รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การแยกสกัดและการศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพของเฮมิเซลลูโลสในรำที่ได้จากการสีข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสีนิล

โดย

อ.ดร.ดริษ กวักเพฑูรย์

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ

13 มิถุนายน 2556

สัญญาเลขที่ MRG5380254

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ
การแยกสกัดและการศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพของเฮมิเซลลูโลสในรำที่ได้จากการสีข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสีนิล

ผู้วิจัย **อ.ดร.ดริษ กวักเพฑูรย์**
สังกัด **ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

สนับสนุนโดย
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5380254

ชื่อโครงการ: การแยกสกัดและการศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพของเฮมิเซลลูโลสในรำที่ได้จากการสีข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสีนิล

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน : อ.ดร.ดริษ กวักเพฑูรย์

อีเมล์: kdaris@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี

บทคัดย่อ:

ในการศึกษานี้เฮมิเซลลูโลสของรำข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสีนิล ถูกสกัดด้วยน้ำร้อนและสารละลายด่าง จากนั้นนำมาคัดแยกส่วนตามระดับความเป็นกรด โดยส่วนต่างๆที่ได้นำมาศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาย โดยรำข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้าคือ 9.25%, 10.16%, 18.57% และ 8.47% ตามลำดับ ส่วนรำข้าวพันธุ์สีนิลมีปริมาณร้อยละของความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้าคือ 9.21%, 11.98%, 18.17% และ 5.98% ตามลำดับ เมื่อนำรำข้าวมากำจัดน้ำมัน โปรตีน และแป้งออก จะเหลือปริมาณรำข้าว 70% จากการสกัดเฮมิเซลลูโลสออกจากรำข้าวด้วยน้ำร้อน พบว่าได้ปริมาณเฮมิเซลลูโลสคิดเป็น 0.45% และ 0.75% ของน้ำหนักรำข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (WM) และข้าวสีนิล (WH) ตามลำดับ ส่วนปริมาณเฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้ด้วยสารละลายด่าง คิดเป็น 7.40% และ 8.02% ของน้ำหนักรำข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (AM) และข้าวสีนิล (AH) ตามลำดับ และเมื่อแยกเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง ออกตามระดับความเป็นกรดด้วย anion exchange column (DEAE) ออกเป็น 2 ส่วน ได้ปริมาณเฮมิเซลลูโลสส่วนที่เป็นกลาง และส่วนที่เป็นกรด ของรำข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 คือ 4.38% (AM-neutral) และ 12.28% (AM-acid) ตามลำดับ และของรำข้าวพันธุ์ข้าวสีนิล คือ 5.42% (AH-neutral) และ 14.65% (AH-acid) ตามลำดับ จากการศึกษาการกระจายขนาดโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลส ด้วย Size exclusion chromatography พบว่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก ($\overline{M}_w$) ของ WM, AM, AM-neutral และ AM-acid คือ 35.10×10^4, 82.66×10^4, 82.32×10^4 และ 47.51×10^4 กรัมต่อโมล และของ WH, AH, AH-neutral และ AH-acid คือ 47.78×10^4, 81.92×10^4, 84.05×10^4 และ 59.83×10^4 กรัมต่อโมล ตามลำดับ จากนั้นนำไปศึกษาหาชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบด้วย HPAEC-PAD พบว่าเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำร้อนมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงที่สุด รองลงมาคือ กาแลกโตส อะราบิโนส และไซโลสตามลำดับ เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่างทั้งหมดมี น้ำตาลอะราบิโนสและไซโลสเป็นหลัก แต่มีสัดส่วนของน้ำตาลอะราบิโนสต่อไซโลส (Ara/Xyl) ต่างกัน โดยเฮมิ-เซลลูโลสส่วนที่เป็นกรด จะมี Ara/Xyl สูงกว่าเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง และส่วนที่เป็นกลาง ตามลำดับ จากการย่อยด้วย endo-xylanase พบว่าเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่างทั้งหมดของทั้งสองสายพันธุ์ มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง แสดงว่าเฮมิเซลลูโลสกลุ่มนี้มีโครงสร้างสายหลักเป็นไซแลนที่ต่อกันด้วยพันธะชนิดเบต้า-1,4 (β-1,4) ส่วนที่สกัดด้วยน้ำร้อนไม่พบการเปลี่ยนแปลง

คำหลัก : เฮมิเซลลูโลส, รำข้าว, ข้าวขาวดอกมะลิ 105, ข้าวสีนิล, ไซแลน

Abstract

Project Code : MRG5380254

Project Title : Extraction, Fractionation and Physicochemical Characterization of Hemicelluloses in Bran Obtained from Milling of Rice (Oryza sativa L.) cv. Khao Dawk Mali 105 and Si Nin

Investigator : Daris Kuakpetoon, Ph.D.

E-mail Address : kdaris@gmail.com

Project Period : 3 years

Abstract:

In this study, hemicelluloses from Khao Dawk Mali 105 and Si Nin rice brans were extracted by hot-water and alkaline solution and then fractionated based on acidity. Each fraction was investigated their physicochemical properties. Khao Dawk Mali 105 crude rice bran contained 9.25%, 10.16%, 18.57% and 8.47% in moisture, protein, fat and ash, respectively; whereas, those of Si Nin crude rice bran were 9.21%, 11.98%, 18.17% and 5.98%,respectively. After removing fat, protein, and starch, the weight of purified rice bran was 70% of the original weight. The yields of hot-water extractable hemicellulose from Khao Dawk Mali 105 (WM) and Si Nin (WH) rice brans were 0.45% and 0.75% of purified rice brans, respectively. The yields of alkaline extractable hemicellulose from Khao Dawk Mali 105 (AM) and Si Nin (AH) rice brans were 7.40% and 8.02% of purified rice brans, respectively. The alkaline extractable hemicelluloses were fractionated into 2 fractions (neutral and acid) by aninon exchange column (DEAE). The yield of neutral and acid hemicellulose fractions from Khao Dawk Mali 105 rice bran were 4.38% (AM-neutral) และ 12.28% (AM-acid), respectively. The yield of neutral and acid hemicellulose fractions from Si Nin rice bran were 5.42% (AH-neutral) and 14.65% (AH-acid), respectively. According to molecular weight distribution of hemicelluloses by size exclusion chromatography, the weight-average molecular weight ($\overline{M}_w$) of WM, AM, AM-neutral, and AM-acid were 35.10×10^4, 82.66×10^4, 82.32×10^4 และ 47.51×10^4 g/mole, respectively. The weight-average molecular weight (M_w) of WH, AH, AH-neutral, and AH-acid were 47.78×10^4, 81.92×10^4, 84.05×10^4 และ 59.83×10^4 g/mole, respectively. According to sugar moiety of extracted rice bran hemicellulose by HPAEC-PAD, glucose was the highest sugar found in hot-water extractable hemicellulose followed by galactose, arabinose, and xylose. In contrast,

arabinose and xylose were the major sugars found in all alkaline extractable hemicellulose fractions. The ratio of arabinose to xylose (Ara/Xyl) in hemicellulose was varied among fractions. The acid hemicellulose had a higher Ara/Xyl ratio than the alkaline extractable and neutral hemicelluloses, respectively. After incubating with endo-xylanase, the molecular weight of all alkaline extractable hemicellulose from bran of both rice varieties decreased indicating that the chain of these hemicelluloses were composed of xylose linked by β-1,4 bonding. However, there was no change in the molecular weight of hot water extractable hemicelluloses after incubating with endo-xylanase.

Keywords : Hemicellulose, rice bran, Khao Dawk Mali 105, Si Nin, Xylan

1. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1.1. ศึกษาและพัฒนาวิธีการสกัดเฮมิเซลลูโลสออกจากรำของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสีนิล

1.2. ศึกษาและพัฒนาวิธีการจำแนกชนิดของเฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้จากรำของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสีนิล

1.3. วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของเฮมิเซลลูโลสแต่ละชนิดที่สกัดแยกได้จากรำของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสีนิล

1.4. วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพของเฮมิเซลลูโลสแต่ละชนิดที่สกัดแยกได้จากรำของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสีนิล

2. วิธีการทดลอง

2.1. วัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัย

รำข้าวขาวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* L.) ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี ข้าวสีนิลซื้อมาจากห้างสรรพสินค้าแล้วนำมาสีที่ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี จากนั้นนำมาร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh เพื่อแยกแกลบและเศษข้าวหัก บรรจุใส่ถุงลามิเนตปิดผนึกแบบสุญญากาศ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2. ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

2.2.1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวขาวดอกมะลิ

2.2.1.1. ปริมาณความชื้น ตามวิธี AOAC (2005) section 32.1.03

2.2.1.2. ปริมาณโปรตีน ตามวิธี AOAC (2005) section 32.1.22

2.2.1.3. ปริมาณไขมัน ตามวิธี AOAC (2005) section 32.1.13

2.2.1.4. ปริมาณเถ้า ตามวิธี AOAC (2005) section 32.1.05

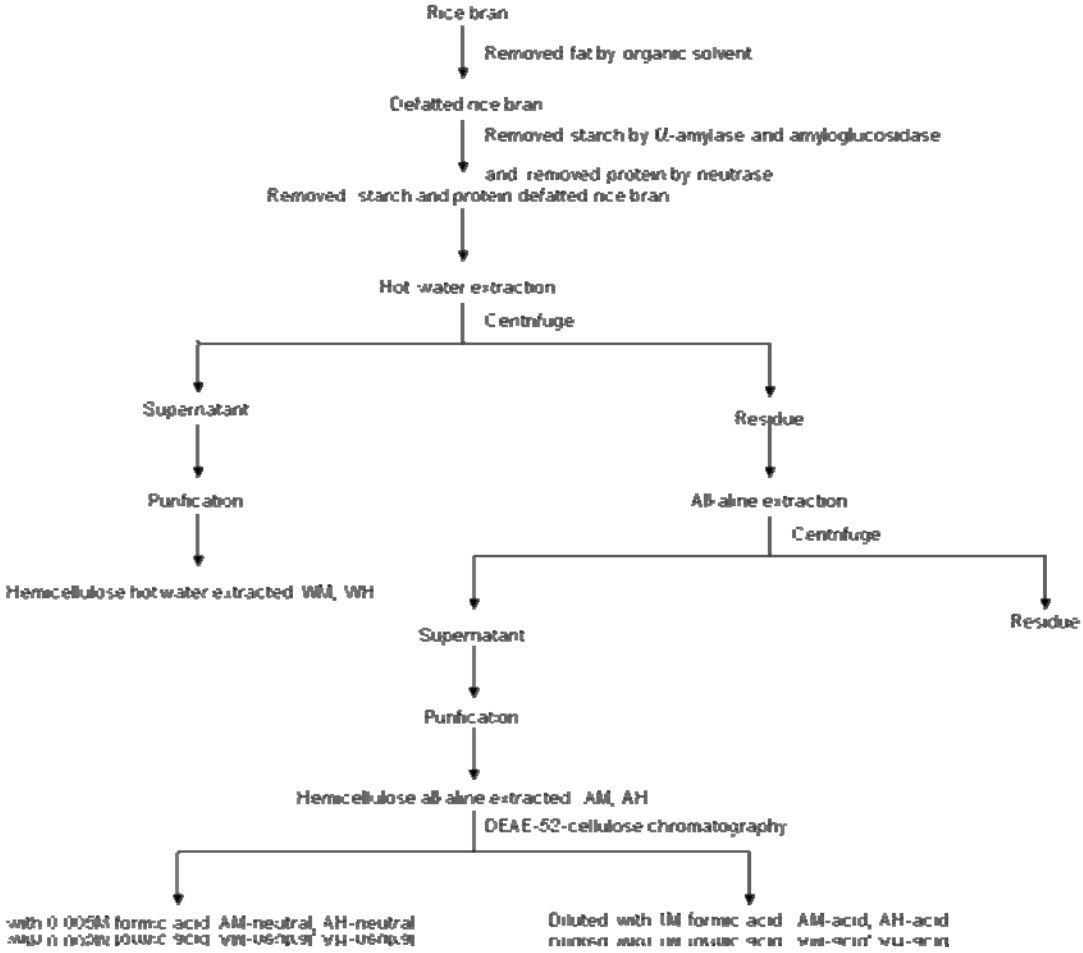
2.2.1.5. ปริมาณเส้นใยหยาบ ตามวิธี AOAC (2005) section 32.1.15

2.2.1.6. คำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรต

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ รายงานปริมาณขององค์ประกอบในรูปเปอร์เซ็นโดยน้ำหนัก

2.2.2. การเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัด ดัดแปลงจากวิธีของ Mod และคณะ (1978) นำรำข้าวที่ไล่ความชื้นออกแล้วมาสกัดแยกไขมันออกด้วยการผสมกับปิโตรเลียมอีเธอร์ ในสัดส่วนรำข้าวต่อปิโตรเลียมอีเธอร์เท่ากับ 1:3 กวนผสมข้ามคืน แยกไขมันออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง นำมาสกัดไขมันออกซ้ำเป็นครั้งที่ 2 จากนั้นเปลี่ยนตัวทำละลายจากปิโตรเลียมอีเธอร์เป็นอะซีโตนและเมทานอลตามลำดับ นำรำข้าวที่ผ่านการสกัดแยกไขมันออกแล้วระเหยเอาตัวทำละลายออกจนหมด (วางในตู้ดูดควัน)

2.2.3. การสกัดเฮมิเซลลูโลส



รูปที่ 1 วิธีการเตรียมตัวอย่าง การสกัด และการแยกเฮมิเซลลูโลสตามระดับความมีขั้ว

(M แทนเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และ H แทนแทนเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากรำข้าวสีนิล)

2.2.4. การแยกส่วนเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่างตามระดับความมีขั้ว

แยกเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่างตามระดับความมีขั้วเป็น 2 ระดับ ด้วย anion exchange chromatography (diethyaminoethyl-52-cellulose chromatography) โดยใช้สารละลาย 0.005M formic acid (H2) และ 1M formic acid (H3) เป็นสารชะ

2.2.5. การศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพของเฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้

2.2.5.1. ศึกษาการกระจายตัวตามน้ำหนักโมเลกุลและน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนักเทียบกับ pullulan มาตรฐาน (weight average molecular weight: MW) โดยใช้ high performance size exclusion chromatography (HPSEC)

2.2.5.2. ศึกษาชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลังจากทำ acid hydrolysis โดยใช้ระบบ high Performance anion exchange chromatography ที่ต่อกับ pulsed amperometric detector (HPAEC-PAD) ดัดแปลงจากวิธีของ Heather and Carole (2006)

2.2.5.3. ศึกษาผลของการย่อยด้วย endo-xylanase โดยใช้ high performance size exclusion chromatography (HPSEC) เปรียบเทียบลักษณะโครมาแกรมที่ได้ก่อนและหลังการย่อยด้วยเอนไซม์

ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 16 ในการวิเคราะห์ข้อมูล

3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1. องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว พบว่าในรำข้าวมีคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งโดยทั่วไปแล้วรำข้าวจะประกอบด้วยส่วนต่างๆ ของเมล็ดข้าวที่หลุดออกมาระหว่างขบวนการขัดสี ได้แก่ จมูกข้าวหรือคัพภะ เยื่อหุ้มเมล็ด และผิวรอบนอกของเอนโดสเปิร์ม โดยส่วนต่างๆ เหล่านี้จะเป็นแหล่งขององค์ประกอบทางเคมีชนิดต่างๆ ที่พบในรำข้าว โดยจมูกข้าวจะเป็นแหล่งของไขมันและโปรตีน เอนโดสเปิร์มจะเป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในรูปของสตาร์ชเป็นส่วนใหญ่ ส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดนั้น จะเป็นแหล่งของเส้นใยหยาบ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวนั้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของข้าวแล้ว ปัจจัยที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว คือ วิธีหรือระดับของการขัดสีข้าวอีกด้วย เช่น หากเมล็ดข้าวถูกขัดสีมาก รำที่ได้ก็จะมีสตาร์ชปนมามาก

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว

องค์ประกอบทางเคมี	% (โดยน้ำหนักแห้ง)	
	หอมมะลิ	สีนิล
ความชื้น	9.25±0.15	9.21±0.15
ไขมัน	10.16±0.53	11.98±0.69
โปรตีน	18.57±0.29	18.17±0.38
เถ้า	9.16±0.07	4.71±0.06
เส้นใยหยาบ	8.47±0.48	5.98±0.11
คาร์โบไฮเดรต	40.59±0.32	50.05±0.12

3.2. ผลผลิตสุทธิของเฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้จากรำข้าว

เฮมิเซลลูโลสเป็นโพลีแซกคาไรด์ที่มีความหลากหลาย ปริมาณและองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสขึ้นอยู่กับวิธีการสกัด (Xu et al. 2007) ปริมาณเฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้จากรำข้าวขาวดอกมะลิ105 และสีนิล ด้วยน้ำร้อน และสารละลายด่าง แสดงใน**ตารางที่** 2 พบว่าเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำร้อนของรำข้าวทั้งสองพันธุ์ (WM และ WH) มีปริมาณน้อย

กว่าที่สกัดด้วยสารละลายด่าง (AM และ AH) เช่นเดียวกับที่พบในงานวิจัยที่ศึกษาเฮมิเซลลูโลสจากชานอ้อย (Peng et al., 2005) และจากหญ้า perennial ryegrass (Xu et al. 2007) ด้วยวิธีการสกัดทั้งสองวิธี

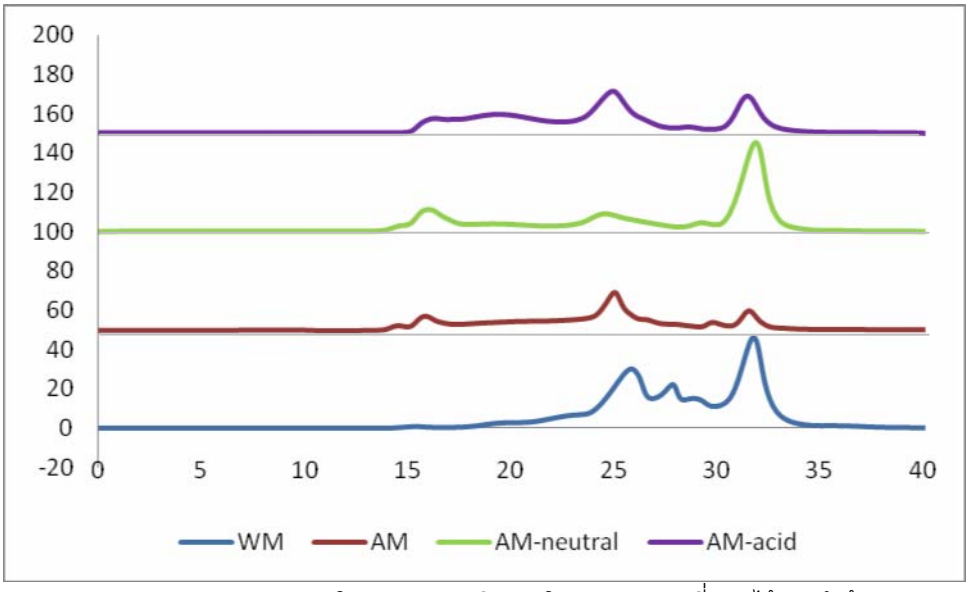
เฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้ด้วยสารละลายด่างเมื่อนำมาแยกด้วย DEAE-52-Cellulose chromatography จะสามารถแยกเฮมิเซลลูโลสออกตามปริมาณหมู่อะซิเตท (acetate) หรือตามระดับความมีขั้วได้ โดยการใช้ 0.005M formic acid เป็นสารชะ จะได้เฮมิเซลลูโลสที่มีหมู่อะซิเตทต่ำหรือมีขั้วต่ำ (AM-neutral และ AH-neutral) ซึ่งพบว่ามีปริมาณน้อยกว่า เฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการใช้ 1M formic acid เป็นสารชะ ที่จะได้เฮมิเซลลูโลสที่มีหมู่อะซิเตทสูงหรือมีขั้วสูง (AM-acid และ AH-acid) และรำข้าวสีนิลให้ผลผลิตสุทธิของเฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้สูงกว่ารำข้าวขาวดอกมะลิ 105

ตารางที่ 2 ผลผลิตสุทธิของเฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105

เฮมิเซลลูโลสที่สกัดและแยกได้จากวิธีต่างๆ	% ผลผลิตสุทธิ (น้ำหนักแห้ง)			
	รำข้าวขาวดอกมะลิ 105		รำข้าวสีนิล	
เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำร้อน	WM	3.85 ± 0.11	WH	5.50 ± 0.34
เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง	AM	17.07 ± 0.08	AH	25.56 ± 0.34
• แยกด้วย 0.005M Formic acid	AM-neutral	3.26 ± 0.01	AH-neutral	5.42 ± 0.26
• แยกด้วย1M Formic acid	AM-acid	8.98 ± 0.02	AH-acid	14.65 ± 0.41
กากที่เหลือจากการสกัด		20.34 ± 0.99		19.30 ± 0.46

3.3. **การกระจายตัวตามขนาดและน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของเฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้จากรำข้าว**

การกระจายตัวตามขนาดโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสจากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และสีนิลที่สกัดด้วยน้ำร้อนและสารละลายด่าง เมื่อศึกษาด้วยเทคนิค high performance size exclusion chromatography (HPSEC) ให้โครมาโตแกรมดังแสดงใน **รูปที่** 2 และ**รูปที่** 3 จากโครมาโตแกรมจะเห็นได้ว่าเฮมิเซลลูโลสมีขนาดโมเลกุลที่สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ช่วง ตามน้ำหนักโมเลกุล (x10^4 g/mol) คือ 48.71-300.97 (I), 7.36-48.71 (II), 0.39-7.36(III) และ 0.20-0.39 (IV) โดยเฮมิเซลลูโลสมีการกระจายตัวในแต่ละช่วงน้ำหนัก ดังแสดงใน**ตารางที่** 3 เฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้ส่วนใหญ่มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วงที่ III มากที่สุด ยกเว้น AH-neutral ที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วงที่ I มากที่สุด เมื่อพิจารณาจากน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก ($\overline{M_w}$) พบว่าเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำร้อน (AM และ AH) นั้น จะมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก ($\overline{M_w}$) ต่ำกว่าเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่างทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบว่าเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำร้อนจะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ จึงสามารถละลายได้ในน้ำร้อน ส่วนเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่างจะมีน้ำหนักโมเลกุลสูง และมีการจับกับเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรง จึงต้องใช้สารละลายด่างในการทำลายพันธะเพื่อสกัดแยกเฮมิเซลลูโลสออกจากผนังเซลล์พืช (Peng et al., 2005 Xu et al. 2007 Ren and Sun, 2010) เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง พบว่าเฮมิเซลลูโลสกลุ่มที่มีความมีขั้วต่ำ (AM-neutral และ AH- neutral) มี $\overline{M_w}$ เฮมิเซลลูโลสกลุ่มที่มีความมีขั้วสูง (AM-acid และ AH-acid) และเฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้ด้วยวิธีต่างๆ จากรำข้าวสีนิลจะมี M_w สูงกว่าที่ได้จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105



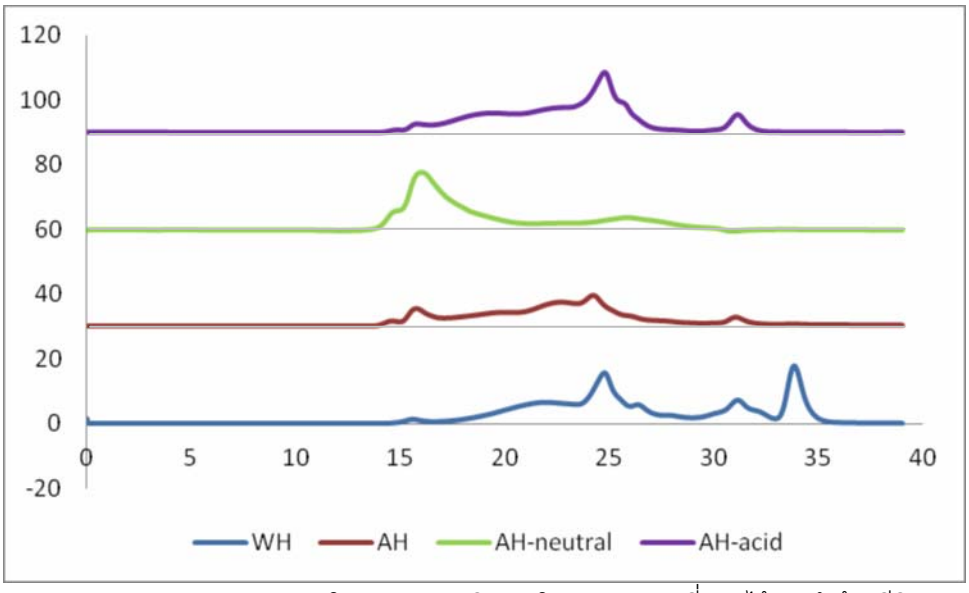
รูปที่ 2 Chromatogram การกระจายขนาดโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสกลุ่มต่างๆ ที่สกัดได้จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105

WM: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำร้อน

AM: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง

AM-neutral: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง แล้วแยกด้วย DEAE โดยใช้ 0.005M formic acid เป็นสารชะ

AM-acid: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง แล้วแยกด้วย DEAE โดยใช้ 1M formic acid เป็นสารชะ



รูปที่ 3 chromatogram การกระจายขนาดโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสกลุ่มต่างๆ ที่สกัดได้จากรำข้าวสีนิล

WH: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำร้อน

AH: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง

AH-neutral: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง แล้วแยกด้วย DEAE โดยใช้ 0.005M formic acid เป็นสารชะ

AH-acid: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง แล้วแยกด้วย DEAE โดยใช้ 1M formic acid เป็นสารชะ

ตารางที่ 4 การกระจายตัวตามขนาดและน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนักของเฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105

	ช่วงน้ำหนักโมเลกุล ($x10^4$ g/mol)				น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย
	I	II	III	IV	
เฮมิเซลลูโลส*	48.71-300.97	7.36-48.71	0.39-7.36	0.20-0.39	($x10^4$ g/mol)
WM	0.40	5.48	57.36	36.76	35.1
AM	12.42	24.44	49.02	14.12	82.66
AM-neutral	16.03	19.10	53.88	31.91	82.32
AM-acid	10.98	27.04	41.52	20.46	47.51
WH	1.96	23.34	43.23	31.47	47.78
AH	13.37	37.24	42.76	6.63	81.92
AH-neutral	41.93	31.1	25.4	1.57	84.05
AH-acid	5.35	38.78	51.18	6.69	59.83

*WM: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำร้อน

AM: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง

AM-neutral: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง แล้วแยกด้วย DEAE โดยใช้ 0.005M formic acid เป็นสารชะ

AM-acid: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง แล้วแยกด้วย DEAE โดยใช้ 1M formic acid เป็นสารชะ

WH: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำร้อน

AH: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง

AH-neutral: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง แล้วแยกด้วย DEAE โดยใช้ 0.005M formic acid เป็นสารชะ

AH-acid: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง แล้วแยกด้วย DEAE โดยใช้ 1M formic acid เป็นสารชะ

3.4. ชนิดและปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสที่สกัดจากรำข้าว

จากการศึกษาชนิดและปริมาณน้ำตาลที่พบเป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลส ด้วย HPAEC-PAD ได้ผลดังแสดงใน**ตารางที่ 5** จากผลการวิเคราะห์พบว่าเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำร้อน (WM และ WH) มีปริมาณและชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างจากเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง โดยเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำร้อนมีน้ำตาลกลูโคสมากที่สุด รองลงมา คือ อะราบิโนส กาแลกโตส ไซโลส ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้กับงานวิจัยที่ผ่านมา เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำร้อนน่าจะมีโครงสร้างเป็นกาแลกโตอะราบิโนไซแลน (Galactoarabinoxylan) ที่มีกิ่งมาก ซึ่งจะเห็นได้จากสัดส่วนระหว่างอะราบิโนสต่อไซโลส (Ara/Xyl) ค่อนข้างสูง (WM=3.29, WH=2.61) นอกจากนี้แล้วอาจจะมีโครงสร้างเป็นกลูแคน (Glucan) ที่ต่อกันด้วยพันธะอัลฟา (α) หรือพันธะเบต้า-1,4 (β-1,4) และเบต้า-1,3 (β-1,3) (Xu et al., 2007; Ren and Sun, 2010; Peng et al., 2010) และอาจมีความเป็นไปได้ที่จะมีโครงสร้างเป็นแมนแนน (mannan) กาแลกโตแมนแนน (galactomannan) และกาแลกโตกลูโคแมนแนน (galactoglucomannan) อยู่ในปริมาณที่ไม่สูงมากนัก ซึ่งโดยปกติสามารถพบโครงสร้างเหล่านี้ได้ในเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำจากรำข้าว (Mod et al., 1978; Mod et al., 1979) เมื่อพิจารณาน้ำตาลชนิดที่เป็นกรดจะพบว่า WM และ WH มีน้ำตาลในกลุ่มนี้อยู่สูงกว่าที่พบในเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง โดยเฉพาะกรดกาแลกตูโรนิก ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่ได้รายงานว่า เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำจะมีเพกตินปนอยู่ด้วยแต่ในปริมาณที่ไม่สูงมากนัก (Sun et al., 2004; Xu et al., 2007; Ren and Sun, 2010; Peng et al., 2010)

เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่างจากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีน้ำตาลอะราบิโนสและไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก รองลงมาคือ กลูโคส กาแลกโตส และแรมโนส แต่ไม่พบแมนโนส (**ตารางที่ 5**) จากข้อมูลที่ได้และงานวิจัยที่ผ่านมานั้นเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่างน่าจะมีโครงสร้างเป็น อะราบิโนกลูคูโรโนไซแลน (arabino-glucuronoxylan) กลูคูโรโนอะราบิโนไซแลน (glucurono-arabinoxylan) อะราบิโนไซแลน (arabinoxylan) และสารประกอบเชิงซ้อนของไซแลน (complex heteroxylan) (Ren and Sun, 2010; Peng et al., 2010) เมื่อพิจารณาองค์ประกอบน้ำตาลของเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยด่างแล้วแยกด้วย DEAE-cellulose chromatography โดยการชะด้วยกรดฟอร์มิกที่ 2 ระดับความเข้มข้น พบว่าเฮมิเซลลูโลสที่มีความมีขั้วต่ำ (AM-neutral และ AH-neutral)มีปริมาณกรดกาแลกตูโรนิกและกลูโคนิกที่ต่ำ และมีสัดส่วนระหว่างอะราบิโนสต่อไซโลส (Ara/Xyl) ที่ต่ำกว่าเฮมิเซลลูโลสที่มีความมีขั้วสูงกว่า (AM-acid และ AH-acid) สัดส่วนระหว่างอะราบิโนสต่อไซโลสสามารถบอกถึงความเป็นสายตรงและสายกิ่งของโครงสร้างเฮมิเซลลูโลสได้ ถ้าโครงสร้างมี Ara/Xyl ต่ำ จะบอกถึงความเป็นโพลีเมอร์สายยาวที่มีสายกิ่งน้อย ในทางตรงกันข้ามหากโครงสร้างมี Ara/Xyl สูง จะเป็นโพลีเมอร์สายสั้น ที่มีกิ่งมาก (Ren and Sun, 2010; Peng et al., 2010) จากผลวิเคราะห์ที่ได้จึงกล่าวได้ว่า AM-neutral และ AH-neutral มีโครงสร้างที่เป็นโพลีเมอร์สายยาว ที่มีสายกิ่งน้อยกว่า AM-acid และ AH-acid หรือกล่าวได้อีกนัยหนึ่งว่าเฮมิเซลลูโลสที่มีขั้วสูงกว่าจะมีความเป็นกิ่งก้านมากกว่า อย่างไรก็ตามเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่างจะมี Ara/Xyl ต่ำกว่าที่สกัดด้วยน้ำร้อน จึงมีความเป็นกิ่งก้านน้อยกว่า ซึ่งสอดคล้องกับผลที่มีการรายงานไว้ (Mod et al., 1978; Xu et al., 2007: Peng et al., 2010)

ตารางที่ 5 ชนิดและปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลส*	น้ำตาล (%mol)								
	แรมโนส	อะราบิโนส	กาแลกโตส	กลูโคส	ไซโลส	แมนโนส	กรดกาแลกตูโรนิก	กรดกูโคนิก	อะราบิโนสต่อไซโลส
WM	4.49a** ± 0.91	20.22c ± 0.72	9.64a ± 0.83	49.02a ± 1.53	6.14b ± 1.15	1.52a ± 0.46	4.18a ± 0.32	1.40a ± 0.22	3.29
AM	0.27 ± 0.00	35.69 ± 1.55	6.88 ± 0.84	14.18 ± 1.59	34.89 ± 2.34	ไม่พบ	0.38 ± 0.08	2.69 ± 0.68	1.02
AM-neutral	1.54 ± 0.29	40.32 ± 2.07	5.52 ± 0.15	11.35 ± 1.17	40.08a ± 3.36	ไม่พบ	0.68c ± 0.09	0.84b ± 0.13	1.00
AM-acid	1.93 ± 0.48	45.46 ± 0.68	6.34 ± 0.08	9.60 ± 4.85	34.93a ± 5.46	ไม่พบ	0.84b ± 0.13	1.49a ± 0.15	1.30
WH	1.44 ± 0.10	21.13 ± 1.00	15.82 ± 0.40	49.59 ± 0.17	7.48 ± 0.48	0.75 ± 0.46	2.34 ± 0.02	1.44 ± 0.11	2.61
AH	0.75 ± 0.02	38.77 ± 0.51	9.62 ± 0.52	13.05 ± 2.10	34.98 ± 1.34	ไม่พบ	0.59 ± 0.09	2.23 ± 0.20	1.11
AH-neutral	0.60 ± 0.10	39.09 ± 0.42	10.14 ± 0.24	10.42 ± 0.18	37.12 ± 0.69	ไม่พบ	0.35 ± 0.08	2.27 ± 0.16	1.05
AH-acid	0.30 ± 0.11	43.12 ± 2.37	11.49 ± 0.61	4.61 ± 0.21	37.49 ± 1.86	ไม่พบ	0.85 ± 0.35	2.13 ± 0.56	1.15

*WH: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำร้อน จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105

AH: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105

AH-neutral: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 แล้วแยกด้วย DEAE โดยใช้ 0.005M formic acid เป็นสารชะ

AH-acid: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 แล้วแยกด้วย DEAE โดยใช้ 1M formic acid เป็นสารชะ *

WH: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำร้อน จากรำข้าวสีนิล

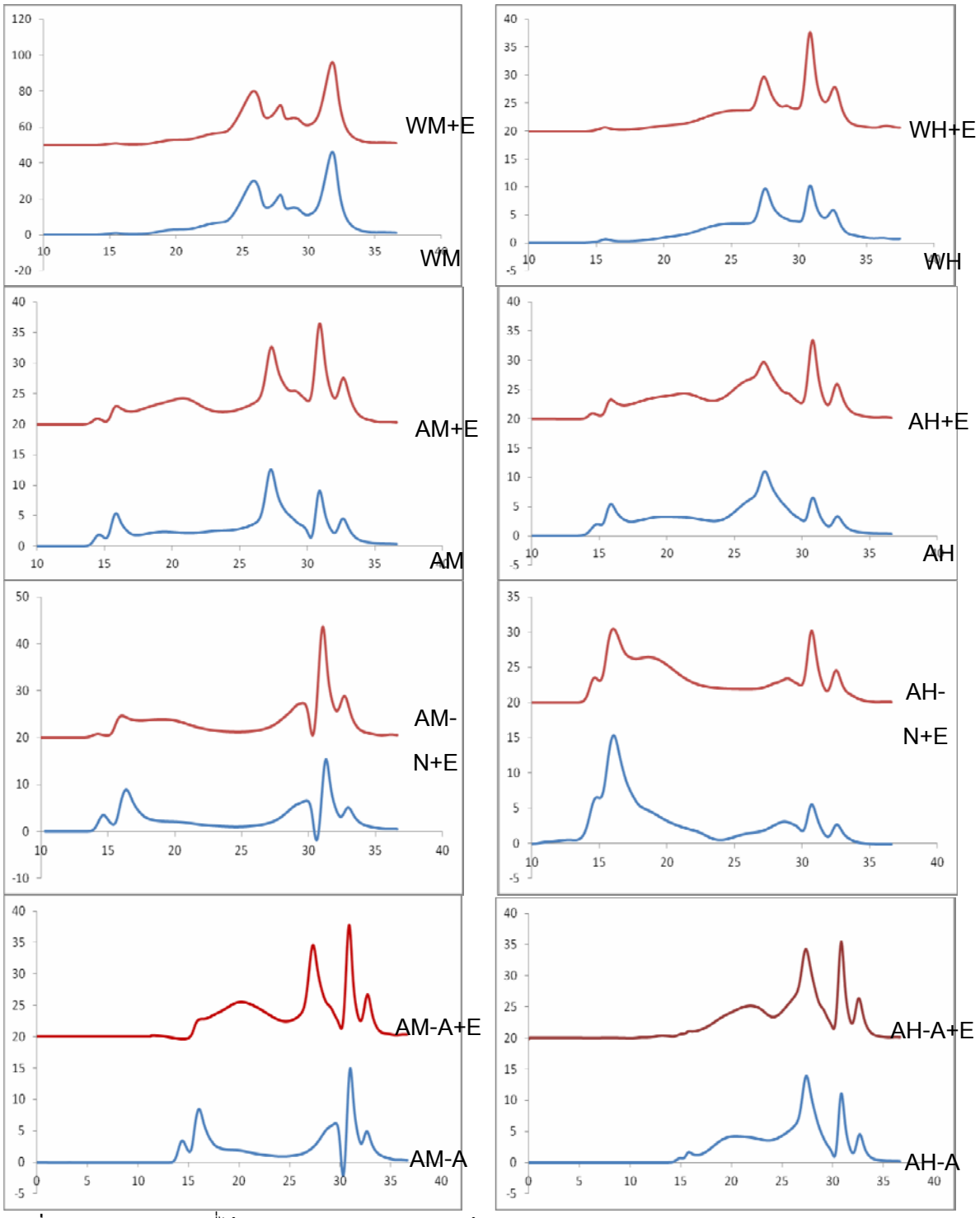
AH: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง จากรำข้าวสีนิล

AH-neutral: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง จากรำข้าวสีนิล แล้วแยกด้วย DEAE โดยใช้ 0.005M formic acid เป็นสารชะ

AH-acid: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง จากรำข้าวสีนิล แล้วแยกด้วย DEAE โดยใช้ 1M formic acid เป็นสารชะ

3.5. ผลของการย่อยด้วย endo-xylanase

จากการศึกษาชนิดและปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบทำให้ได้สมมติฐานโครงสร้างของเฮมิ-เซลลูโลสที่ได้จากการสกัดและแยกด้วยวิธีต่างๆ จากรำข้าวขาวดอกมะลิ และสีนิล เพื่อยืนยันสมมติฐานข้างต้นจึงได้มีการศึกษาการย่อยด้วย endo-1,4-β-D-xylanase (endo-xylanase) โดยใช้ high performance size exclusion chromatography (HPSEC) เปรียบเทียบลักษณะโครมาแกรมที่ได้ก่อนและหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ แสดงดัง**รูปที่** 4 พบว่าเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำร้อนจากรำข้าวทั้งสองพันธุ์ เมื่อผ่านการย่อยด้วย endo-xylanase โครมาโตแกรมที่ได้ไม่ต่างจากเดิม ซึ่งหมายถึงไม่มีโครงสร้างของไซโลสที่ต่อกันด้วยพันธะชนิดเบต้า-1,4 (β-1,4) ส่วนเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง แล้วแยกด้วยวิธีต่างๆ นั้น โครมาโตแกรมที่ได้มีลักษณะเปลี่ยนไปจากเดิม จึงน่าจะมีโครงสร้างสายหลักเป็นไซโลสที่ต่อกันด้วยพันธะชนิดเบต้า-1,4 (β-1,4) อย่างไรก็ตามเฮมิเซลลูโลสทั้งหมดไม่ได้ถูกย่อยด้วย endo-xylanase ซึ่งอาจหมายถึงประกอบไปด้วยโครงสร้างอื่น หรืออาจเกิดได้จากการที่เฮมิเซลลูโลสที่ได้จากรำข้าวทั้งสองมีโครงสร้างที่เป็นกิ่งก้านมาก ทำให้เกิดการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ การเข้าไปตัดพันธะของเอนไซม์จึงทำได้ยากขึ้น (Ren and Sun, 2010)



รูปที่ 4 chromatogram ที่ได้ก่อนและหลังการย่อย (+E) ด้วย endo-xylanase

WH: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำร้อน จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105

AH: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105

AH-N: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 แล้วแยกด้วย DEAE โดยใช้ 0.005M formic acid เป็นสารชะ

AH-A: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 แล้วแยกด้วย DEAE โดยใช้ 1M formic acid เป็นสารชะ

WH: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำร้อน จากรำข้าวสีนิล

AH: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง จากรำข้าวสีนิล

AH-N: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง จากรำข้าวสีนิล แล้วแยกด้วย DEAE โดยใช้ 0.005M formic acid เป็นสารชะ

AH-A: เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่าง จากรำข้าวสีนิล แล้วแยกด้วย DEAE โดยใช้ 1M formic acid เป็นสารชะ

4. **สรุปผลการทดลอง**

ปริมาณเฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้จากรำข้าวสีนิลมีปริมาณมากกว่ารำข้าวขาวดอกมะลิ (ในระดับการขัดสีที่เท่ากัน) สายพันธุ์ของข้าวจึงมีผลต่อปริมาณของเฮมิเซลลูโลส จากการสกัดเฮมิเซลลูโลสด้วยวิธีต่างๆ เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำร้อน มีปริมาณผลผลิตสุทธิน้อย มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก ($\overline{M}_w$) ค่อนข้างต่ำ มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบหลัก รองลงมาคือ อะราบิโนส กาแลกโตส แมนโนส ไซโลส และแรมโนสตามลำดับ และพบปริมาณน้ำตาลที่เป็นกรดในปริมาณมาก จึงน่าจะมีโครงสร้างเป็นอัลฟาหรือเบต้า-กลูแคน (α/β-glucan) กาแลกโตอะราบิโนไซแลน (Galactoarabinoxylan) และแมนแนน (mannan) ที่มีโครงสร้างโมเลกุลสายสั้น มีความเป็นกิ่งและมีขั้วมาก และอาจมีเพกทินปนอยู่ด้วย และไม่สามารถถูกย่อยได้ด้วย endo-xylanase เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่างจะมีปริมาณผลผลิตสุทธิมาก เมื่อนำมาแยกด้วย DEAE-52-cellulose chromatography ตามความมีขั้ว เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่างที่มีขั้วต่ำ (ชะด้วยกรดฟอร์มิก 0.005 โมลาร์; Neutral) มีปริมาณผลผลิตสุทธิน้อยกว่าที่มีขั้วสูง (ชะด้วยกรดฟอร์มิก 1 โมลาร์; Acid) เฮมิเซลลูโลสที่มีขั้วต่ำของรำข้าวทั้งสองพันธุ์มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก ($\overline{M}_w$) สูงกว่าที่มีขั้วสูง เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยสารละลายด่างมีน้ำตาลอะราบิโนสและไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก แต่มีสัดส่วนของน้ำตาลอะราบิโนสต่อไซโลส (Ara/Xyl) แตกต่างกัน จึงน่าจะมีโครงสร้างเป็นอะราบิโนไซแลนที่มีกิ่งก้านมาก และสามารถถูกย่อยได้ด้วย endo-xylanase จึงน่าจะมีโครงสร้างสายหลักที่เป็นไซแลนต่อกันด้วยพันธะชนิดเบต้า-1,4 (β-1,4)

รายการอ้างอิง

Mod, R. R., Conkerton, E. J., Ory, R. L., and F. L. Normand. 1987. Hemicellulose composition of dietary fiber of milled rice and rice bran. Agricultural and Food Chemistry 28: 1031-1035.

Mod,R. R., Conkerton, E. J., Ory, R. L., and F. L. Normand. 1979. Composition of water-soluble hemicelluloses in rice bran four growing areas. Cereal chemistry 56: 356-358

Peng, F., Ren, J. L., Xu, F., Bian, J., Peng, P. and Sun, R.C. 2010. Comparative studies on the physico- chemical properties of hemicelluloses obtained by DEAE-cellulose-52 chromatography from sugarcane bagasse. Food Research International 43: 683-693.

Ren, J. L. and Sun, R. C. 2010. Chapter 4 Hemicelluloses. Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels - Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose: 73-130

Sun, J.X., Sun, X.F., Sun, R.C. and Sua Y.Q. 2004. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. Carbohydrate Polymers 56: 195–204.

Xu, F., Sun, J.X., Geng, Z.C., Liu, C.F., Ren, J.L., Sun, R.C., Fowler, P. and Baird, M.S. 2007. Comparative study of water-soluble and alkali-soluble hemicelluloses from perennial ryegrass leaves (*Lolium peree*). Carbohydrate Polymers 67: 56–65.