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่ารำข้าวที่มีสีน้ำตาล

สาร feruloyl-myoinositols ที่พบในรำข้าว มีผลต่อการยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ superoxide anions ของเซลล์ HL-60 ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคมะเร็ง (Hosoda et al., 2000) สารประกอบกรดไฟติกเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณค่าที่ดี โดยพบว่ากรดไฟติกมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งรังไข่ เต้านม และตับ แต่จะไม่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ปกติ (Norhaizan et al., 2011)

2. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากรำข้าวหมักและไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* MP9 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2)

ผลของสารสกัดจากรำข้าว 5 สายพันธุ์ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ พบว่าสารสกัดจากรำข้าวหมักและไม่ได้หมักของข้าวเหนียวดำ หอมแดง หอมนิล หอมดอกมะลิ 105 และเหนียว กข 6 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ 33.43 ± 11.06 : 51.93 ± 5.58 , 42.63 ± 14.51 : 51.34 ± 10.22 , 50.09 ± 9.29 : 45.42 ± 9.16 , 27.12 ± 9.16 : 66.57 ± 8.44 และ 48.45 ± 11.89 : 50.09 ± 9.61 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยพบสารสกัดจากรำข้าวเหนียวดำ หอมแดง หอมดอกมะลิ 105 และเหนียว กข 6 ที่หมักมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับรำข้าวที่ไม่ได้หมักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่สารสกัดจากรำข้าวหอมนิลหมักมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับไม่แตกต่างกันกับกลุ่มที่ไม่ได้หมัก (ตาราง 13)

ตาราง 13 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากรำข้าวหมักและไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* MP9 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์ตับ (HepG2) (Means $\pm$ SD, n = 5)

สายพันธุ์ข้าว	อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (เปอร์เซ็นต์)	
	หมัก	ไม่ได้หมัก
เหนียวดำ	33.43 $\pm$ 11.06 ^a	51.93 $\pm$ 5.58 ^b
หอมแดง	42.63 $\pm$ 14.51 ^a	51.34 $\pm$ 10.22 ^b
หอมนิล	50.09 $\pm$ 9.29 ^a	45.42 $\pm$ 9.29 ^a
หอมดอกมะลิ 105	27.12 $\pm$ 9.16 ^a	66.57 $\pm$ 17.10 ^b
เหนียว กข 6	48.45 $\pm$ 11.89 ^a	50.09 $\pm$ 9.61 ^b

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละแถวแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

B. subtilis MP9 ที่นำมาหมักรำข้าวมีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับลดลง รำข้าวที่หมักอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางชนิดลดลง อย่างไรก็ตามรำข้าวหมักยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับได้ จากรายงานการวิจัยพบว่าแบคทีเรียในกลุ่มของยีสต์ และเชื้อราถูกนำมาใช้ในการหมักรำข้าวมากที่สุด จากการศึกษาของ Katayama et al. (2003) ได้ทำการศึกษาข้าวกล้องที่หมักด้วย *A. oryzae* ต่อการยับยั้งการเกิดมะเร็งตับชนิด Hepatocellular carcinoma (HCC) ในหนู โดยทำการผสมข้าวกล้องหมักในอาหาร 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าหนูที่ได้รับอาหารผสมข้าวกล้องหมักสามารถลดอุบัติการณ์ของการเกิดโรคมะเร็งตับชนิด HCC ลงถึง 43 เปอร์เซ็นต์ จึงสรุปได้ว่าข้าวกล้องหมักด้วย *A. oryzae* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคมะเร็งตับในหนูได้

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

ผลผลิตของสารสกัดจากรำข้าว รำข้าวหมัก และรำข้าวไม่ได้หมัก

ผลผลิตของสารสกัดหยาบที่ได้จากรำข้าว รำข้าวหมัก และรำข้าวไม่ได้หมักจากรำข้าว 5 สายพันธุ์ คือ ข้าวเหนียวดำ หอมแดง หอมนิล หอมดอกมะลิ 105 และเหนียว กข 6 พบว่าผลผลิตของสารสกัดที่ได้จากรำข้าวหอมนิลมีปริมาณมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ ข้าวเหนียวดำ หอมแดง หอมดอกมะลิ 105 และเหนียว กข 6 ตามลำดับ

การเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก

แบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* MP9 มีจำนวนเพิ่มขึ้นหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก โดยพบว่าการเจริญของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจากจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นที่ประมาณ $4.29 \log \text{ cfu/ml}$ เพิ่มขึ้นเป็น $7.54 \log \text{ cfu/ml}$ หลังจากการหมักรำข้าวแล้ว

การเปลี่ยนแปลงของสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกระบวนการหมักรำข้าว

สารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรำข้าวหมักและไม่ได้หมัก พบว่ามีปริมาณและชนิดของสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไป โดยพบว่ารำข้าวที่หมักมีปริมาณของสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับรำข้าวที่ไม่ได้หมัก

ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ

1.ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากรำข้าว 5 สายพันธุ์ ที่สกัดด้วยเมทานอล พบว่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของรำข้าวแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยข้าวเหนียวดำมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมา คือ ข้าวหอมแดง หอมนิล หอมดอกมะลิ 105 และข้าวเหนียว กข 6 ตามลำดับ

2. ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากรำข้าวหมักและไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* MP9 พบว่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของรำข้าวหมัก 3 สายพันธุ์ คือ ข้าวหอมแดง หอมดอกมะลิ 105 และ เหนียว กข 6 จะมีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระดีกว่ารำข้าวไม่ได้หมัก ในขณะที่รำข้าวเหนียวดำและหอมนิลที่หมักมีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่ารำข้าวไม่ได้หมักมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

3. ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดจากรำข้าว 5 สายพันธุ์ ที่สกัดด้วยเมทานอล พบว่าปริมาณฟีนอลรวมทั้งหมดของรำข้าวแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยข้าวเหนียวดำมีปริมาณฟีนอลรวมสูงที่สุด รองลงมา คือ ข้าวหอมแดง หอมนิล หอมดอกมะลิ 105 และเหนียว กข 6 โดยข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวเหนียว กข 6 มีปริมาณสารฟีนอลรวมไม่แตกต่างกัน

4. ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดจากรำข้าวที่ผ่านการหมักและไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* MP9 พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของรำข้าวเหนียวดำ หอมแดง และหอมดอกมะลิ 105 ที่หมักมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับรำข้าวที่ไม่ได้หมัก ในขณะที่รำข้าวหอมนิลหมักมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้หมัก แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

1. ผลของสารสกัดจากรำข้าวต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2) พบว่าสารสกัดจากรำข้าว 5 สายพันธุ์ มีอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ประมาณ 43.38 – 64.37 เปอร์เซ็นต์ โดยสารสกัดจากรำข้าวข้าวเหนียวดำ หอมนิล และหอมดอกมะลิ 105 มีอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้มากกว่าสารสกัดจากรำข้าวเหนียว กข 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

2. ผลของรำข้าวหมักต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2) พบว่าสารสกัดจากรำข้าวหมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* MP9 มีอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ประมาณ 32.36 – 46.77 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับรำข้าวไม่ได้หมักที่มีอัตราการยับยั้งประมาณ 36.31 – 46.77 เปอร์เซ็นต์ โดยสารสกัดจากรำข้าวเหนียวดำ

หมักมีอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้มากกว่ารำข้าวไม่ได้หมัก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

3. ผลของสารสกัดจากรำข้าวต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) พบว่าสารสกัดจากรำข้าว 5 สายพันธุ์ มีอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับประมาณ 15.13 – 38.51 เปอร์เซ็นต์ โดยสารสกัดจากรำข้าวเหนียวดำและหอมแดงมีอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับมากกว่าสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล หอมดอกมะลิ และเหนียว กข 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4. ผลของรำข้าวหมักต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) พบว่าสารสกัดจากรำข้าวหมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* MP9 มีอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับประมาณ 27.12 – 50.09 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับรำข้าวไม่ได้หมักที่มีอัตราการยับยั้งประมาณ 45.42 – 66.57 เปอร์เซ็นต์ โดยพบสารสกัดจากรำข้าวเหนียวดำ หอมแดง หอมดอกมะลิ 105 และเหนียว กข 6 ที่หมักมีอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับน้อยกว่ารำข้าวที่ไม่ได้หมัก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่รำข้าวหอมนิลหมักมีอัตราการยับยั้งมากกว่ารำข้าวที่ไม่ได้หมัก แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรจะนำสารสกัดจากรำข้าวและรำข้าวหมัก ไปเสริมในผลิตภัณฑ์อาหารเสริม อาทิเช่น เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพและอาหารเสริมในรูปแบบแคปซูล ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง ทั้งนี้เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดแก่ผู้บริโภคในด้านการต้านอนุมูลอิสระและการป้องกันและบำบัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้และมะเร็งตับ

2. ควรจะบริโภครำข้าวหมัก เนื่องจากรำข้าวหมักพบว่ามีปริมาณสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอาจมาจากรำข้าวและตัวของแบคทีเรียด้วย ดังนั้นรำข้าวหมักจึงเหมาะสำหรับการนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริม

บรรณานุกรม

- กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.2557. ลักษณะของข้าว. [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา <http://www.brrd.in.th/rkb/varieties/index.php-file=content.php&id=11.htm> (4 เมษายน 2557).
- กมลดารา เจริญสุวรรณ. 2549. การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำมันถั่วเหลืองหมักด้วยเชื้อโปรไบโอติกแบบที่เรียกรดแลกติก. เชียงใหม่: ปัญหาพิเศษ ปริญญาตรี มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 45 น.
- กัลยา อริย์. 2556. การเก็บกินซากเซลล์ที่ตายจากอะพอพโทซิสของฟาโกไซต์. **Thammasat Medical Journal** 13(1): 89 – 98.
- ข้าวหอมไทย ข้าวหอมที่ดีที่สุดในโลก. 2552. **เกษตรกรรมธรรมชาติ**. 7: น 31-33.
- ชาญ มงคล. 2536. ข้าว. ภาคพัฒนาตำราและเอกสารวิชาการ หน่วยศึกษานิเทศก์ กรมการฝึกหัดครู, กรุงเทพฯ ฯ: 149 น.
- พรณี เคนรุ่งเรือง. 2550. ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเปลือกต้นวงศ์อบเชย.น. 19 – 26. ใน **รายงานผลงานวิจัย สำนักงานวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้**.กรุงเทพฯ: สำนักงานวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้.
- บุญหงส์ จงคิด.2547.ข้าวและเทคโนโลยี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ .110 น.
- มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. 2550. **เกษตรกรรมธรรมชาติ**.9: 12-13.
- โรงพยาบาลกรุงเทพ. 2555. การรักษาโรคมะเร็ง. [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา <http://www.bangkokhospital.com/treatment/Colorectal-Cancer-Treatment-th/index.php?p=conditionstreatments> (22 กรกฎาคม 2556).
- ไวยุจน์ เดชมหิตกุล, จันทรจิรา อยู่คง, กนกวรรณ พุ่มพุทรา, แสงชัย เอกประทุมชัย และเพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง. 2550. การศึกษาสูตรอาหารและกระบวนการผลิตสปอร์ *Bacillus subtilis* เพื่อเป็นโปรไบโอติกในสัตว์. **วารสารวิจัยและพัฒนา มจร** 30(2): 251-259.
- วรวิทย์ เจริญศิริ. 2555. มะเร็งตับ (liver cancer). [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา <http://www.bangkokhealth.com/index.php/health/health-system/gastro/1706-มะเร็งตับ-liver-cancer.html> (27 กรกฎาคม 2556).
- สิริฤกษ์ ทรงศิวิไล. 2537. วิทยานิพนธ์ของเนืองอก. ในอิมมูโนวิทยา พิมพ์ครั้งที่ 4. บริษัท เค.พี.พรินติ้ง จำกัด กรุงเทพฯ: 350 น.

- สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. 2555. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับโรคมะเร็ง. [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา <http://www.nci.go.th/th/knowledge/whatis.html>. (18 สิงหาคม 2555).
- ภัทรวินท์ อัดตะสาระ และ รังสิยา บัวส้ม. 2554. รายงานทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล (Hospital-Based Cancer Registry). **สถาบันมะเร็งแห่งชาติ**. 26: 4- 53.
- โอภา วัชรกุลปต์. 2549. **สารต้านอนุมูลอิสระ**. กรุงเทพฯ: พีเอสพริ้นท์. 220 น.
- Adam, A., Crespy, V., Levrat-Verny, MA., Leenhardt, F., Leuillet, M., Demigne, C and Remesy, C. 2002. The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. **Journal of Nutrition** 132(7): 1962-1968.
- Adeolu, A.A., Margaret, O.S and Anthony, J.A. 2009. Anti-inflammatory and analgesic activities of the aqueous extracts of *Margaritaria discoidea* (Euphorbiaceae) stem bark in experimental animal models. **Revista de Biología Tropical** 57(4):1193 - 1200.
- Agarwal, M.K., Agarwal, M.L., Athar, M and Gupta, S. 2004. Tocotrienol-rich fraction of palm oil activates p53, modulates Bax/Bcl2 ratio and induces apoptosis independent of cell cycle association. **Cell Cycle** 3(2): 205–211.
- Ahn, K.S., Sethi, G., Krishnan, K., Aggarwal, B.B. 2007. Gamma-tocotrienol inhibits nuclear factor-kappaB signaling pathway through inhibition of receptor-interacting protein and TAK1 leading to suppression of antiapoptotic gene products and potentiation of apoptosis. **Journal of Biological Chemistry** 282(1):809–820.
- American Cancer Society. 2008. Cancer Facts and Figures. [Online] Available <http://www.cancer.org/downloads/STT/2008CAFFfinalsecured.pdf> (1 March 2014)
- American Cancer Society. 2005. Colorectal Cancer Facts and Figures Special Edition. **Journal of the National Cancer Institute** 88(1): 1717–1730.
- American Cancer Society. 2012. Liver Cancer Overview. **National organizations** 10 :1 – 30
- Anand, P., Kunnumakkara, A., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, ST., Lai OS., Sung B and Aggarwal BB. 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical Research** 25(9): 2097-2116.
- Ausman, L.M., Rong, N and Nicolosi R.J. 2005. Hypocholesterolemic effect of physically refined rice bran oil: studies of cholesterol metabolism and early atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. **Journal of Nutritional Biochemistry** 16(9): 521-529.

- Banthorpe, B.V. 1994. Secondary metabolism in plant tissue culture: scope and limitations. **Natural Product Reports** 3(1): 303- 328.
- Bernhoft, A. 2010. **Bioactive compounds in plants – benefits and risks for man and animals**. Novus Forlag. The Norwegian Academy of Science and Letters. 255 p.
- Bi, S.1., Liu, J.R., Li, Y., Wang, Q., Liu, H.K., Yan, Y.G., Chen, B.Q and Sun, W.G. S. 2010. γ - Tocotrienol modulates the paracrine secretion of VEGF induced by cobalt(II) chloride via ERK signaling pathway in gastric adenocarcinoma SGC-7901 cell line. **Toxicology** 274(1-3): 27-33.7
- Braca, A., Sortino, C., Politi M., Morelli, I and Mendez, J. 2002. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. **Journal of Ethnopharmacol** 79(1): 379-381.
- Buitelaar, R.M., Tramper, J. 1992. Strategies to improve the production of secondary metabolites with plant cell cultures: a literature review. **Journal of Biotechnology** 23(2): 111-141.
- Calton, B.A., Lacey, J.V., Schatzkin, A. 2006. Physical activity and the risk of colon cancer among women: A prospective cohort study (United States). **International Journal of Cancer** 119(1): 385–391.
- Chatenoud, L., Tavani ., Vecchia, C.L., Jacobs, D.R., Neger, E and Levi, F.1998. Whole grain food intake and cancer risk. **International Journal of Cancer** 77: 24–28.
- Choi, Y, Jeong, H.S and Lee J. 2007. Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. **Food Chemistry** 103(1): 130-138.
- Degering, C., Eggert, T., Puls, M., Bongaerts, J., Evers, S., Maurer, K.H and Jaeger, K.E. 2010. Optimization of Protease Secretion in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by Screening of Homologous and Heterologous Signal Peptides. **Applied and Environmental Microbiology** 76(19): 6370 - 6376.
- Ernest, L. Wynder, M.D and Takao Shigematsu, M.D. 1967. Environmental factors of cancer of the colon and rectum. **Cancer** 20(1): 1520 – 1561.
- Ferlay, J and Bray, F. 2004. Cancer incidence and mortality in Europe. **Annals of Oncology** 3(2): 481– 488.
- Finocchiaro, F., Ferrari, B and Gianinetti, A. 2010. A Study of biodiversity of flavonoid content in the rice caryopsis evidencing simultaneous accumulation of anthocyanins and proanthocyanidins in a black-grained genotype. **Journal of Cereal Science** 51(1): 28–34.

- Forstera, G.M., Rainab K., Kumara, A., Kumarb, S., Agarwalb,K., Chend, M.H., Bauere, C.J., McClungd, A.M and Ryana, EP. 2013. Rice varietal differences in bioactive bran components for inhibition of colorectal cancer cell growth. **Food Chemistry** 141(2): 1545 - 1552.
- Ghribi, D., Abdelkefi-Mesrati, L., Mnif, I., Kammoun, R., Ayadi, I., Saadaoui, I., Maktouf, S and Chaabouni-Ellouze, S. 2012. Investigation of Antimicrobial Activity and Statistical Optimization of *Bacillus subtilis* SPB1 Biosurfactant Production in Solid-State Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology** : 373682.
- Giovannucci, E and Martinez, M.E. 1996. Tobacco, colorectal cancer, and adenomas:a review of the Giovannucci,E., Rimm, E.B and Stampfer, M.J., 1994. A prospective study of cigarette smoking and risk of colorectal adenoma and colorectal cancer in US men. **Journal of the National Cancer Institute.** 86(1): 183 - 191.
- Glade, M.J. 1997. Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund., American Institute for Cancer Research. **Nutrition** 15(1): 523–526
- Goufo, P and Trindade, H. 2014. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, γ -oryzanol, and phytic acid. **Food Science & Nutrition** (2):75-104.
- Graf, E., Empson, K.L and Eaton, J.W. 1987. Phytic acid A natural antioxidant. **Journal of Biological Chemistry** 262 (24):11647-11650 .
- Heavey, P.M., McKenna, D and Rowland, I.R. 2004. Colorectal Cancer and the Relationship Between Genes and the Environment. **Nutrition and Cancer.** (2): 124-141.
- Hemaiswarya, S and Doble, M. 2006. Potential synergism of natural products in the treatment of cancer. **Phytotherapy Research** 20(4): 239-249.
- Henry, G., Deleu, M., Jourdan, E., Thonart, P and Ongena, M. 2011. The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related defence responses. **Cellular Microbiology.** 11: 1824–1837.
- Hong, B.QI., Chen J., Jia H.E., Hua, X.U and Xiong, Y.Y. 2008. Supernatant Antioxidative activities of fermented rice bran extract by *Bacillus* Natto. **Food science** 29 (3): 293-297.

- Hong, B.Q., Chen, S.L and Chen, J. 2009. Determination on Degradation Condition of Phytic Acid in Rice Bran Fermented by *Bacillus Natto*. **Journal of Anhui Agricultural Sciences** 31(1): 15112-15114.
- Hosoda, A., Nomura, E., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H., Mizuno, K and Taniguchi, T. 2002. Synthesis of feruloylmyo-inositols and their inhibitory effects on superoxide anion generation. *bioorg.* **ACS Medicinal Chemistry Letters** 10(1): 1439-1442.
- Hosoi, T and Kiuchi K. 2004. Production and Probiotic Effects of Natto. **Bacterial Spore Formers: Probiotics and Emerging Applications**. **Horizon Bioscience** (1):143–154.
- Huang, D. J., Ou, B. X and Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53(6):1841–1856.
- Hudson, E.A., Dinh, P.A., Kokubun, T., Simmonds, M.S and Gescher, A. 2000. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** (11): 1163-1170.
- Ichikawa, H., Ichiyanaagi, T., Xu, B.; Yoshii, Y., Nakajima, M and Konishi, T. 2001. Antioxidant activity of anthocyanin extract from purple black rice. **Journal of Medicinal Food** (4):211-218.
- Imsanguan, P., Roaysubtawee, A., Borirak, R., Pongamphai, S., Douglas, S and Douglas, P.L. 2008. Extraction of alpha-tocopherol and gamma-oryzanol from rice bran. **Lwt-Food Science and Technology** (8): 1417-1424.
- Jariwalla R.J. 2001. Rice-bran products: phytonutrients with potential applications in preventive and clinical medicine. **Drugs under Experimental and Clinical Research** 27(1):17–26.
- Juliano, B.O. 1985. Rice bran. In: Rice: Chemistry and Technology. **American Association of Cereal Chemists** 8(6): 16–73.
- Jun H.I., Song, G.S., Yang, E.I., Youn Y and Kim, Y.S. 2012. Antioxidant Activities and Phenolic Compounds of Pigmented Rice Bran Extracts. **Journal of Food Science** 77(7):C759-764.

- Kahlon, T. S. 2009. Rice Bran: Production, Composition, Functionality and Food applications, physiological benefits. In: Eds. Cho, S.S. and Samuel, P. Fiber Ingredients Food applications and health benefits. CRC Press. **Taylor and Francis Group**. 305-321.
- Katayama, M., Sugie S., Yoshimi, N., Yamada, Y., Sakata, K., Qiao Z., Iwasaki, T., Kobayashi, H and Mori, H. 2003. Preventive effect of fermented brown rice and rice bran on diethylnitrosoamine and phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. **Oncology Reports** 10(4):875-880.
- Katayama, M., Yoshimi, N and Yamada, Y. 2002. Preventive effect of fermented brown rice and rice bran against colon carcinogenesis in male F344 rats. **Oncology Reports** 9(4): 817-822.
- Kayahara, H., Tsukahara, K and Tatai, T. 2000. Flavor, health and nutritional quality of pre - germinated brown rice. **Food Flavors and Chemistr** 3: 546–555.
- Kook, M.C., Seo, M.J., Cheigh, C.I., Pyun, Y.R., Cho, S.C and Park, H. 2010. Enhanced production of gamma-aminobutyric acid using rice bran extracts by *Lactobacillus sakei* B2-16. **Journal of Microbiology and Biotechnology** (4): 763 – 766.
- Kong, C.K., Lam, W.S., Chiu, L.C., Ooi, V.E., Sun, S.S and Wong, Y.S. 2009. A rice bran polyphenol, cycloartenyl ferulate, elicits apoptosis in human colorectal adenocarcinoma SW480 and sensitizes metastatic SW620 cells to TRAIL-induced apoptosis. **Biochemical Pharmacology** 77(1): 1487–1496.
- Knekt, P., Hakama, M., Jarvinen, R., Pukkala, E and Heliovaara, M. 1998 Smoking and risk of colorectal cancer. **British Journal of Cancer** (1): 136–139.
- Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E and Hilpert, K.F. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **American Journal of Medicine** (9): 71S–88S.
- Kuno, T, Hirose, Y and Hata, K. 2004. Preventive effect of fermented brown rice and rice bran on N-nitrosomethylbenzylamineinduced esophageal tumorigenesis in rats. **International Journal of Oncology** 25(1): 1809-1815.
- Kuno, T., Hirose, Y and Yamada, Y. 2006. Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by fermented brown rice and rice bran. **Oncology Reports** 15: 533-538.

- Laokuldilok, T., Shoemaker, C.F., Jongkaewwattana, S and Tulyathan, V. 2011. Antioxidants and antioxidant activity of several pigmented rice brans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 59(1):193-199.
- Li, S.C., Chou, T.C and Shih, C.K. 2011. Effects of brown rice, rice bran, and polished rice on colon carcinogenesis in rats. **Food Research International** 40(1): 209–216.
- Lindgren, G., Liljegren, A., Jaramillo, E., Rubio, C and Lindblom, A. 2002. Adenoma prevalence and cancer risk in familial non-polyposis colorectal cancer. **Gut** . 50(2): 228–234.
- Lyon, F. ENCR. European Network of Cancer Registries. 2001. European incidence database. National Cancer Institute. 2009. Liver Cancer. **National Institutes of Health** : 1 – 47.
- Megan, T.S., Michael, J.T., Bernard, E. P and Susan, M. 2006. Caught redhanded: Rc encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice. **The Plant Cell** 18(2): 283–294.
- Min, B., McClung, A.M and Chen, M.H. 2011. Phytochemicals and antioxidant capacities in rice brans of different color. **Journal of Food Science** 76(1): C117–126.
- Minhajuddin, M., Beg, Z.H and Iqbal, J. 2000. Hypolipidemic and antioxidant properties of tocotrienol rich fraction isolated from rice bran oil in experimentally induced hyperlipidemic rats. **Food and Chemical Toxicology** 5: 747-753.
- Morrow, A., Writer, M. 2012. Liver cancer stages. [Online].Available. <http://www.cancer.net/cancer-types/liver-cancer/stages>. (22 june 2013)
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods** 65(1-2): 55-63.
- Muntana, N and Prasong, S. 2010. Study on total phenolic contents and their antioxidant activities of Thai white, red and black rice bran extracts. **Pakistan Journal of Biological Sciences** 13(4): 170-174.
- Newman, D.J., Cragg, G.M and Snader, K.M. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Branch** (3): 215-234.
- Nam S.H., Choi S.P., Kang M.Y., Kozukue N and Friedman M. 2005. Antioxidative, antimutagenic, and anticarcinogenic activities of rice bran extracts in chemical and cell assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53(3): 816-822.

- Nicolau, K.C., Hepworth, D., King, N.P and Finlay, M.R. 1999. Chemistry, Biology and Medicine of Selected Tubulin Polymerizing Agents. **Pure and Applied Chemistry** 71(1): 989-997.
- Norazalina, S., Norhaizan, M.E., Hairuszah, I and Norashareena, M.S. 2009. Anticarcinogenic efficacy of phytic acid extracted from rice bran on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology** 62(3): 259-268.
- Ohta, T. 1986. Natto. **Legume-based Fermented Foods** NR Reddy MD Pierson D Merle, DK Salunkhe: 85-93.
- Peng, C., Lin, Z., Lin, G and Chen, S. 2006. The anti-photooxidation of anthocyanins-rich leaves of a purple rice cultivar. **Science in China Series** 49(6): 543-551.
- Phrompittayarat, W., Putalun, W., Tanaka, H., Jetiyanon, K., Wittaya-areekul, S and Ingkaninan, K. 2007. Comparison of various extraction methods of *Bacopa monnieri*. **Naresuan University Journal**. 15(1): 29-34.
- Potter, JD. 1997. Food Nutrition and the prevention of cancer. **World Cancer Research Fund (WCRF) and the American Institute of Cancer Research (AICR)**. 4(10) :30-40.
- Panunto, W., Kaendee, N., Tanuchit, S., Itharat, N., Lerdvuthisophon, N and Hansakul, P. 2010. Determination of Phenolic Compounds, Flavonoids, and Antioxidant Activities in Water Extracts of Thai Red and White Rice Cultivars. **Journal of the medical association of Thailand** 93(7): S83 –S91.
- Qureshi, A.A., Sami, W.A., Salser and F.A. Khan. 2002. Dose-dependent suppression of serum cholesterol by tocotrienol-rich fraction (TRF25) of rice bran in hypercholesterolemic humans. **Atherosclerosis** 1: 199-207.
- Rao, A.S., Reddy, S.G., Babu, P.P and Reddy, A.R. 2010. The antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extracts from Njavara rice bran. **BMC Complementary and Alternative Medicine** (28 January) :10-14
- Robert, A. 2007. The Biology of Cancer. **Garland Science** 9: 1 – 47.
- 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

- Ryan,E.P., Heuberger, A.L., Weir,T.L., Barnett, B., Broeckling, C.D and Prenni, J. E. 2010. Rice Bran fermented with *saccharomyces boulardii* generates novel metabolite profiles with bioactivity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 59: 1862–1870.
- Ryu, S.N, Park, S.Z and Ho, C.T. 1998. High performance liquid chromatographic determination of anthocyanin pigments in some varieties of black rice. **Journal of Food and Drug Analysis** 6:729 – 736.
- Ryynanen, M., Lampi, A.M., Salo-Vaananen ,P., Ollilainen ,V and Piironen,V. 2004. A small scale sample preparation method with HPLC analysis for determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. **Journal of Food Composition and Analysis** 6: 749-765.
- Samad A.K., Taylor, RS., Marshall, T and Chapman, M.A. 2005. A meta-analysis of the association of physical activity with reduced risk of colorectal cancer. **Colorectal Disease** 7(3): 204 - 213.
- Sakai, M., Okabe, M., Tachibana, H and Yamada, K. 2006. Apoptosis induction by gamma - tocotrienol in human hepatoma Hep3B cells. **Journal of Nutritional Biochemistry** 17(10): 672–676.
- Sarkar, P.K., Cook, P.E. and Owens, J.D. 1993. Bacillus fermentation of soybeans. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 9: 295-299.
- Shah, S and Sylvester, P.W. 2004. Tocotrienol-induced caspase-8 activation is unrelated to death receptor apoptotic signaling in neoplastic mammary epithelial cells. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)** 229: 745–755.
- Sinha, R., Chow, WH., Kulldorf, M., Denobile, J., Butler, J and Garcia-Closas, M., Weil, R., Hoover, R.N and Rothman, N. 1999. Well Done, Grilled Red Meat Increase the Risk of Colorectal Adenomas. **Cancer Research** 59(17): 4320 – 4324.
- Soccol1,CR., Vandenberghe1, L. P de S., Michele, R.S., Medeiros1 A.B., Yamaguishi1,C.T., Lindner, J.D Dea., Pandey, A and T.S V. 2010. The Potential of Probiotics. **The Potential of Probiotics Food Technol. Biotechnol** 48(4): 413–434.
- Sookwong, P., Nakagawa, K., Murata, K., Kojima, Y and Miyazawa, T . 2007. Quantitation of tocotrienol and tocopherol in various rice brans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 55 (2): 461-466.

- Srivastava, J.K and Gupta, S. 2006. Tocotrienol-rich fraction of palm oil induces cell cycle arrest and apoptosis selectively in human prostate cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 346: 447–453.
- Steinkraus, K.H. 1983. Indigenous fermented amino acid/peptide sauces and pastes with meatlike flavors: Chinese soy sauce Japanese shoyu Japanese miso southeast Asian fish sauces and pastes and related foods Section 5 in Handbood of Indigenous Fermented. **Foods Microbiology series** 9: 530–547.
- Sumi, H., Yatagai, C., Wada, H., Yoshida, E and Maruyama, M. 1995. Effect of *Bacillus natto*-fermented product (BIOZYME) on blood alcohol, aldehyde concentrations after whisky drinking in human volunteers, and acute toxicity of acetaldehyde in mice. **Arukuru Kenkyuto Yakubutsu Ison** 30: 69–79.
- Sun, W., Wang, Q., Chen, B., Liu, J., Liu, H and Xu, W. 2008. Gamma-tocotrienol-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells is associated with a suppression in mitogen-activated protein kinase signalling. **British Journal of Nutrition** 99: 1247–1254.
- Thailand Cancer Rehabilitation Club. 2553. มะเร็งตับ.ชมรมฟื้นฟูสุขภาพผู้ป่วยมะเร็ง กิจกรรมสำหรับ ผู้ป่วยมะเร็ง รอบรู้เรื่องมะเร็ง อาหารสำหรับผู้ป่วยมะเร็ง การดูแลผู้ป่วยมะเร็ง การรักษาแต่ละชนิด. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.siamca.com/knowledge-id50.html>(5 มีนาคม 2555).
- Thirabunyanon, M and Thongwittaya, N. 2007. Screening and effects of probiotic *Bacillus Subtilis* MP on microbiological or biochemical changes in fermented soybean food. Poster presentation. ในการประชุมทางวิชาการนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส 11-13 ตุลาคม 2550. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- Vergara, B.S and Datta. S.K. 1996. *Oryza sativa* L. **Plant Resources of South–East Asia** 10: 106-115.
- Wizna., Hafil A., Yose R., A.D and Helmi, M. 2012. The Effect of Supplementation of Micro Nutrient on Nutrient Rice Bran Which Fermented by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Pakistan Journal of Nutrition** 11 (5) : 439-443.

- Xu, W.L., Liu, J.R., Liu, H.K., Qi, G.Y., Sun, X.R., Sun, W.G and Chen, B.Q. 2009. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by gamma-tocotrienol in human colon carcinoma HT-29 cells. **Nutrition** 25: 555–566.
- Zhang F., Gonzalez A., Zhao M., Payne C.T and Lloyd A. 2003. A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of Arabidopsis. **Development** 130: 4859–486.
- Zhixiong L., Jintae L.M and Hwan, C. 2010. Antioxidant, antibacterial, tyrosinase inhibitory, and biofilm inhibitory activities of fermented rice bran broth with effective microorganisms. **Biotechnology and Bioprocess Engineering** 15(1):139-144.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์และอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์

อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimal medium)

ประกอบด้วย

NaHCO ₃	3.7 กรัมต่อลิตร
DMEM	13.5 กรัมต่อลิตร
Fetal bovine serum	1 เปอร์เซ็นต์
Penicillin – streptomycin	1 เปอร์เซ็นต์
Non essential amino acid	1 เปอร์เซ็นต์

1. ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM โดยชั่งอาหารเลี้ยงเซลล์ 13.5 กรัมต่อลิตร ละลายในน้ำกลั่น 780 มิลลิลิตร

2. ทำการชั่งโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต NaHCO₃ 3.7 กรัมต่อลิตร ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นผสมรวมกับ DMEM ในข้อที่ 1.1

3. ทำการเติมซีรัม fetal bovine serum 100 มิลลิลิตร ตามด้วยกรดอะมิโน non essential amino acid 10 มิลลิลิตร และทำการปรับค่า pH ให้อยู่ประมาณ 7.4 จากนั้นทำการกรองด้วย syringe filter ขนาด 0.22 ไมครอน ลงในขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

4. ทำการเติมยาปฏิชีวนะ penicillin – streptomycin 10 มิลลิลิตร แล้วทำการปิดฝาขวดให้แน่นเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย NB (Nutrient broth)

อาหาร NB มีส่วนประกอบดังนี้

Beef extract	3.0 กรัมต่อลิตร
Peptone	5.0 กรัมต่อลิตร

ชั่งอาหาร 8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย NA (Nutrient agar)

อาหาร NA มีส่วนประกอบดังนี้

Beef extract	3.0 กรัมต่อลิตร
Peptone	5.0 กรัมต่อลิตร
Agar	15.0 กรัมต่อลิตร

ชั่งอาหาร 8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติมผงวุ้น 15 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีและวิธีการเตรียม

สารเคมีและวิธีการเตรียม

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดรำข้าว

1. สารละลายเมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์

Methanol 800 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร

เทสารละลายเมทานอล 800 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์จากนั้นเติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1. สารละลาย (isopropanol : acetonitrile : water 3 : 2 : 2)

Isopropanol 300 มิลลิลิตร

Acetonitrile 200 มิลลิลิตร

Water 200 มิลลิลิตร

เทสารละลาย isopropanol 300 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์เติม acetonitrile 200 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

สารที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

เตรียมสารละลาย methoxyamine hydrochloride ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร

ประกอบด้วย

methoxyamine hydrochloride 20 มิลลิกรัม

น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

ทำการชั่ง methoxyamine hydrochloride 20 มิลลิกรัม จากนั้นทำการละลายด้วยน้ำ กลั่น 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

เตรียมสารละลาย N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide และ trimethylchlorosilane 1 เปอร์เซ็นต์ (MSTFA + 1% TMCS)

ประกอบด้วย

N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide 990 ไมโครลิตร

trimethylchlorosilane 10 ไมโครลิตร

ปิเปตสารละลาย N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide มา 990 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย trimethylchlorosilane 10 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน

สารละลาย PBS (phosphate buffer saline) pH7.4

ประกอบด้วย

Sodium chloride (NaCl)	9 กรัม
Sodiumhydrogen phosphate	9 กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	1.5 กรัม

ทำการชั่งสารเคมีทั้งหมดแล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 975 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปรับค่า pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

สารละลาย MTT

ประกอบด้วย

MTT	0.5 มิลลิกรัม
-----	---------------

ชั่งสาร MTT มา 0.5 มิลลิกรัม จากนั้นนำมาละลายในสาร DMSO 1 มิลลิลิตร

5.การเตรียมสาร McFarland standard

ประกอบด้วย

Barium chloride ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1.175 เปอร์เซ็นต์
---	-------------------

โดยทำการชั่ง Barium chloride 1.175 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

Sulfuric acid (H_2SO_4)	1 เปอร์เซ็นต์
---	---------------

ปิเปต sulfuric acid ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ มาปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมนลงในน้ำกลั่นและทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

ตารางผนวก 1 การเปรียบเทียบความขุ่นของ McFarland เบอร์ต่างๆ

สารเคมี	เบอร์										
	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.175% Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	10
1% Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
Approx. cell density ($\times 10^8$ /ml)	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

ผสม BaCl_2 ความเข้มข้น 1.175 เปอร์เซ็นต์ และ H_2SO_4 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ตามอัตราส่วนที่กำหนด เก็บไว้ในหลอดทดลอง เมื่อจะใช้งานจะนำมาเขย่าหลอดเพื่อให้เกิดความขุ่นเทียบได้กับ McFarland เบอร์ต่างๆ ตามที่ต้องการ

การเตรียม DPPH 0.5 มิลลิโมลาร์

ประกอบด้วย

DPPH 19.716 มิลลิกรัม

MeOH เมทานอล (100 เปอร์เซ็นต์) 100 มิลลิลิตร

สูตรการคำนวณ

$$\begin{aligned}
 \text{CV} &= \frac{\text{g}}{1000 \text{ M.V}} \\
 \text{g} &= \frac{(0.5 \times 10^{-3}) \times 100 \times 394.32}{1000} \\
 &= 0.019716 \text{ กรัม} = 19.716 \text{ มิลลิกรัม}
 \end{aligned}$$

หมายเหตุ

M = ความเข้มข้นของสารที่ต้องการ หน่วยเป็น มิลลิโมลาร์

V = ปริมาตรที่ต้องการ หน่วยเป็นมิลลิลิตร

CV = น้ำหนักโมเลกุลของสาร DPPH

ดังนั้นทำการชั่ง DPPH 19.716 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ขวดปรับปริมาตร

การเตรียมสารมาตรฐาน Ascorbic acid

Ascorbic acid

เตรียม ascorbic acid โดยละลายในน้ำกลั่น ตามความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 3.5, 5, 10, 20, 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การเตรียม Gallic acid

Gallic acid

20 มิลลิกรัม

เมทานอล

1 มิลลิลิตร

เตรียม gallic acid ละลายในเมทานอลที่มีความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ โดยเตรียมความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ทั้งหมด 6 ความเข้มข้น 0.1, 0.05, 0.025, 0.01, 0.005, 0.0025 และ 0.00125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย Sodium carbonate 5%

Sodium carbonate

50 กรัม

น้ำกลั่น

1 ลิตร

เตรียม sodium carbonate ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมให้เข้าจนกว่า sodium carbonate จะละลายทั้งหมด

ภาคผนวก ค

หลักการวิเคราะห์สารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย
Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

หลักการวิเคราะห์สารด้วย Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) เป็นเทคนิคหนึ่งที่เริ่มนิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายมากขึ้น เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถจำแนกชนิดขององค์ประกอบที่มีอยู่ในสารได้อย่างค่อนข้างแม่นยำ โดยอาศัยการเปรียบเทียบ fingerprint ของเลขมวล (mass number) ของสาร ตัวอย่างนั้น ๆ กับข้อมูลที่มีอยู่ นอกจากนี้เทคนิคนี้ยังมีความสามารถในการวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงปริมาณ (quantitative analysis) และเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) ได้อย่างถูกต้อง ดังนั้น GC-MS เป็นเครื่องมือที่ประกอบไปด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนของเครื่อง GC (Gas chromatography) ซึ่งเป็นส่วนที่ทำหน้าที่ในการแยกองค์ประกอบของสารที่มีอยู่ในตัวอย่างให้ออกมาทีละองค์ประกอบก่อนที่จะเข้าสู่ detector และอีกส่วน คือ เครื่อง MS (Mass spectrometry) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น detector ในการตรวจสอบว่าองค์ประกอบต่าง ๆ ที่ผ่านออกมาจากเครื่อง GC นั้น มีเลขมวล (mass number) เป็นเท่าไร เพื่อที่จะสามารถจำแนกได้ว่า สารที่เราสนใจอยู่นั้นประกอบด้วยองค์ประกอบชนิดใดบ้าง และมีปริมาณเท่าไร

ภาคผนวก ง

วิธีการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH และ Total phenolic

การวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging assay

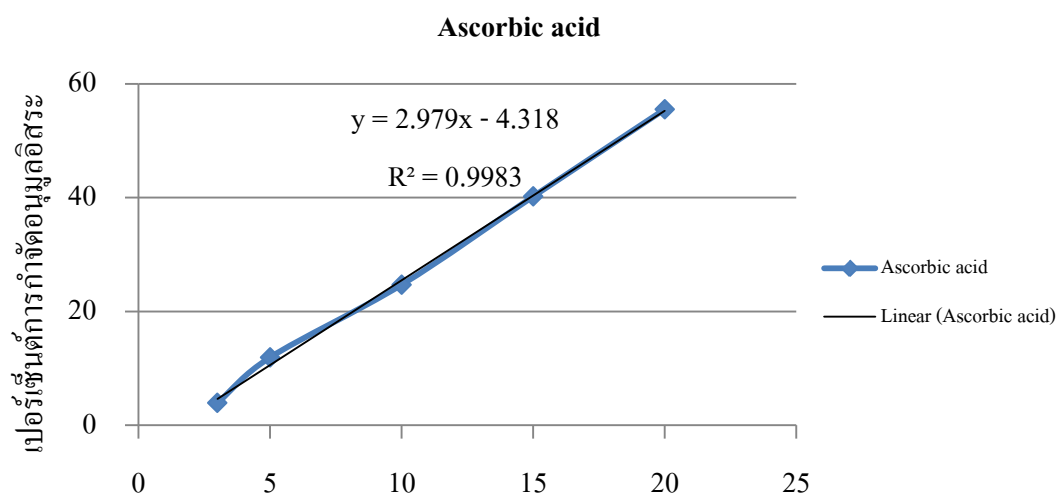
การวัดความสามารถในการยับยั้งสาร DPPH เมื่อสาร DPPH ทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สีของสารละลายสีม่วงจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (Huan et al., 2005; พรณี เคนรุ่งเรือง, 2550) ซึ่งจะทำให้การเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน โดยวัดค่าความยาวคลื่นที่ 517 นาโนเมตร

วิธีการคำนวณ

สูตรการคำนวณ

$$\text{DPPH (\%)} = \frac{(A_{517 \text{ nm}} \text{ control} - A_{517 \text{ nm}} \text{ sample}) \times 100}{A_{517 \text{ nm}} \text{ control}}$$

สูตรการคำนวณหาค่า IC_{50} ascorbic acid



ภาพผนวก 1 กราฟเชิงเส้นของเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสาร

มาตรฐาน ascorbic acid

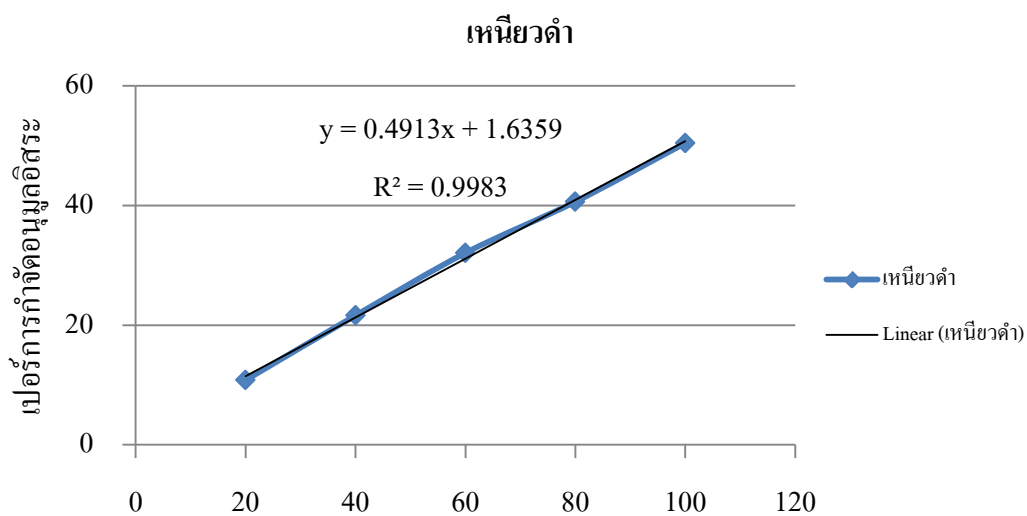
ตัวอย่างการคำนวณ

$$\text{จากสมการ } y = 2.979x - 4.318$$

$$\text{แทนค่า } y = 50 \quad \text{ดังนั้น} \quad 2.979x = 50 + 4.318$$

$$X = 18.234$$

ดังนั้นค่า IC_{50} ของ ascorbic acid จะเท่ากับ 18.234 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



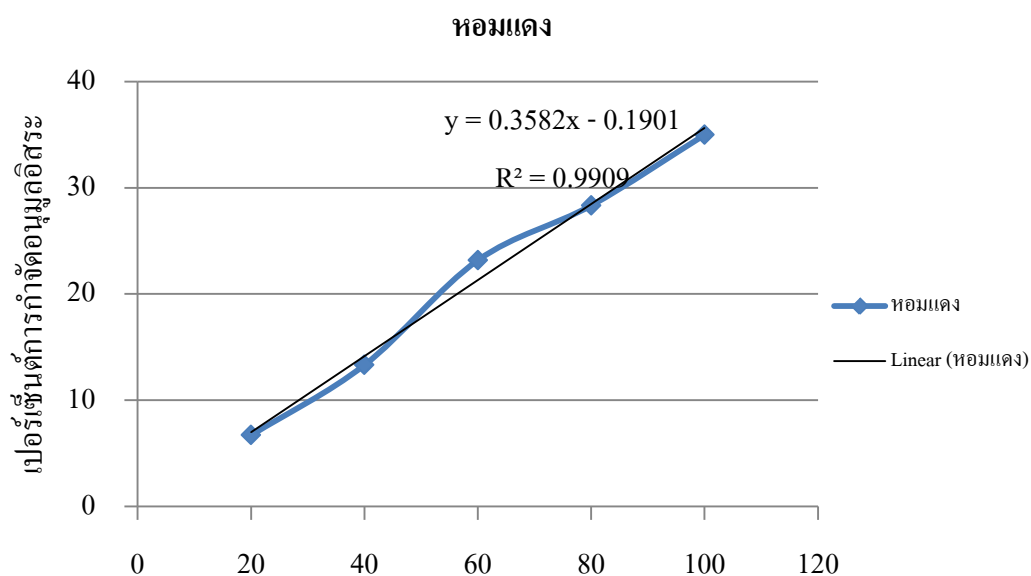
ภาพผนวก 2 กราฟเชิงเส้นของเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดรำข้าวเหี่ยวดำ

$$\text{จากสมการ } y = 0.4913x - 1.6359$$

$$\text{แทนค่า } y = 50 \quad \text{ดังนั้น} \quad 0.491x = 50 + 1.6359$$

$$X = 100.771$$

ดังนั้นค่า IC_{50} ของรำข้าวเหี่ยวดำ จะเท่ากับ 100.771 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



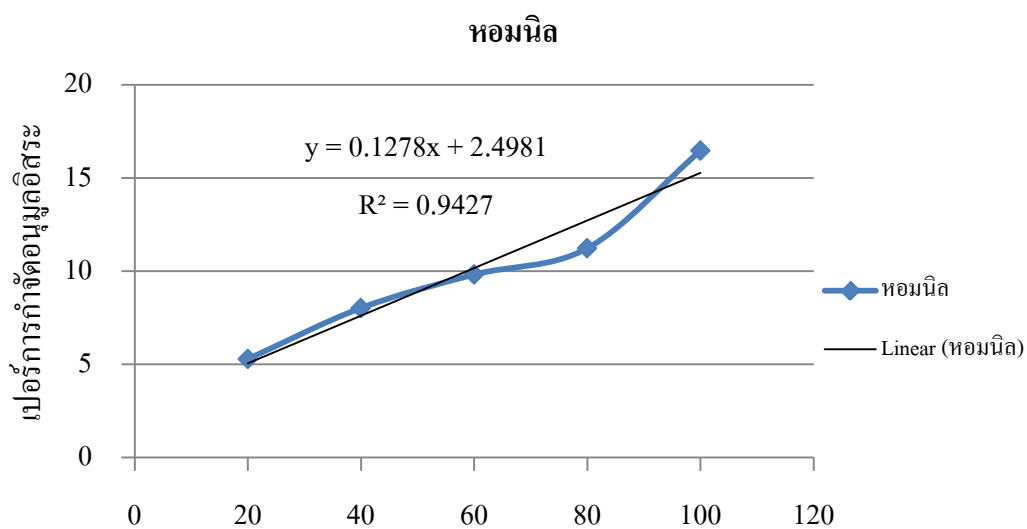
ภาพผนวก 3 กราฟเชิงเส้นของเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดลำข้าวหอมแดง

จากสมการ $y = 0.3582x - 0.1901$

แทนค่า $y = 50$ ดังนั้น $0.3582x = 50 + 0.1901$

$X = 139.056$

ดังนั้นค่า IC₅₀ ของลำข้าวหอมแดง จะเท่ากับ 139.056 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร



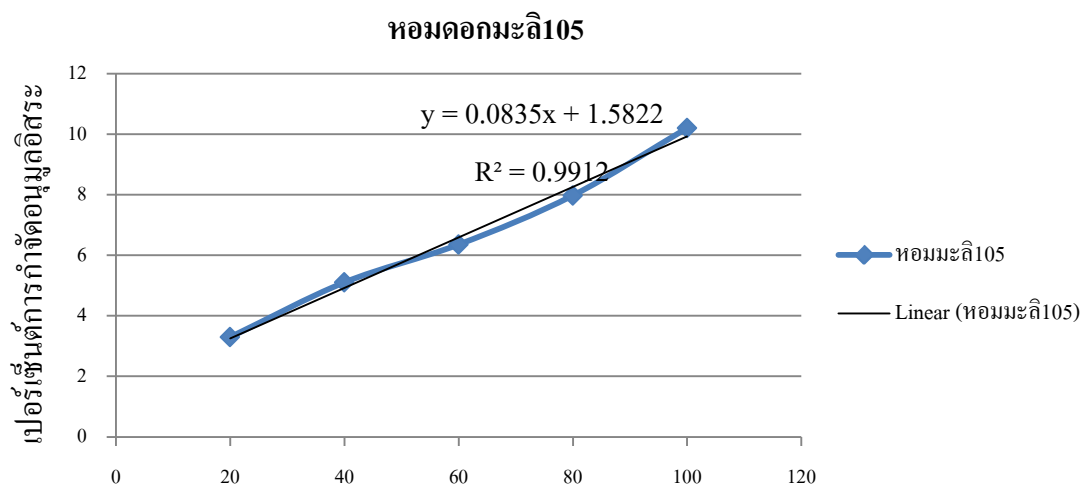
ภาพผนวก 4 กราฟเชิงเส้นของเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดลำข้าวหอมนิล

$$\text{จากสมการ } y = 0.1278x - 2.4981$$

$$\text{แทนค่า } y = 50 \quad \text{ดังนั้น} \quad 0.1278x = 50 + 1.4981$$

$$X = 371.689$$

ดังนั้นค่า IC_{50} ของรำข้าวหอมนิล จะเท่ากับ 371.689 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพผนวก 5 กราฟเชิงเส้นของเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดรำ

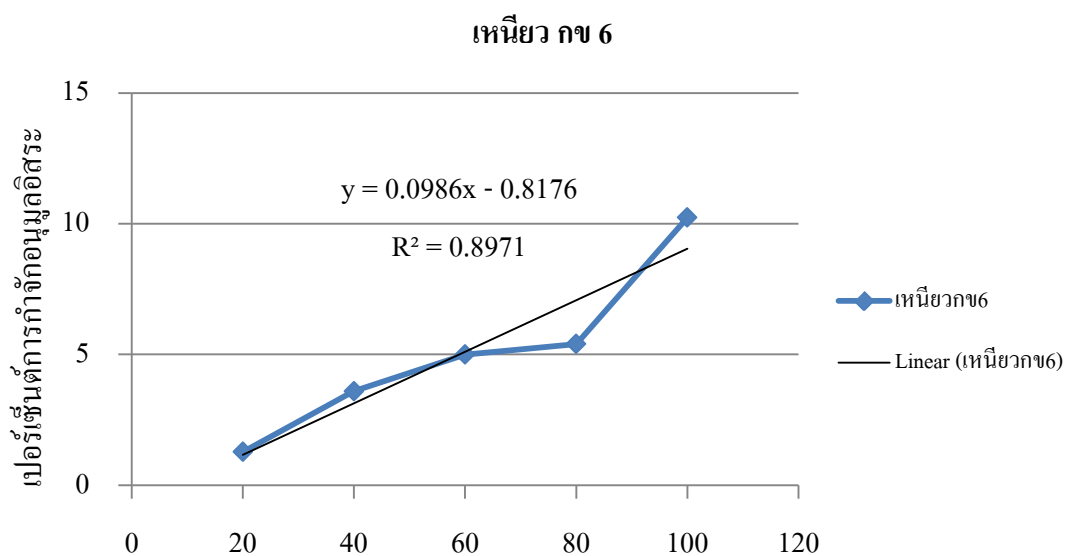
ข้าวหอมดอกมะลิ 105

$$\text{จากสมการ } y = 0.0835x - 1.5822$$

$$\text{แทนค่า } y = 50 \quad \text{ดังนั้น} \quad 0.0835x = 50 + 1.5822$$

$$X = 515.391$$

ดังนั้นค่า IC_{50} ของรำข้าวหอมนิล จะเท่ากับ 515.391 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพผนวก 6 กราฟเชิงเส้นของเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดรากข้าวเหินยว กข 6

$$\text{จากสมการ } y = 0.0986x - 0.8179$$

$$\text{แทนค่า } y = 50 \quad \text{ดังนั้น} \quad 0.0986x = 50 + 0.8179$$

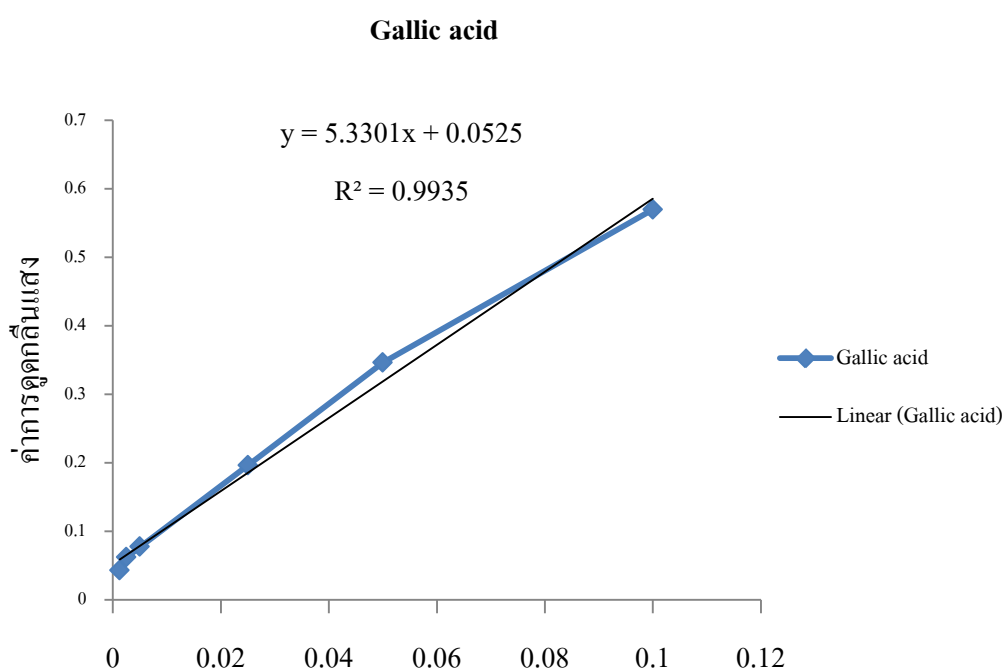
$$X = 579.854$$

ดังนั้นค่า IC_{50} ของรากข้าวหอมนิล จะเท่ากับ 579.854 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

การวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ของรากข้าวที่ผ่านการหมักและไม่ได้หมักจะทำการคำนวณเช่นเดียวกับรากข้าวสากัดเมทานอล ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น

การวิเคราะห์หาค่า ฟีนอลรวม Total Phenolic content

การหาฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจะอาศัยสาร Follin-Ciocalteu ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารฟีนอลิกตัวใดตัวหนึ่ง แต่สามารถทำปฏิกิริยากับฟีนอลิกได้ทุกกลุ่มที่มีสารสกัด ซึ่งในสารสกัดบางครั้งอาจพบโปรตีนอยู่ด้วย เมื่อสาร Follin-Ciocalteu เข้าทำปฏิกิริยากับสารฟีนอลิกแล้ว จากนั้นทำการเติมโซเดียมคาร์บอเนต Na_2CO_3 จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน นำค่าความยาวคลื่นที่วัดได้มาทำการคำนวณหาปริมาณฟีนอลรวม โดยใช้กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid)



ภาพผนวก 7 กราฟเชิงเส้นของสารมาตรฐาน gallic acid

วิธีการคำนวณ (Adesegun et al., 2007)

โดยคำนวณจากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน $y = 5.3301x + 0.0525$

เมื่อ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

5.3301 คือ ค่าความชันของกราฟ

x คือ ค่าที่ได้จากการคำนวณ

0.045 คือ ค่าคงที่ของสมการ (จุดตัดแกน y)

GAE (Gallic acid equivalent)

$$T = \frac{C \cdot V}{M}$$

M

T คือ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกรัม

C คือ ค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

V คือ ปริมาณสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ มีหน่วยเป็นมิลลิลิตร

M คือ น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ มีหน่วยเป็นกรัม

ตารางผนวก 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ที่ความเข้มข้น 330 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

พันธุ์ข้าว	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร					
	1	2	3	4	5	6
ข้าวเหนียวดำ	1.110	1.132	1.198	1.208	1.112	1.192
ข้าวหอมแดง	0.93	0.884	0.958	0.952	0.968	0.974
ข้าวหอมนิล	0.290	0.288	0.402	0.390	0.416	0.398
ข้าวหอมมะลิ 105	0.230	0.200	0.250	0.246	0.244	0.238
ข้าวเหนียว กข 6	0.246	0.248	0.246	0.246	0.254	0.200

ตัวอย่าง

การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของ gallic acid ของสารสกัดจากรำข้าวเหนียวดำ

$$\text{จากสมการ } y = 5.3301x + 0.0525$$

$$\text{แทนค่า } y = 1.110$$

$$1.110 - 0.0525 = 5.3301x$$

$$x = 0.1984$$

$$\text{ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม เท่ากับ } \frac{(0.1984)(0.1)}{0.00033}$$

ดังนั้นปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมจึงเท่ากับ 60.1217 มิลลิกรัม gallic acid ต่อ
สารสกัดหนึ่งกรัม

ภาคผนวก จ

ภาพแสดงลักษณะของเมล็ดข้าว ข้าวสาร และรำข้าว 5 สายพันธุ์



ภาพผนวก 8 ลักษณะของเมล็ดข้าว ข้าวสาร และรำข้าวเหนียวดำ



ภาพผนวก 9 ลักษณะของเมล็ดข้าว ข้าวสาร และรำข้าวหอมแดง



ภาพผนวก 10 ลักษณะของเมล็ดข้าว ข้าวสาร และรำข้าวหอมนิ



ภาพผนวก 11 ลักษณะของเมล็ดข้าว ข้าวสาร และรำข้าวหอมดอกมะลิ 105



ภาพผนวก 12 ลักษณะของเมล็ด ข้าวสาร และรำข้าวข้าวเหนียว กข 6

ภาคผนวก จ

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวปิยนถ ประเสริฐสังข์
เกิดเมื่อ	18 สิงหาคม 2531
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2549 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนบัวขาว จังหวัดกาฬสินธุ์ พ.ศ. 2553 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ (มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่)
งานวิจัยเผยแพร่	การนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 38 (วทท 39) เรื่อง Potential probiotic of <i>Lactobacillus</i> sp. isolated from fermented soybeans (thua-noa) on fermented rice brans