รายงานการวิจัยเรื่อง

การเปรียบเทียบการสกัดไลโคปีนจากผลฟักข้าวด้วยการใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลายและการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤต

Comparative study of the lycopene of Gac (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng) Thai Provenance obtained by enzyme aided extraction and supercritical carbon dioxide methods

ดร. ฐิตา ฟูเผ่า
ดร. ฐิตินาถ สุคนเขตร์
นาย วีรชน ภูหินกอง
และคณะ

มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
2556
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555)

รายงานการวิจัยเรื่อง

การเปรียบเทียบการสกัดไลโคปีนจากผลฟักข้าวด้วยการใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลายและการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤต

Comparative study of the lycopene of Gac (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng) Thai Provenance obtained by enzyme aided extraction and supercritical carbon dioxide methods

ดร. ฐิตา ฟูเผ่า
(โรงเรียนการเรือน)
ดร. ฐิตินาถ สุคนเขตร์
(คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)
นายวีรชน ภูหินกอง
(คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)
และคณะ

มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555)

หัวข้อวิจัย การเปรียบเทียบการสกัดไลโคปีนจากผลฟักข้าวด้วยการใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลายและการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติ

ผู้ดำเนินการวิจัย ดร.ฐิตา ฟูเผ่า, ดร.ฐิตินาถ สุคนเขตร์, นายวีรชน ภูหินกอง, ดร.ศรินทิพ สุกใส (อานามนารถ) และนางสาวศจี น้อยตั้ง

ที่ปรึกษา รศ.ดร.อมร เพชรสม

หน่วยงาน หลักสูตรเทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร โรงเรียนการเรือน มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
ศูนย์เครื่องมือปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปี พ.ศ. 2556

สารไลโคปีนมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ และพบมากในผักและผลไม้ที่มีสีส้มแดง โดยเฉพาะในผลฟักข้าวสุก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของผลฟักข้าวสุก รวมทั้งศึกษาวิธีการสกัดสารไลโคปีนด้วยการใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลายและการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติ และทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัด พบว่า เนื้อผลและเยื่อหุ้มเมล็ดมีน้ำเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ ร้อยละ 90 และ 83.48 ตามลำดับ รองลงมาคือ คาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 54.81 และ 53.87 ส่วนไขมันพบมากที่เมล็ดและเยื่อหุ้มเมล็ด ร้อยละ 31.76 และ 11.20 และปริมาณไลโคปีนพบมากในเยื่อหุ้มเมล็ด ปริมาณ 925.75 μg/g (สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนอย่างเดียว) จากนั้นทำการศึกษาวิธีการสกัดไลโคปีนจากเยื่อหุ้มเมล็ด พบว่า เมื่อใช้เอนไซม์ pectinase ที่ความเข้มข้น 2%w/w ระยะเวลาในการย่อย 60 นาที ใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย ได้ปริมาณไลโคปีนสูงที่สุดถึง 2386.01 μg/g ซึ่งสูงกว่าการใช้เอทิลอะซิเตดเป็นตัวทำละลาย (1363.43 μg/g) สำหรับเทคนิคคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติ ที่ความดัน 1800 psi ใช้เวลา 10 นาที ได้ปริมาณสารไลโคปีนสูงสุด 1421.40 μg/g สำหรับเทคนิคการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติมีข้อดีที่ใช้เวลาในการสกัดน้อยกว่า แต่ใช้อุณหภูมิในการสกัดสูงกว่าเทคนิคการใช้เอนไซม์ แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคทั้งสองจะให้ปริมาณไลโคปีนที่ใกล้เคียงกัน เมื่อใช้เอทิลอะซิเตดเป็นตัวทำละลายในการสกัดด้วยเอนไซม์ ซึ่งเอทิลอะซิเตดจัดเป็นตัวทำละลายที่ปลอดภัยหากนำสารสกัดที่ได้มาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

Research Title Comparative study of the lycopene of Gac (Momordica *cochinchinensis* (Lour.) Spreng) Thai Provenance obtained by enzyme aided extraction and supercritical carbon dioxide methods

Researcher Dr.Tita Foophow, Dr.Thitinat Sukonket, Mr.Weerachon Phoohinkong, Dr.Sarintip Sooksai (Anamnart) and Ms. Sajee Noitang

Research Consultants Assoc.Prof. Amorn Petsom

Organization Food Processing Technology, School of Culinary Arts, Suan Dusit Rajabhat University

Suan Dusit Scientific Equipment Center, Faculty of Science and Technology, Suan Dusit Rajabhat University

The Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University

Year 2013

Lycopene is an effective antioxidant, which is responsible for red color of various kinds of fruits and vegetables such as tomato, watermelon and gac. In this study, the ripe gac fruit was determined in chemical composition and lycopene from gac aril was then extracted by using the enzyme aided extraction and supercritical carbon dioxide, SC-CO_2, methods. Pulp and aril of gac fruit were high in moisture (90 and 83.48%, respectively) and carbohydrate (54.81 and 53.87%, respectively). Fat was found in gac seed and aril, having an average value of 31.76 and 11.20%, respectively. For the enzyme aided extraction method, the highest lycopene yield (2386.01 μg/g of gac aril) was obtained with 2%pectinase treated sample at 60 min incubation time with hexane. For SC-CO_2 method, the suitable condition for lycopene extraction was obtained using the pressure at 1800 psi and 10 min, which gave highest in lycopene yield (1421.40 μg/g of gac aril). The lycopene yield of SC-CO_2 method was similar to that of enzymatic method with ethyl acetate (1363.43 μg/g of gac aril), which ethyl acetate is commonly used in food products. The extraction time of SC-CO_2 method was less than that of enzymatic method but, the extraction temperature of SC-CO_2 method was higher than that of enzymatic method. However, both methods can be used to extract lycopene from gac fruit and lycopene can be applied for use as a food additive by safety.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยเรื่องการเปรียบเทียบการสกัดไลโคปีนจากผลฟักข้าวด้วยการใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลายและการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤตสำเร็จลุล่วงได้ เนื่องจากบุคคลหลายท่านได้กรุณาช่วยเหลือให้ข้อมูล ข้อเสนอแนะ คำปรึกษาแนะนำ ความคิดเห็นและกำลังใจ ผู้เขียนขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม สำหรับคำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยในทุกด้าน ขอขอบพระคุณ ดร. ศรินทิพ สุกใส สำหรับแนวความคิดงานวิจัยและความช่วยเหลืออย่างอบอุ่นใจทุกครั้ง ตลอดจนตรวจแก้ไขรายละเอียด ต่าง ๆ ของงานวิจัยจนสำเร็จสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณทีมคณะผู้วิจัยทุกท่านที่ช่วยกันฟันฝ่าอุปสรรค หาทางแก้ไขปัญหาทุกอย่างที่เข้ามา จนสามารถทำงานวิจัยฉบับนี้จบลงได้อย่างสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิสำหรับประเมินงานวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้ได้รับทุน ท้ายสุดนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิตที่ช่วยส่งเสริมสนับสนุน กระตุ้นและให้ทุนอุดหนุนในการจัดทำงานวิจัยฉบับนี้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย
2556

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	
ความเป็นมาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
ขอบเขตการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
ฟักข้าว	3
ไลโคปีน	5
วิธีการสกัด	9
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
กรอบแนวคิดในการวิจัย	21
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
วัตถุดิบ	22
วัสดุอุปกรณ์	22
สารเคมี	22
วิธีการทดลอง	23
สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	30
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของผลฟักข้าว	31
การศึกษาวิธีการสกัดสารไลโคปีนจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว	36
การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของทั้งสองเทคนิค	49

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย 51
ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจับไปใช้ 51
ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป 52

บรรณานุกรม

บรรณานุกรมภาษาไทย 53
บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ 53

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี 58
ภาคผนวก ข การหาปริมาณไลโคปีนทั้งหมด 69
ภาคผนวก ค สเปคตรัม 72

ประวัติผู้วิจัย 77

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณค่าทางโภชนาการของผลอ่อนฟักข้าว	4
2.2	ปริมาณบีตาแคโรทีนและไลโคปีนในผลฟักข้าว	5
2.3	ปริมาณไลโคปีนในผักและผลไม้	7
2.4	ปริมาณไลโคปีนในมะเขือเทศและผลิตภัณฑ์มะเขือเทศ	8
4.1	คุณค่าทางโภชนาการของส่วนต่าง ๆ ของผลฟักข้าวสุก	33
4.2	ปริมาณไลโคปีนในส่วนต่าง ๆ ของผลฟักข้าวสุก	36
4.3	ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดด้วยเอนไซม์ cellulase ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	38
4.4	ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ pectinase ระดับต่าง ๆ	39
4.5	ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในการย่อยด้วยเอนไซม์ cellulase	40
4.6	ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในการย่อยด้วยเอนไซม์ pectinase	41
4.7	ปริมาณไลโคปีนที่สกัดได้ที่ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างชนิดกัน	44
4.8	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดของทั้งสองเทคนิค	49

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะของดอกฟักข้าวเพศผู้	3
2.2	ลักษณะของผลฟักข้าว	4
2.3	โครงสร้างทางเคมีของไลโคปีนชนิด *trans*-configuration ($C_{40}H_{56}$)	6
2.4	สูตรโครงสร้างของเพคติน	9
2.5	ลักษณะปฏิกิริยาที่ใช้เพคตินเอสเทอเรสเป็นตัวเร่ง	10
2.6	ลักษณะปฏิกิริยาที่ใช้พอลิกาแล็กทูโรเนสเป็นตัวเร่ง	11
2.7	ลักษณะปฏิกิริยาที่ใช้เพคเตตไลเอสเป็นตัวเร่ง	11
2.8	แผนภูมิแสดงความเกี่ยวข้องของเอนไซม์กลุ่มเพคติเนส	12
2.9	แผนภูมิการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลส	13
2.10	แผนผังวัฏภาค	14
2.11	กราฟแสดงแผนผังวัฏภาคของคาร์บอนไดออกไซด์	15
2.12	แสดงเทคนิคการสกัดสารด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤต	16
3.1	ผลฟักข้าวสุก	22
3.2	ขั้นตอนการสกัดไลโคปีนด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเฮกเซน	24
3.3	ขั้นตอนการสกัดไลโคปีนโดยแปรผันตามความเข้มข้นของเอนไซม์	25
3.4	ขั้นตอนการสกัดไลโคปีนโดยแปรผันตามเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์	26
3.5	ขั้นตอนการสกัดไลโคปีนโดยแปรผันตัวทำลายอินทรีย์	27
3.6	ขั้นตอนการสกัดไลโคปีนโดยแปรผันความดัน	28
3.7	ขั้นตอนการสกัดไลโคปีนโดยแปรผันปริมาณเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว	29
3.8	ชุดพาร์รีแอกเตอร์	30
4.1	ลักษณะของผลฟักข้าวสุก (A) เปลือก (B) เนื้อและเมล็ดฟักข้าว	31
4.2	ส่วนต่าง ๆ ของผลฟักข้าวสุก (A)เนื้อผล (B)เยื่อหุ้มเมล็ด (C)เมล็ดและ (D)เปลือก	32
4.3	ลักษณะการแยกชั้นในตัวทำละลายเอทานอลและเฮกเซนโดยใช้เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว	33
4.4	สารสกัดไลโคปีนในตัวทำละลายเฮกเซนโดย (A) เนื้อผลฟักข้าว (B) เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว	34
4.5	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานไลโคปีน	34
4.6	โครมาโทแกรมของสารสกัดไลโคปีนในส่วนของเนื้อผลฟักข้าว	35
4.7	โครมาโทแกรมของสารสกัดไลโคปีนในส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว	36
4.8	ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดด้วยเอนไซม์ cellulase ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	38
4.9	ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดด้วยเอนไซม์ pectinase ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	39
4.10	ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดด้วยเอนไซม์ cellulase ที่ระยะเวลาในการย่อยต่าง ๆ	40

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.11	ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดด้วยเอนไซม์ pectinase ที่ระยะเวลาในการย่อยต่าง ๆ	41
4.12	ลักษณะการละลายของไลโคปีนจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวในตัวทำละลาย (A) เฮกเซน (B) เอทานอล (C) เอทิลอะซิเตด (D) เอทิลแลกเตด	43
4.13	สารสกัดไลโคปีนจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวโดยใช้ตัวทำละลาย (A) เฮกเซน (B) เอทานอล (C) เอทิลอะซิเตด (D) เอทิลแลกเตด	43
4.14	ปริมาณสารไลโคปีนที่สกัดด้วยเอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ	44
4.15	ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและความดันของคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติ	45
4.16	ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติที่ความดันต่าง ๆ	46
4.17	ปริมาณสารไลโคปีนที่สกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติที่ความดันต่าง ๆ	47
4.18	ปริมาณสารไลโคปีนที่สกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติที่ปริมาณเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวต่าง ๆ	48
ก-1	ตัวอย่างหลังผ่านการอบหาปริมาณความชื้น	60
ก-2	ตัวอย่างที่ทำการสกัดไขมันโดยวิธี Soxhlet	62
ก-3	ตัวอย่างก่อนนำไปย่อยด้วยเครื่องย่อยแบบรวดเร็ว	64
ก-4	ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแล้วนำมาทำการกลั่นด้วยเครื่อง Distillation Unit	64
ก-5	การย่อยตัวอย่างก่อนเผาเพื่อหาปริมาณเส้นใยหยาบ	66
ก-6	การเผาตัวอย่างด้วยเครื่อง Muffle furnance	67
ข-1	กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานไลโคปีน	71
ค-1	สเปคตรัมของสารละลายมาตรฐานไลโคปีน	73
ค-2	สเปคตรัมของสารไลโคปีนที่ได้จากการสกัด	74
ค-3	สเปคตรัมของ β-carotene ที่ได้จากการสกัด	75

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

ฟักข้าวเป็นไม้เลื้อยที่ขึ้นเองตามธรรมชาติ โตเร็ว คนส่วนใหญ่นิยมนำส่วนยอดและผลอ่อนของฟักข้าวมาปรุงอาหารรับประทานกันในรูปแบบต่างๆ แต่ไม่นิยมรับประทานผลสุก จึงมักมีผลแก่เหลือเป็นจำนวนมาก ผลฟักข้าวสุกจะมีสีแดง เนื้อด้านในหนามีสีส้ม ภายในมีเยื่อสีแดงให้เมล็ดเกาะ ประเทศจีนได้มีการใช้เมล็ดแก่ของฟักข้าวเป็นยาบำบัดอาการอักเสบ กลากเกลื้อน ฝี แก้ท้องเสีย อาการผื่นคัน และโรคผิวหนังติดเชื้อต่าง ๆ ในประเทศไทยได้มีงานวิจัยของมหาวิทยาลัยมหิดล รายงานเกี่ยวกับสรรพคุณของเมล็ดฟักข้าว พบว่า มีโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อเอชไอวี-เอดส์ และยับยั้งเซลล์มะเร็ง และสำหรับงานวิจัยของต่างประเทศยังมีการรายงานถึงเยื่อหุ้มเมล็ดจากผลสุกของฟักข้าวว่ามีปริมาณสารไลโคปีน (lycopene) สูงกว่ามะเขือเทศสุกถึง 10 เท่า ซึ่งไลโคปีนเป็นรงควัตถุในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ (carotenoid) เป็นสารให้สีส้มถึงแดงในผักและผลไม้ สารไลโคปีนมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ (free radicals) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Rao & Rao, 2007) และสามารถป้องกันความเสี่ยงของโรคหลอดเลือดหัวใจและมะเร็ง โดยเฉพาะมะเร็งต่อมลูกหมาก แต่คนไทยโดยส่วนใหญ่ยังขาดความรู้ความเข้าใจในเรื่องคุณค่าทางโภชนาการของผลฟักข้าวสุก ทำให้นิยมรับประทานมะเขือเทศสุกเพื่อให้ได้รับสารไลโคปีน เนื่องจากในปัจจุบันมีรายงานการวิจัยที่ทำการศึกษาวิธีการสกัด การวิเคราะห์ และการนำสารไลโคปีนจากมะเขือเทศสุกไปใช้ประโยชน์อย่างมากมาย ทั้ง ๆ ที่ ผลฟักข้าวสุกซึ่งเป็นพืชพื้นบ้านของประเทศไทยนั้นให้ปริมาณสารไลโคปีนมากกว่า ดังนั้นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารไลโคปีนจากผลฟักข้าวจึงจำเป็นเป็นอย่างยิ่ง เพื่อยืนยันถึงคุณค่าทางโภชนาการของผลฟักข้าวสุก ทำให้คนไทยหันกลับมาบริโภคพืชพื้นบ้านที่หาได้ง่ายในประเทศไทย งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารไลโคปีนจากผลฟักข้าวมีค่อนข้างน้อยมาก ซึ่งรายงานการวิจัยในระดับนานาชาติที่มีอยู่มักใช้ผลฟักข้าวที่ปลูกในประเทศเวียดนามเป็นวัตถุดิบโดยส่วนใหญ่ ดังนั้นการศึกษาวิจัยการสกัดไลโคปีนจากผลฟักข้าวที่ปลูกในประเทศไทย รวมถึงการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ปริมาณสารไลโคปีนที่มีอยู่จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งเพื่อให้คนไทยและคนต่างชาติได้ทราบถึงคุณค่าทางโภชนาการของพืชพื้นบ้านในประเทศไทย และยังเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เป็นการเพิ่มมูลค่าผลฟักข้าวสุกให้สามารถใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหาร อาหารเสริม และทำให้ผู้บริโภคมีทางเลือกในการบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพเพิ่มขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของผลฟักข้าว
2. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดสารไลโคปีนจากผลฟักข้าว
3. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารไลโคปีนที่สกัดได้

4. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลายและการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤตในการสกัดสารไลโคปีนจากผลฟักข้าว

ขอบเขตการวิจัย

ตัวอย่างที่นำมาทำการทดลอง คือ ผลฟักข้าวสุก โดยใช้เนื้อด้านในที่มีสีส้ม และเยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีแดง จากนั้นทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี เช่น ความชื้น โปรตีน เถ้า ไขมัน เส้นใย และปริมาณสารไลโคปีน ศึกษาวิธีที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการสกัดสารไลโคปีน โดยทำการศึกษาเทคนิคการสกัดโดยใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลายและเทคนิคการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤต ซึ่งทั้งสองเทคนิคเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถพัฒนาต่อไปสู่ระบบเชิงปริมาณหรือขยายอัตราการผลิตในปริมาณมากได้ และทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพของสารไลโคปีนที่สกัดได้และสารชนิดอื่น ๆ ที่สกัดได้จากทั้งสองเทคนิค เพื่อสามารถนำสารไลโคปีนที่สกัดได้ไปใช้ประโยชน์เป็นอาหารเสริมหรือสารเติมแต่งในอาหาร (food additive) ซึ่งเป็นการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการและเพิ่มมูลค่าแก่ผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ

ตัวแปรที่ศึกษา

- ตัวแปรอิสระ

1. วิธีที่ใช้สกัดสารไลโคปีนจากผลฟักข้าวโดยการใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

2. วิธีที่ใช้สกัดสารไลโคปีนจากผลฟักข้าวโดยการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤตที่สภาวะต่างๆ

- ตัวแปรตาม คือปริมาณสารไลโคปีนและสารชนิดต่าง ๆ ที่สกัดได้

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย 12 เดือน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงคุณสมบัติทางเคมีและปริมาณสารไลโคปีนเบื้องต้นของผลฟักข้าวสุก

2. ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารไลโคปีนของเทคนิคการสกัดโดยใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลายและเทคนิคการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติ

3. ทราบถึงวิธีการสกัดที่เหมาะสม ได้สารไลโคปีนที่มีปริมาณมาก และปลอดภัย สามารถนำไปใช้ในอาหารได้

4. เพื่อเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ทางวิทยาศาสตร์และเพิ่มมูลค่าของผลผลิตทางการเกษตรที่เหลือทิ้ง

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ฟักข้าว

ฟักข้าว มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า **Momordica cochinchinensis** Spreng อยู่ในวงศ์ ***Cucurbitaceae*** ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกันกับกลุ่มของแตงกวาและมะระ เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในเขตภูมิอากาศร้อนโดยสามารถพบได้ในหลายประเทศ โดยเฉพาะในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยมีชื่อที่เรียกทั่วไป ได้แก่ ฟักข้าว (ไทย) Gac (เวียดนาม) Mak kao (ลาว) และ Moc Niet Tu (จีน) เป็นต้น ในประเทศไทยฟักข้าวเป็นพืชพื้นบ้านที่พบได้มากในจังหวัดต่าง ๆ

1. ลักษณะของฟักข้าว

ฟักข้าวเป็นไม้ที่มีเถาเลื้อย เป็นพืชประเภทล้มลุก ซึ่งมีลักษณะมือเกาะที่คล้ายกับตำลึง ใบจะเป็นใบเดี่ยวมีลักษณะคล้ายรูปหัวใจหรือรูปไข่ รวมทั้งคล้ายใบโพธิ์ มีความกว้างและยาวที่ใกล้เคียงกัน ประมาณ 6-15 เซนติเมตร ลักษณะขอบใบจะมีรอยหยักเว้าลึกเป็นแฉก 3-5 แฉก สำหรับดอกของฟักข้าวจะมีกลีบดอกสีขาวอมเหลืองคล้ายกับดอกตำลึง ลักษณะของก้านเกสรและกลีบละอองเกษรจะมีสีม่วงแกมดำ หรือน้ำตาลแกมม่วง และมีขนขึ้นบริเวณของใบเลี้ยงประดับ บริเวณข้อต่อระหว่างใบสามารถพอดอกของฟักข้าวได้ โดยจะพบหนึ่งดอกต่อข้อ ดังแสดงในภาพที่ 2.1 ลักษณะของดอกฟักข้าวจะมีทั้งดอกเพศผู้และดอกเพศเมีย ซึ่งเป็นดอกแบบเพศไม่สมบูรณ์ แยกกันอยู่คนละต้น ซึ่งดอกเพศผู้จะมี 5 กลีบ และมีสีขาวอมเหลือง และมีขนาดใหญกว่าดอกเพศเมีย

ภาพที่ 2.1 ลักษณะของดอกฟักข้าวเพศผู้
ที่มา: http://www.bansuanporpeang.com/node/2947

ผลของฟักข้าว เมื่อผลอ่อนจะมีเปลือกสีเขียวอมเหลือง และเมื่อผลสุกเปลือกจะเปลี่ยนเป็นสีแดง หรือส้มแดง ลักษณะของผลจะมีรูปร่างกลมรี มีหนามเล็ก ๆ อยู่โดยรอบผล ภายในผลจะมีเมล็ดสีดำขนาดใหญ่จำนวนมากเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบคล้ายกับเมล็ดของพืชพวกแตง และมีเยื่อสีแดงให้เมล็ดแต่ละเมล็ดเกาะอยู่ภายใน ส่วนเนื้อผลจะมีสีเหลือง ดังแสดงในภาพที่ 2.2 สำหรับการขยายพันธุ์ สามารถนำเมล็ดหรือรากของฟักข้าวไปใช้ในการขยายพันธุ์ได้ ซึ่งนิยมปลูกในพื้นที่ชุ่มน้ำ

เนื่องจากฟักข้าวเป็นพืชที่ต้องการน้ำมาก ดอกของฟักข้าวจะเริ่มออกหลังจากปลูกได้ประมาณ 2-3 เดือน ซึ่งโดยปกติเดือนพฤษภาคมจนถึงเดือนสิงหาคมฟักข้าวจะเริ่มออกดอก และเดือนกรกฎาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ เกษตรกรจะทำการเก็บเกี่ยวผล ซึ่งสามารถเก็บเกี่ยวผลได้มากถึง 30-60 ผลต่อต้น (สุธาทิพ ภมรประวัติ, 2550)

ภาพที่ 2.2 ลักษณะของผลฟักข้าว
ที่มา: http://springbittercucumber.blogspot.com/2012/04/blog-post_05.html

2. คุณค่าทางโภชนาการ

คนไทยนิยมรับประทานผลฟักข้าวที่ยังอ่อนอยู่เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมักนำมาลวกหรือต้มให้สุกแล้วรับประทานพร้อมกับน้ำพริก หรืออาจนำไปปรุงเป็นแกงได้ ซึ่งฟักข้าวจะให้รสชาติที่คล้ายกับมะละกอ ลักษณะของผลฟักข้าวอ่อนจะมีเปลือกสีเขียว เนื้อด้านในสีขาว ดังแสดงในภาพที่ 2.2 สำหรับคนในประเทศเวียดนามนิยมนำเยื่อเมล็ดฟักข้าวสุกที่มีสีแดงมาหุงกับข้าว ทำให้ข้าวที่ได้กลายเป็นสีส้มออกแดง ซึ่งข้าวที่มีสีแดงจากผลฟักข้าวสุกที่ได้นี้ คนเวียดนามมีความเชื่อว่าจะสามารถช่วยบำรุงสายตาได้ ในปัจจุบันได้มีการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการด้านต่าง ๆ ของผลฟักข้าวอ่อน ซึ่งได้ผลดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 คุณค่าทางโภชนาการของผลอ่อนฟักข้าว

100 กรัม น้ำหนักสัดส่วนที่กินได้	กรัม				มิลลิกรัม			
	มวลแห้ง	ใยอาหาร	น้ำตาล	โปรตีน	วิตามินซี	บีตาแคโรทีน	แคลเซียม	เหล็ก
ผลอ่อนฟักข้าว	7	1.03	1.8	0.94	0.04	91	23	0.34

ที่มา: สุธาทิพ ภมรประวัติ, 2550

จากตารางจะพบว่า ในผลอ่อนฟักข้าวจะมีคุณค่าทางโภชนาการที่สำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบีตาแคโรทีนซึ่งมีถึง 91 มิลลิกรัมต่อผลอ่อนฟักข้าว 100 กรัม แต่เมื่อพิจารณาถึงเยื่อเมล็ดฟักข้าวสุกที่มีสีแดงจะมีปริมาณบีตาแคโรทีนและไลโคปีนมากกว่าในผลอ่อนฟักข้าว ดังแสดงในตารางที่ 2.2 ซึ่งสีแดงของเยื่อเมล็ดฟักข้าวสุกจะอุดมไปด้วยบีตาแคโรทีนและไลโคปีน ซึ่งสารเหล่านี้เป็นรงควัตถุที่ให้สีแดงในผักและผลไม้โดยทั่วไป

ตารางที่ 2.2 ปริมาณบีตาแคโรทีนและไลโคปีนในผลฟักข้าว

ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักผล	เนื้อผล	เยื่อเมล็ด
บีตาแคโรทีน	22.1	101
ไลโคปีน	0.9	380

ที่มา: Aoki et al., 2002

ในหลายประเทศได้มีการศึกษาฤทธิ์ในการบำบัดรักษาโรคของฟักข้าว ซึ่งประโยชน์ในการรักษาโรคมีด้วยกันหลายด้าน โดยจะขึ้นอยู่กับการนำส่วนใดของฟักข้าวมาทำการศึกษา งานวิจัยในประเทศจีนพบว่าโปรตีนจากเมล็ดฟักข้าวจะมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ตับในห้องปฏิบัติการทดลอง ซึ่งเชื่อว่าเป็นส่วนหนึ่งของฤทธิ์ทางชีวภาพของเมล็ดฟักข้าว งานวิจัยในประเทศเวียดนาม พบว่า น้ำมันจากเยื่อเมล็ดฟักข้าวมีประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งตับ และงานวิจัยในประเทศไทยของมหาวิทยาลัยมหิดล พบว่าโปรตีนในเมล็ดฟักข้าวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อเอชไอวี-เอดส์ และยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งงานวิจัยนี้ได้มีการจดสิทธิบัตรในประเทศไทยเป็นที่เรียบร้อยแล้ว และอาจนำไปใช้พัฒนาในด้านเภสัชภัณฑ์ในอนาคตได้ (สุธาทิพ ภมรประวัติ, 2550)

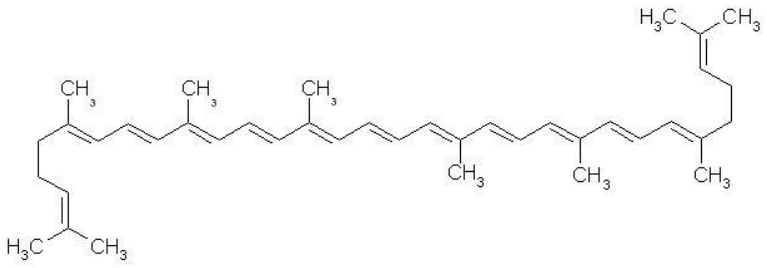
ไลโคปีน (Lycopene)

ไลโคปีนเป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoid) พบมากในผักและผลไม้ที่มีสีแดง เช่น มะเขือเทศสุก แตงโม มะละกอ ฟักข้าว และพืชจำพวกส้ม ยกเว้นสตอเบอรี่และเชอรี่ ชื่อที่ได้มีรากศัพท์มาจากภาษาละตินคำว่า lycopersicum ซึ่งเป็นชื่อวิทยาศาสตร์บ่งบอกสปีชีส์ของมะเขือเทศ *Solanum lycopersicum* ไลโคปีนเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เนื่องจากไลโคปีนมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ (free radicals) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถป้องกันความเสี่ยงของโรคหลอดเลือดหัวใจและมะเร็ง โดยเฉพาะมะเร็งต่อมลูกหมาก แต่เนื่องจากร่างกายมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ไลโคปีนเองได้ ดังนั้นเราจึงจำเป็นต้องได้รับจากการบริโภคเข้าไป (Zuknik et al., 2012)

1. โครงสร้างและลักษณะ

ไลโคปีนเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดไม่อิ่มตัว ไม่มีขั้ว ลักษณะเป็นผลึกสีแดง มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{40}H_{56}$ และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 536.9 ลักษณะโครงสร้างของไลโคปีนจะเป็นสารในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ชนิดไม่เป็นวง (acyclic carotenoid) ประกอบด้วย 11 conjugated และ 2

unconjugated double bonds ดังแสดงในภาพที่ 2.3 ลักษณะของไลโคปีนในธรรมชาติจะอยู่ในรูป *trans*-isomer แต่สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็น *cis*-isomer ได้ (Topal et al., 2006) โดยปกติพันธะคู่ทั้งหมดของโครงสร้างในไลโคปีนจะอยู่ในรูป *trans*-isomer ในสภาพธรรมชาติ แต่สามารถเปลี่ยนเป็น *cis*-isomer ได้เมื่อผ่านกระบวนการผลิต โดยได้รับความร้อน และออกซิเจน ซึ่งไลโคปีนในรูป *cis*-isomer จะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ดีกว่า และมีความสามารถในการละลายและรวมตัวกับกรดน้ำดีได้ดีกว่า *trans*-from ส่งผลทำให้ร่างกายจะสามารถได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ(antioxidant) ได้มาก ไลโคปีนในรูปของ *cis*-isomer จะมีจุดหลอมเหลวและความเข้มของสีต่ำกว่าไลโคปีนในรูป *trans*-isomer และมีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่นสีแดงที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของไลโคปีนชนิด *trans*-configuration ($C_{40}H_{56}$)
ที่มา: http://www.lycocard.com/index.php/lyco_pub/health/

2. คุณสมบัติ

ไลโคปีนเป็นสารที่สามารถละลายได้ในน้ำมันและตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้วบางชนิดได้ เช่น เบนซีน คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน แต่ไม่ละลายในน้ำ การเคลื่อนไหวของอิเล็กตรอนภายในโครงสร้างของไลโคปีนซึ่งประกอบด้วยพันธะคู่ของคาร์บอนคอนจูเกต 11 พันธะ จะส่งผลต่อการถูกย่อยสลายด้วยแสง ออกซิเจน และความร้อนได้ง่าย โดยการเกิดปฏิกิริยาโพลีเมอร์ไรเซชัน (polymerization) และการถูกย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation degradation) (Ishida & Chapman, 2009)

ไลโคปีนเป็นรงควัตถุในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ที่ให้สีแดง ซึ่งจะมีการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของโครงสร้างและตัวทำละลาย เช่น เมื่อใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ไลโคปีนจะมีค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 443, 472 และ 502 นาโนเมตร ได้สูงที่สุด เมื่อใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลาย ไลโคปีนจะมีค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 446, 475 และ 506 นาโนเมตร ได้สูงที่สุด (Goodwin, 1967) และเมื่อใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย ไลโคปีนจะมีค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 445, 472 และ 503 นาโนเมตร ได้สูงที่สุด (Sharma & Maguer, 1996) เป็นต้น ดังนั้นการแปรรูปหรือวิธีการสกัดจึงมีผลต่อโครงสร้างของไลโคปีน

โครงสร้างทางเคมีของสารไลโคปีนเป็นพันธะคู่สลับกับพันธะเดี่ยว ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้อย่างดี (Takeoka et al., 2001) ซึ่งการเป็นสารต้านออกซิเดชันจะเป็นสารที่ช่วยในการยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ส่งผลทำให้อายุของผลิตภัณฑ์หรือสารที่มีอนุมูลอิสระสามารถเก็บรักษาได้ยาวขึ้น

เนื่องจากอนุมูลอิสระที่มีประจุบวกจะมีความคงตัวมากขึ้น นอกจากนั้นยังสามารถช่วยยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ซึ่งอนุมูลอิสระเป็นสารที่ทำให้เกิดการเสื่อมคุณภาพของอาหารบางชนิดและโรคต่าง ๆ ได้ ไลโคปีนสามารถพบได้ในอาหารโดยทั่วไปและไม่เป็นพิษต่อผู้บริโภค แต่ถ้ามีการรับประทานมากเกินไปจะทำให้ร่างกายมีระดับของสารไลโคปีนสูงในเลือด และก่อให้เกิดสีส้มเหลืองขึ้นที่บริเวณผิวหนังและตับ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อลดปริมาณการรับประทานสารไลโคปีนลง สีผิวและปริมาณไลโคปีนในร่างกายจะกลับมาสู่ภาวะปกติ ซึ่งการเปลี่ยนสีนี้จะเรียกว่า Lycopenodermia ซึ่งไม่ส่งผลความเป็นพิษต่อร่างกาย (Institue of Medicine, 2000)

3. แหล่งที่พบ

ไลโคปีนพบได้มากในผักและผลไม้ที่มีสีแดง ได้แก่ มะเขือเทศ แตงโม มะละกอสุก ฝรั่งสีแดง และเกรปฟรุตสีชมพู เป็นต้น ปริมาณไลโคปีนของผักและผลไม้ชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.3 (Zuknik et al., 2012) ซึ่งเมื่อผักและผลไม้เหล่านี้ผ่านกระบวนการหรือทำให้สุกด้วยความร้อนจะมีปริมารไลโคปีนเพิ่มมากขึ้น โดยมะเขือเทศสุกเละ ๆ จะมีไลโคปีนมากกว่ามะเขือเทศสุก รวมถึงปริมาณไลโคปีนในมะเขือเทศและผลิตภัณฑ์มะเขือเทศดังแสดงในตารางที่ 2.4 โดยปกติในมะเขือเทศสุกมีสารไลโคปีนมากกว่าผักและผลไม้ชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกันถึงสองเท่า ดังนั้นจึงมีการสกัดสารไลโคปีนจากมะเขือเทศสุก และนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหารและอาหารเสริมอย่างมากมาย แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่าฟักข้าวมีปริมาณสารไลโคปีนสูงกว่ามะเขือเทศสุกถึง 10 เท่า (Aoki et al., 2002) ฟักข้าวจึงเป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจที่จะนำมาสกัดสารไลโคปีนที่ดีกว่ามะเขือเทศ

ตารางที่ 2.3 ปริมาณไลโคปีนในผักและผลไม้

ชนิดของผักและผลไม้	ปริมาณไลโคปีน ไมโครกรัมต่อน้ำหนัก 1 กรัม
มะเขือเทศสด	8.8-42.0
แตงโม	23.0-72.0
ฝรั่งสีแดง	54.0
เกรปฟรุตสีชมพู	33.6
มะละกอ	20.0-53.0
แอปริคอต	<0.1

ที่มา: Zuknik et al., 2012

ตารางที่ 2.4 ปริมาณไลโคปีนในมะเขือเทศและผลิตภัณฑ์มะเขือเทศ

ผลิตภัณฑ์จากมะเขือเทศ	ปริมาณไลโคปีน ไมโครกรัมต่อน้ำหนัก 1 กรัม
มะเขือเทศสด	8.8-42.0
มะเขือเทศปรุงสุก	37.0
ซอสมะเขือเทศ (Tomato sauce)	62.0
ซุปมะเขือเทศเข้มข้น	79.9
น้ำมะเขือเทศ	50.0-116.0
ซอสพิซซ่า	127.1
ซอสมะเขือเทศ (Tomato ketchup)	99.0-134.4
มะเขือเทศผง	1126.3-1264.9
ผลิตภัณฑ์มะเขือเทศเข้มข้น	54.0-1500.0

ที่มา: http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/thai/knowledgeinfo.php?id=1

วิธีการสกัดสาร

วิธีการสกัดสารจากพืชนั้นมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด สมบัติของสารในพืชที่จะมีความคงตัวต่อความร้อนมากน้อยเพียงใด และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ ทั้งนี้แต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการเลือกเทคนิคในการสกัดสารโดยพิจารณาจากเวลาที่ใช้สกัดเนื่องจากไลโคปีนสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้เมื่อสัมผัสแสงและออกซิเจนเป็นเวลานาน ดังนั้นวิธีการสกัดจะต้องเป็นวิธีที่สามารถสกัดสารได้อย่างรวดเร็ว วิธีการสกัดที่เลือกมีด้วยกัน 2 วิธี คือ 1) การสกัดด้วยการใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลาย เป็นวิธีการสกัดที่ทำได้ง่าย สะดวก ได้ผลเร็ว และมีราคาถูก 2) การสกัดด้วยการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤต เป็นวิธีการสกัดที่ทำได้รวดเร็ว ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภคเนื่องจากไม่มีตัวทำละลายตกค้างในผลิตภัณฑ์ รายละเอียดของวิธีการสกัดทั้ง 2 วิธี ดังต่อไปนี้

1. การสกัดด้วยการใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลาย

วิธีการสกัดสารจากผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ โดยทั่วไปเรามักใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) ซึ่งเป็นวิธีทำสารให้บริสุทธิ์หรือเป็นวิธีแยกสารออกจากของผสมโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม หลักการในการเลือกตัวทำละลายให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการแยก คือ ตัวทำละลายที่ดีจะต้องสามารถละลายและไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด ไม่ละลายสารอื่น ๆ ที่เราไม่ต้องการ สามารถแยกออกจากสารที่เราต้องการสกัดได้ง่าย รวมทั้งไม่เป็นพิษ และมีราคาถูก และสำหรับหลักการสกัดด้วยตัวทำละลาย คือ เติมตัวทำละลายที่เหมาะสมลงในตัวอย่างที่เราต้องการสกัด จากนั้นก็เขย่าแรง ๆ หรือนำไปต้ม เพื่อให้สารที่เราต้องการจะสกัดละลายในตัวทำละลายที่เราเลือกไว้ สารที่เราสกัดได้นั้น ยังเป็นสารละลายอยู่ ถ้าเราต้องการทำให้บริสุทธิ์เราควรจะนำสารที่ได้ไปแยกตัวทำละลายออกมาก่อน อาจจะนำไประเหย หรือนำไปกลั่นต่อไป

ในปัจจุบันการสกัดสารจากผลหรือใบของพืช เรามักมีการใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลาย เนื่องจากสารที่เราต้องการมักพบมากบริเวณเส้นใยส่วนต่าง ๆ ของพืช ซึ่งถ้าเราสกัดด้วยตัวทำละลายเพียงอย่างเดียว สารที่ต้องการจะมีปริมาณน้อย ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในเชิงปริมาณของสารสกัด เราจะทำการเลือกเอนไซม์ที่สามารถย่อยเซลลูโลสและส่วนประกอบอื่น ๆ ของผนังเซลล์ของพืชได้ ทำให้สารที่เราต้องการสกัดสามารถละลายออกมาในตัวทำละลายได้เพิ่มมากขึ้น และง่ายต่อการสกัด เทคนิคนี้มีใช้กันเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะการสกัดสารจากพืชสมุนไพร เอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดมีด้วยกันหลายชนิด ดังนี้

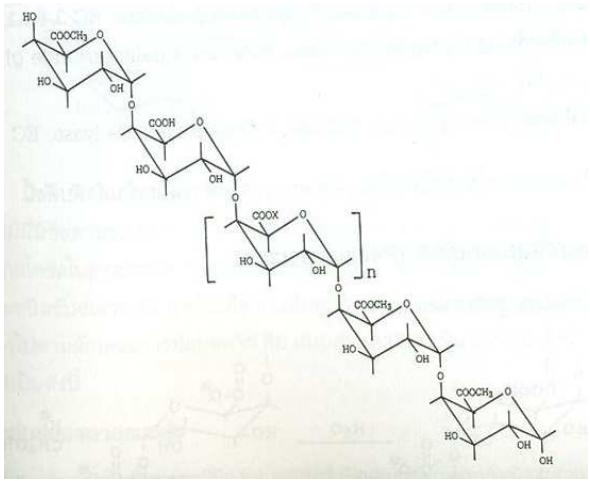
1.1 เอนไซม์เพคติเนส (Pectinase) (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547)

สับสเตรทของเอนไซม์เพคติเนส ได้แก่ เพคตินและอนุพันธ์ของพอลิเมอร์ของ α-1,4-D-galacturonopyranose units ซึ่งสามารถพบในผนังเซลล์ของพืชชั้นสูงและชั้นระหว่างเซลล์ของพืช ทำหน้าที่ช่วยเพิ่มความคงตัวของเนื้อสัมผัสในผักและผลไม้ ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายประเภทดังนี้

1) สารประเภทเพคติน สามารถพบได้ในผลไม้ทุกระยะตั้งแต่ผลอ่อนจนถึงผลสุก ซึ่งเพคตินเป็นคอลลอยด์ของคาร์โบไฮเดรตประกอบด้วย anhydrogalacturonic acid units และอนุพันธ์ ได้แก่ โปรโทเพคทิน เพคติน กรดเพคติน และกรดเพคตินิก

2) โปรโทเพคติน (Protopectin) สามารถพบได้ในผลไม้ดิบ เป็นสารเพคตินที่ไม่ละลายน้ำ

3) เพคติน (Pectin) เป็นสารประเภทเพคตินที่มีหมู่คาร์บอกซิล ซึ่งหมู่คาร์บอกซิลที่มีอยู่ประมาณร้อยละ 75 จะถูกเติมด้วยเมทานอล และกลายเป็นสารในกลุ่มของเอสเทอร์ ดังแสดงในภาพที่ 2.4 เพคตินมักถูกใช้ในการทำแยมและเยลลี่ เนื่องจากคุณสมบัติที่สามารถเกิดเจลระหว่างน้ำตาลกับกรดได้ดี เพคตินสามารถพบในผลไม้ในระยะสุกจนสุกงอม ซึ่งเกิดจากเอนไซม์โปรโทเพคติเนสย่อยโปรโทเพคติน และเมื่อพันธะเอสเทอร์และพันธะไกลโคซิลของเพคตินถูกย่อยสลายจะได้ผลผลิต (product) เป็นกรดเพคตินและกรดเพคตินิก



ภาพที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของเพคติน

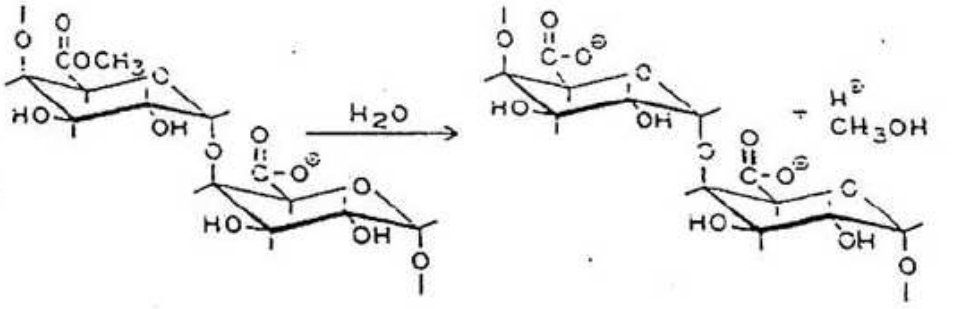
ที่มา: ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547

4) กรดเพคติก (Pectic acid) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหมู่คาร์บอซิลอิสระของ anhydrogalacturonic acid units

5) กรดเพคตินิก (Pectinic acid) เป็นสารเพคตินที่มีหมู่เมทิลเอสเตอร์อยู่เล็กน้อย

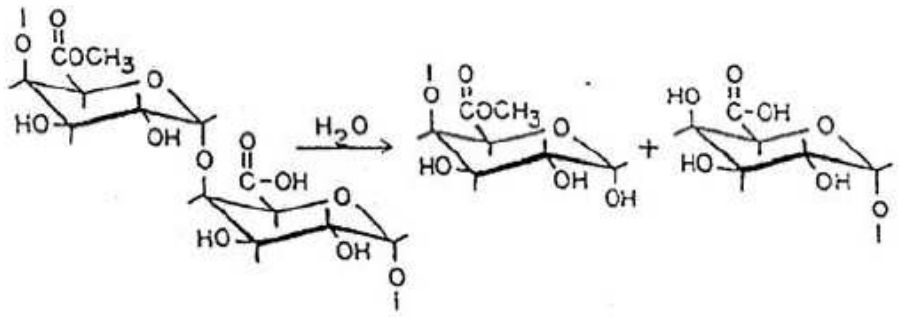
เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในย่อยสารประเภทเพคตินคือเอนไซม์เพคติเนส ซึ่งสามารถพบได้ที่เดียวกับสารประเภทเพคตินในพืชชั้นสูง แต่พบในเซลล์คนละส่วนกัน แต่เมื่อเซลล์ในพืชเกิดการฉีกขาดหรือมีการบอบช้ำโดยกระแทก จะส่งผลให้เอนไซม์และเพคตินเคลื่อนมาพบกันทำให้เอนไซม์เพคติเนสสามารถจับกับเพคตินได้ ส่งผลให้เพคตินเกิดการย่อยสลาย ลักษณะเนื้อสัมผัสของผักและผลไม้จะเสียและนิ่มลง เอนไซม์เพคติเนสได้มีการถูกสกัดออกมาจุลินทรีย์เพื่อใช้ทางการค้าอย่างมากมายในปัจจุบัน แต่ไม่นิยมสกัดจากพืชเนื่องจากได้ปริมาณน้อย ประเภทของเอนไซม์เพคติเนสสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ดังนี้

1) เพคตินเอสเทอเรส (Pectinesterase, EC 3.1.1.11) หรือที่มีชื่อสามัญ ได้แก่ เพคโทไลเปส (pectolipase), เพคติน เมทิลเอสเทอเรส (pectin methylesterase), เพคติน ดีเม ทอกซิเลส (pectin demethoxylase) เพคติน เมทอกซิเลส (pectin methoxylase) และเพคเตส (pectase) เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ที่มีน้ำในปฏิกิริยา ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการแยกหมู่เมทิลจากสารประเภทเพคตินที่มีการเติมหมู่เมทิลที่คาร์บอกซิล ดังแสดงในภาพที่ 2.5 ซึ่งจะไม่ย่อยสลายพันธะไกลโคซิล



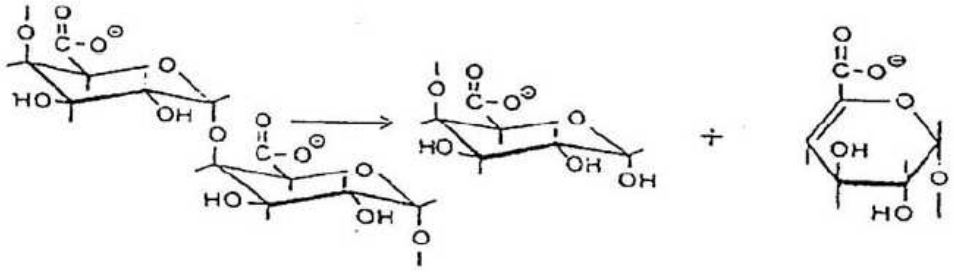
ภาพที่ 2.5 ลักษณะปฏิกิริยาที่ใช้เพคตินเอสเทอเรสเป็นตัวเร่ง
ที่มา: มลนพรรษ สงพิมพ์, 2551

2) พอลิกาแล็กทูโรเนส (Polygalacturonase, EC 3.2.1.15) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส เช่นเดียวกับเพคตินเอสเทอเรส แต่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายพันธะไกลโคซิลในสารประเภทเพคติน ดังแสดงในภาพที่ 2.6 pH ที่เอนไซม์ทำงานได้ดีอยู่ที่ประมาณ 4.5-6.0 ลักษณะการย่อยสลายแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ การย่อยสลายแบบสุ่มและแบบเป็นระเบียบ ซึ่งการย่อยแบบสุ่มจะเกิดขึ้นภายในสายพอลิเมอร์ (endo splitting) ส่วนการย่อยแบบเป็นระเบียบจะเกิดขึ้นจากปลายสายพอลิเมอร์ (exo splitting)



ภาพที่ 2.6 ลักษณะปฏิกิริยาที่ใช้พอลิกาแล็กทูโรเนสเป็นตัวเร่ง
ที่มา: มลนพรรษ สงพิมพ์, 2551

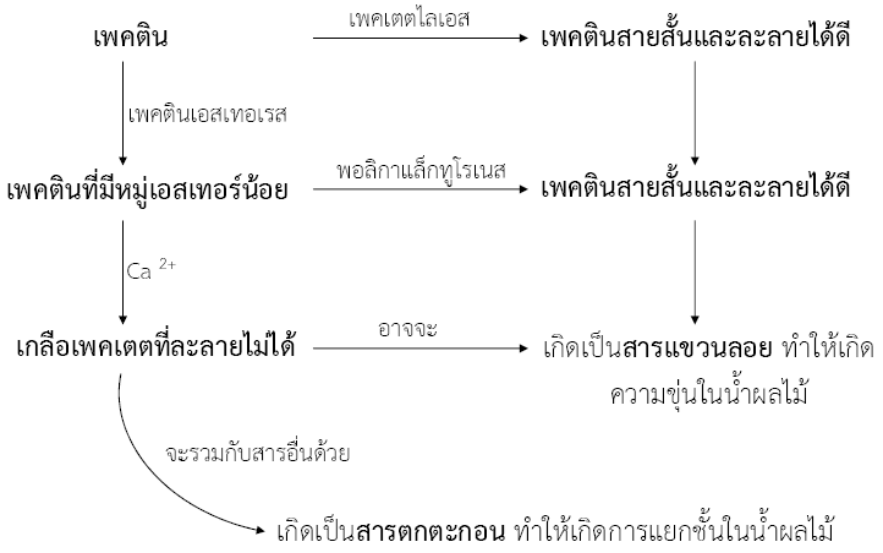
3) เพคเตตไลเอส (Pectate lyases, EC 4.2.2.2) เป็นเอนไซมที่อยู่ในกลุ่มของไลเอส ซึ่งจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะไกลโคซิลในเพคตินหรือกรดเพคติน แต่ไม่มีน้ำมาช่วยในการเร่งปฏิกิริยา และได้ผลผลิตเป็นสารพอลิเมอร์สายสั้นที่สายหนึ่งมีปลายรีดิวซ์ และอีกสายเป็นพอลิเมอร์ที่มีพันธะคู่ ดังแสดงในภาพที่ 2.7 เอนไซม์ชนิดนี้พบได้ทั่วไปในจุลินทรีย์ แต่ไม่พบในพืชชั้นสูง pH ที่เอนไซม์ทำงานได้ดีอยู่ที่ประมาณ 8.5-9.5 และต้องการ cofactor เป็น Ca^{2+} เพื่อช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์



ภาพที่ 2.7 ลักษณะปฏิกิริยาที่ใช้เพคเตตไลเอสเป็นตัวเร่ง
ที่มา: มลนพรรษ สงพิมพ์, 2551

ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์กลุ่มเพคติเนสแต่ละประเภท ดังแสดงในภาพที่ 2.8 สำหรับการใช้ประโยชน์ของเอนไซม์เพคติเนสในอุตสาหกรรมอาหาร ในปัจจุบันทางการค้าจะทำการผลิตเอนไซม์ที่เป็นส่วนผสมของเอนไซม์เพคติเนสทั้ง 3 ประเภท รวมทั้งและยังมีส่วนผสมของเอนไซม์ชนิดอื่นอยู่ด้วย ซึ่งจะขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ที่ต้องการ เอนไซม์ชนิดอื่นที่มีการเติมลงไป ได้แก่ เอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส อะไมเลส และโปรติเอส เป็นต้น ส่วนบริษัทที่มีการผลิตเอนไซม์มีด้วยกันหลายบริษัท ได้แก่ Ciba-Geigy AG แห่ง Basle ประเทศสวิตเซอร์แลนด์, Rohm GmbH ประเทศเยอรมนี และ NOVO ประเทศเดนมาร์ก เป็นต้น สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการใช้เอนไซม์เพคติเนสในอุตสาหกรรม ได้แก่ การสกัดน้ำผลไม้ เช่น แอปเปิ้ล สตรอเบอร์รี่ ราสเบอร์รี่ กล้วย มะม่วง มะละกอ เป็นต้น ซึ่งวัตถุประสงค์ที่ใช้เอนไซม์ เนื่องด้วยต้องการสีและกลิ่นรสธรรมชาติของผลไม้ชนิดต่าง ๆ ให้ยังคงมีอยู่ในผลิตภัณฑ์ และยังมีการใช้เพคติเนสเพื่อทำให้น้ำผลไม้ใส ซึ่งคาร์โบไฮเดรต และ

เพคตินเป็นสารที่ก่อให้เกิดความขุ่นในน้ำผลไม้ เช่น น้ำแอปเปิ้ล ส่งผลให้น้ำผลไม้ที่ได้ใสไม่มีตะกอน ซึ่งการใช้เอนไซม์จะเหมาะสำหรับผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่ต้องการกลิ่นและรส แต่ไม่ต้องการความขุ่นเนื่องจากเนื้อของผลไม้ นอกจากนั้นยังมีการใช้เพคติเนสเพื่อทำน้ำมันหรือการเพิ่มปริมาณน้ำในกระบวนการสกัดน้ำมัน เช่น น้ำมันปาล์ม และน้ำมันงา เป็นต้น



ภาพที่ 2.8 แผนภูมิแสดงความเกี่ยวข้องของเอนไซม์กลุ่มเพคติเนส
ที่มา: ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547

1.2 เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547)

สับสเตรทของเอนไซม์เซลลูเลส คือเซลลูโลส ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุดในธรรมชาติชนิดหนึ่ง เป็นพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้น้อยมาก เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลส คือ เซลลูเลส ซึ่งมักเป็นเอนไซม์ที่มีส่วนผสมของเอนไซม์หลายชนิดร่วมทำงานด้วยกัน ได้แก่

1) เอนไซม์ C_1 หรือ hydrogen bondase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลส โดยทำให้พันธะไฮโดรเจนอ่อนลง โดยมีการย่อยสลายภายในสายเซลลูโลสแบบสุ่ม เพื่อให้ได้เป็นเซลลูโลสที่ยืดหยุ่นลงเหมาะสำหรับสับสเตรทของเซลลูเลสลำดับต่อไป คือ เอนไซม์ C_x, กลูคาเนส อย่างไรก็ตามยังไม่มีงานวิจัยใดระบุถึงการย่อยสลายพันธะไกลโคซิลเกิดขึ้นในปฏิกิริยา

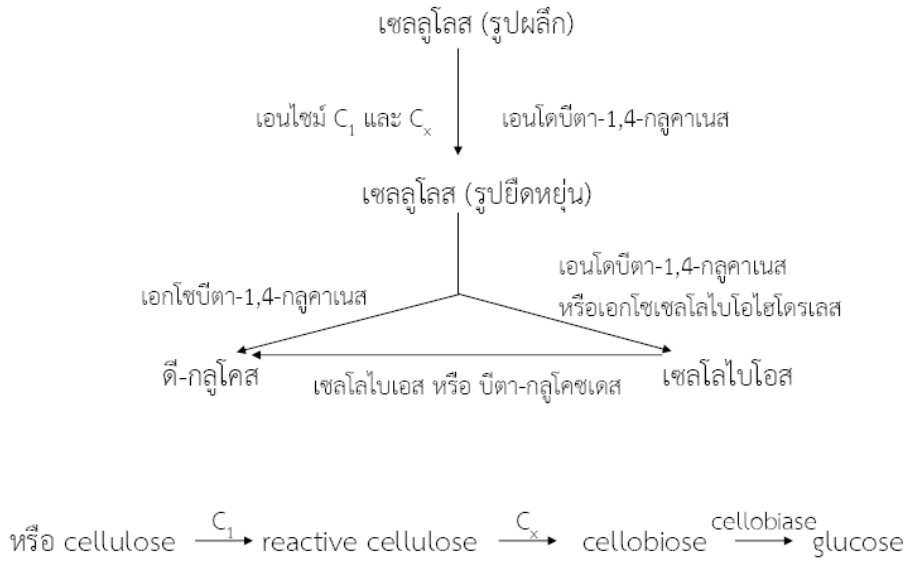
2) เอนไซม์ C_x หรือ β-1,4 glucanases เป็นเอนไซม์เซลลูเลสที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะในเซลลูโลส หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ แต่ไม่สามารถเร้งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ สามารถแบ่งเอนไซม์ออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ เอนโด-บีตา-1,4-กลูคาเนส (Endo-β-1,4 glucanases) ซึ่งจะทำหน้าทที่ย่อยสลายภายในสายพอลิเมอร์ และได้โอลิโกเมอร์และกลูโคสเป็นผลผลิต และเอกโซ-บีตา-1,4-กลูคาเนส (Exo-β-1,4 glucanases) ซึ่งทำ

หน้าที่ย่อยสลายปลายของสายพอลิเมอร์ และมีการเปลี่ยนแปลงผลผลิตจาก β- เป็น α-configuration และได้เซลโลไบโอสและกลูโคสเป็นผลผลิต

3) บีตา-กลูโคซิเดส (β-Glucosidase) หรือเซลโลไบเอส มีสับสเตรทเป็นเซลโลไบโอส และผลผลิตที่ได้คือ กลูโคส ซึ่งมีโครงสร้างที่เปลี่ยนไปจากเดิม

เอนไซม์เซลลูเลส คือ มีมวลโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 63,000 pH ที่เอนไซม์ทำงานได้ดีอยู่ที่ประมาณ 5.5-6.0 และสามารถคงตัวที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ได้นาน 5 นาที ที่ pH 7.0 แต่สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยไอออนของโลหะหนัก พวกซัลไฟดริล และสารทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน

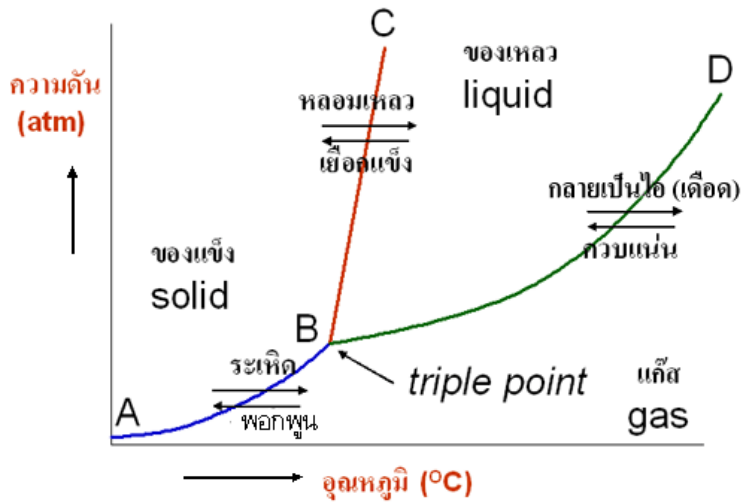
การนำเซลลูเลสมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม มักนำมาใช้ในการผลิตกลูโคส แต่การใช้เซลลูโลสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกลูโคสนั้นยังทำได้ไม่ดีเมื่อเทียบกับการใช้แป้งเป็นสารตั้งต้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปัญหาทางเทคนิคและการที่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน ดังแสดงในภาพที่ 2.9 เพื่อให้เกิดเป็นกลูโคสบริสุทธิ์



ภาพที่ 2.9 แผนภูมิการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลส
ที่มา: ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547

2. การสกัดด้วยการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤต

ในธรรมชาติสสารสามารถเปลี่ยนแปลงได้ใน 3 สถานะ คือ ของแข็ง ของเหลว และแก๊ส ซึ่งแผนผังที่มีการเปลี่ยนแปลงสถานะของสสารทั้ง 3 สถานะ ที่อุณหภูมิและความดันต่าง ๆ จะเรียกว่าแผนผังวัฏภาค (phase diagram) ดังแสดงในภาพที่ 2.10



ภาพที่ 2.10 แผนผังวัฏภาค (phase diagram)
ที่มา: http://www.il.mahidol.ac.th/ e-media/

จากภาพที่ 2.10 แผนผังวัฏภาค แบ่งได้เป็น 3 ส่วน โดยมีวัฏภาคเพียงชนิดเดียวในแต่ละส่วน คือ ของแข็ง ของเหลว หรือแก๊ส เส้นสมดุลวัฏภาคระหว่างของแข็งกับแก๊ส ซึ่งเป็นการแบ่งส่วนของสารในสถานะของแข็งกับแก๊ส แสดงในเส้น AB ส่วนเส้นสมดุลวัฏภาคระหว่างของแข็งกับของเหลว แสดงในเส้น BC และเส้นสมดุลวัฏภาคระหว่างของเหลวกับแก๊ส แสดงในเส้น BD จุด triple point จะเป็นจุดที่เส้นสมดุลทั้ง 3 เส้นมาตัดกัน ซึ่งแสดงถึงอุณหภูมิและความดันที่ทำให้ ของแข็ง ของเหลว และแก๊ส อยู่ร่วมในภาวะสมดุล และจุด D จะเรียกว่า จุดวิกฤต (critical point) เป็นจุดสุดท้ายที่แบ่งขอบเขตสมดุลระหว่างสสารในสถานะของเหลวกับแก๊ส ซึ่งสสารที่อยู่เหนือจุด D ขึ้นไป จะมีพฤติกรรมที่แตกต่างไปจากของเหลวและแก๊ส และไม่สามารถแบ่งแยกระหว่างของเหลวและแก๊สได้

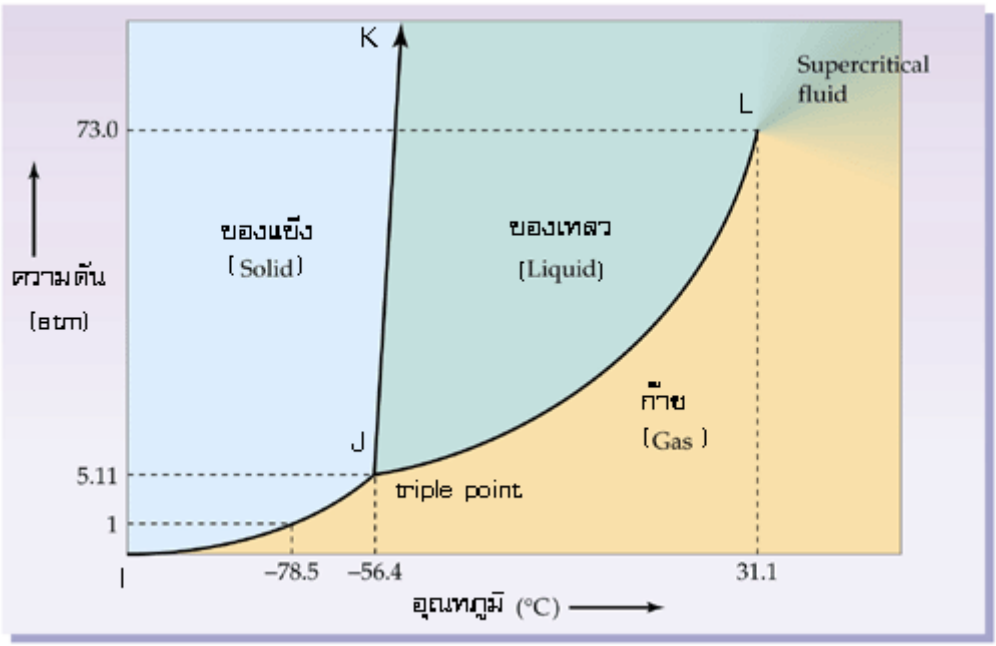
ซูเปอร์คริติคัลฟลูอิด (Supercritical Fluid) หรือของเหลวเหนือจุดวิกฤตเป็นสสารที่อยู่ในสภาวะที่มีสมบัติร่วมกันระหว่างของเหลวและก๊าซ มีความหนาแน่นคล้ายของเหลว จึงมีความสามารถในการละลายสารต่างๆ ได้รวมทั้งมีความหนืดต่ำและมีสมบัติการไหลคล้ายก๊าซ จึงทำให้สามารถซึมผ่านสารต่างๆ ได้ดี ซูเปอร์คริติคัลฟลูอิดเกิดจากการให้ความร้อนแก่ก๊าซที่อุณหภูมิเหนือจุดวิกฤต (critical point) หรือเกิดจากการอัดของเหลวโดยใช้ความดันเหนือจุดวิกฤต อุณหภูมิ ณ จุดวิกฤต (critical temperature) ของสาร คือ อุณหภูมิที่สารในสถานะของเหลวไม่สามารถคงอยู่ได้และความดันไอของสารที่อุณหภูมิ ณ จุดวิกฤตนี้ เรียกว่า ความดัน ณ จุดวิกฤต (critical pressure)

ได้มีการนำเทคนิคซูเปอร์คริติคัลฟลูอิดมาใช้ครั้งแรกโดย Lovelock ในปี ค.ศ. 1958 ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีซูเปอร์คริติคัลฟลูอิดมาประยุกต์ในหลายด้าน เช่น อุตสาหกรรมอาหาร สิ่งทอ พอลิเมอร์และกระบวนการทางเคมีต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาใช้เป็นตัวทำละลายเนื่องจากสามารถละลายสารต่างๆ ได้หลายประเภทเพียงแต่ปรับอุณหภูมิและความดันที่ใช้ให้เหมาะสม เทคนิคนี้ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมเนื่องจากไม่มีสารตกค้าง สามารถกำจัดได้ง่ายโดยทำให้ของเหลวระเหยออกไปด้วยการลดความดันในสภาพของก๊าซ มีการใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แพร่หลายที่สุด

ในรูปของซูเปอร์คริติคัลฟลูอิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีอุณหภูมิ ณ จุดวิกฤตประมาณ 31°C ความดัน ณ จุดวิกฤตประมาณ 73 atm ดังแสดงในภาพที่ 2.11 ไม่ติดไฟและมีความบริสุทธิ์สูง

เทคนิคซูเปอร์คริติคัลฟลูอิดมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ สามารถควบคุมสมบัติในการเป็นตัวทำละลายได้ โดยปรับความดันและอุณหภูมิ สามารถกำจัดออกได้ง่ายโดยอาศัยสมบัติในการระเหย เป็นตัวทำละลายที่ไม่เป็นพิษ สามารถนำมาสกัดสารประกอบที่มีจุดเดือดสูงภายใต้อุณหภูมิต่ำ และ สามารถนำมาสกัดสารที่ไม่ทนความร้อนภายใต้อุณหภูมิต่ำ

การใช้เทคโนโลยีซูเปอร์คริติคัลฟลูอิดขึ้นกับสมบัติของสารภายใต้สภาวะความดันและอุณหภูมิเหนือจุดวิกฤตของสารนั้น โดยทั่วไปซูเปอร์คริติคัลฟลูอิดจะมีความหนืดและความสามารถในการซึมผ่านใกล้เคียงกับสารในสถานะก๊าซแต่จะมีความหนาแน่นใกล้เคียงกับของเหลว ซูเปอร์คริติคัลฟลูอิดมีศักยภาพในการเป็นตัวทำละลายสูงและสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ โดยความสามารถในการละลายสารจะขึ้นกับความดันและอุณหภูมิที่ใช้ การเพิ่มความดันจะช่วยให้ซูเปอร์คริติคัลฟลูอิดมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้นส่งผลให้มีความสามารถในการละลายสารเพิ่มขึ้น สำหรับผลของอุณหภูมิ พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจะทำให้ซูเปอร์คริติคัลฟลูอิดมีความหนาแน่นลดลง แต่ความดันไอของสารเพิ่มขึ้น สารแต่ละตัวจะมีลักษณะเฉพาะแตกต่างกันไปตามอุณหภูมิที่ใช้

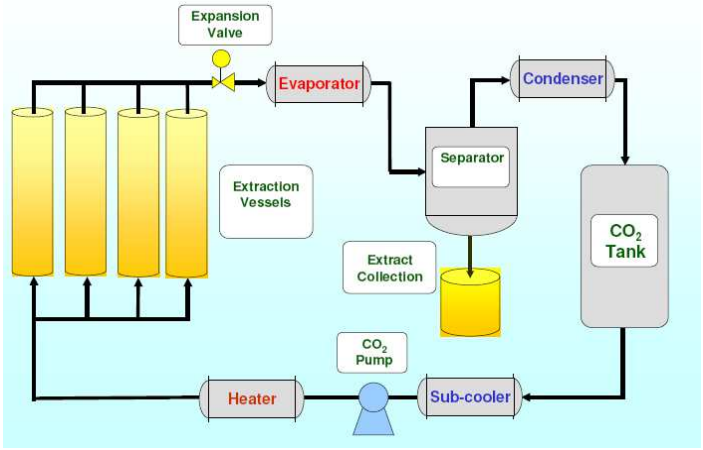


ภาพที่ 2.11 กราฟแสดงแผนผังวัฏภาคของคาร์บอนไดออกไซด์
ที่มา: http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/

อย่างไรก็ตาม การใช้เทคโนโลยีซูเปอร์คริติคัลฟลูอิดยังมีข้อจำกัด คือ เป็นเทคนิคที่ต้องอาศัยการเพิ่มความดันและต้องการกระบวนการที่สามารถนำตัวทำละลายกลับมาใช้ใหม่ เพื่อลดต้นทุน นอกจากนี้เทคโนโลยีซูเปอร์คริติคัลฟลูอิดยังมีต้นทุนของเครื่องมือและอุปกรณ์ค่อนข้างสูงอีกด้วย

เทคนิคการสกัดสารโดยใช้ซูเปอร์คริติคัลฟลูอิด (Supercritical fluid extraction: SFE) มีข้อดี คือ เป็นวิธีการที่ใช้ความร้อนต่ำและมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ส่วนใหญ่นิยมนำมาใช้สกัดสารประเภทไขมันและน้ำมันต่างๆ โดยเฉพาะการสกัดน้ำมันหอมระเหยจะได้กลิ่นใกล้เคียงกับวัตถุดิบต้นกำเนิด มีตัวอย่างงานวิจัยจำนวนมากที่นำเทคนิคนี้ มาสกัดน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรอย่างไรก็ตาม อุณหภูมิและความดันที่ใช้ในการสกัดจะแตกต่างกันขึ้นกับประเภทหรือชนิดของวัตถุดิบต้นกำเนิดและสารสำคัญที่ต้องการ

เทคนิคการสกัดสารด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติ ภาพที่ 2.12 คาร์บอนไดออกไซด์ในถังจะไหลเข้าสู่กระบวนการสกัดโดยใช้ปั๊มคาร์บอนไดออกไซด์ปั๊มเข้ามา ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปั๊มเข้ามาจะผ่าน เครื่องทำความเย็นเพื่อให้คาร์บอนไดออกไซด์กลายเป็นของเหลว แล้วผ่านเข้าสู่ปั๊ม และเครื่องทำความร้อนซึ่งจะทำการปรับอุณหภูมิและความดันให้เหนือจุดวิกฤตเพื่อเปลี่ยนสถานะเป็นของไหลภาวะเหนือวิกฤต จากนั้นคาร์บอนไดออกไซด์ภาวะเหนือวิกฤตจะผ่านเข้าสู่ extraction vessel ซึ่งบรรจุวัตถุดิบที่ต้องการสกัด และเกิดการสกัดสารออกมา สารที่ได้ออกมาจะถูกเก็บไว้ที่ extraction collection ส่วนคาร์บอนไดออกไซด์จะถูกควบแน่นเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่



ภาพที่ 2.12 แสดงเทคนิคการสกัดสารด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤต
ที่มา: http://www.natex.at/processdescriptionextr.html

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาค้นคว้าข้อมูลพบว่ามีงานวิจัยที่รายงานถึงประโยชน์ของไลโคปีนต่อสุขภาพของคนเรา ได้แก่

Enzo et al. (2000) ได้ศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ของการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติที่มีต่อปริมาณไลโคปีนและเบตา–แคโรทีน ที่ได้จากเยื่อและเปลือกของมะเขือเทศ โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 40 - 80 °C และความดัน 2500-4000 psi พบว่า การสกัดที่ความดัน 4000 psi อุณหภูมิ 60 °C สามารถสกัดไลโคปีนได้ 63% และเบตา–แคโรทีน 35% และไลโคปีนและเบตา–แคโรทีน แสดงพฤติกรรมการละลายในคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติแตกต่างกันที่ตัวแปร

ต่างๆ ของกระบวนการสกัด ปริมาณไลโคปีนที่สามารถสกัดได้สูงสุดคือ 87% และเบตา–แคโรทีน 13%

Rao & Rao (2007) ได้รายงานเกี่ยวกับแคโรทีนอยด์และสุขภาพของมนุษย์ ว่าการเกิดอนุมูลอิสระในคนเราก่อให้เกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ ขึ้น ซึ่งสารที่จะช่วยยับยั้งหรือทำลายอนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถพบได้มากในผักและผลไม้ชนิดต่าง ๆ เราเรียกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และแคโรทีนอยด์ก็เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยป้องกันและรักษาสุขภาพของคนเราให้ดีขึ้น ซึ่งในขณะนี้แคโรทีนอยด์ที่กำลังเป็นที่สนใจ คือไลโคปีน ซึ่งมีงานวิจัยที่ยืนยันเกี่ยวกับคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของไลโคปีนเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ

Kubola & Siriamornpun (2011) ได้ทำการศึกษา phytochemical (lycopene, β-carotene, lutein และ phenolic compounds) ของเปลือก เนื้อ และเยื่อหุ้มเมล็ดของฟักข้าว พบว่า เยื่อหุ้มเมล็ดของฟักข้าว มีปริมาณ lycopene และ β-carotene สูงที่สุด ขณะที่เปลือก (สีเหลือง) มีปริมาณ lutein มากที่สุด และพบสารในกลุ่ม phenolic acid 2 ชนิด คือ hydroxybenzoic acids และ hydroxycinnamic

รวมถึงมีวิธีการสกัดสารไลโคปีนเพื่อให้ได้ปริมาณสารไลโคปีนที่เพิ่มมากขึ้น และวิธีวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีน ได้แก่

Choudhari & Ananthanarayan (2007) ได้ทำการศึกษาวิธีการสกัดไลโคปีนจากมะเขือเทศ โดยใช้เอนไซม์ พบว่า เมื่อทำการสกัดจากมะเขือเทศทั้งลูก ปริมาณไลโคปีนจะเพิ่มขึ้นเป็น 132 μg/g (198%) เมื่อใช้เอนไซม์เซลลูเลส และ 108 μg/g (224%) เมื่อใช้เอนไซม์เพคติเนส และการสกัดจากเปลือกมะเขือเทศ ปริมาณไลโคปีนจะเพิ่มขึ้นเป็น 429 μg/g (107%) เมื่อใช้เอนไซม์เซลลูเลส และ 1104 μg/g (206%) เมื่อใช้เอนไซม์เพคติเนส ดังนั้นการใช้เอนไซม์เข้ามาช่วยในการสกัดไลโคปีนจากของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตมะเขือเทศจึงเป็นสิ่งจำเป็น

Ishida & Chapman (2009) ได้ทำการศึกษาการสกัดสารแคโรทีนอยด์จากพืชโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ซึ่งพบว่า เอทิลแลคเตต (ethyl lactate) เป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดทั้ง *trans*- และ *cis*-lycopene isomers จากผงมะเขือเทศอบแห้ง นอกจากนั้นยังพบสาร antioxidants อีกสองชนิดในสารสกัด คือ α-tocopherol และ α-lipoic acid ซึ่งทั้งสองชนิดเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของคนเรา

Giuseppe et al. (2004) ได้ศึกษาผลของการสกัดสารไลโคปีนด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติที่ใช้น้ำมันพืชเป็นตัวทำละลายร่วม โดยในการสกัดจะใช้อุณหภูมิ 45 - 70 °C และความดัน 335 - 450 bar พบว่า การใช้น้ำมันพืชเป็นตัวทำละลายร่วมช่วยให้ได้สารไลโคปีนมากขึ้นและช่วยทำให้สีของสารสกัดที่ได้มีความคงที่สม่ำเสมอ ปริมาณสารไลโคปีนที่สกัดได้จะขึ้นกับภาวะที่ใช้ในการสกัด ปริมาณไลโคปีนที่สกัดได้สูงสุดคือ 60% ที่อุณหภูมิ 66°C และความดัน 450 bar อัตราคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติที่ใช้เป็น 20 kg/h

Topal et al. (2006) ได้ทำการศึกษาการสกัดสารไลโคปีนจากเปลือกมะเขือเทศด้วยเทคนิคของเหลวเหนือวิกฤตคาร์บอนไดออกไซด์ โดยศึกษาที่แรงดัน 20 ถึง 50 MPa อุณหภูมิ 313 ถึง 373 เคลวิน และอัตราการไหลของตัวทำละลาย 1.5 ถึง 4.5 ml/min พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดใน

การสกัดคือ แรงดัน 40 MPa อุณหภูมิ 373 เคลวิน และอัตราการไหล 2.5 mL/min เป็นเวลา 330 นาที ซึ่งสามารถสกัดสารแคโรทีนอยด์ได้มากกว่า 94% ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมดที่อยู่ในตัวอย่าง

Huang et al. (2008) ได้สกัดสารไลโคปีนจากมะเขือเทศ โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติในการสกัดแบบต่อเนื่อง และศึกษาผลของอุณหภูมิ ความดัน และเวลาที่ใช้ในการสกัดที่มีต่อปริมาณสารไลโคปีนที่สกัดได้ จากการศึกษาพบว่า ที่อุณหภูมิ 57°C ความดัน 40 MPa และเวลา 1.8 h ปริมาณการสกัดไลโคปีนสูงสุดที่สกัดได้คือ 93% และเมื่อศึกษาความสามารถในการต้านทานออกซิเดชัน พบว่า ที่อุณหภูมิ 57°C ความดัน 53 MPa และเวลา 1.8 h สารไลโคปีนที่สกัดได้จะความสามารถในการต้านทานออกซิเดชันสูงสุด

Sheetal et al. (2008) ได้สกัดสารไลโคปีนจากชีวมวล (mated cultures of Blakeslea trispora NRRL 2895 and 2896) โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติในการสกัดร่วมกับอะซีโตน และศึกษาผลของอุณหภูมิ ความดัน และเวลาที่ใช้ในการสกัดที่มีต่อปริมาณสารไลโคปีนที่สกัดได้ จากการศึกษาพบว่า การใช้อุณหภูมิในช่วง 45-65°C ความดัน 300-400 bar และเวลา 1-2 h โดยให้อัตราการไหลของตัวทำละลายคงที่ 1 ml/min ที่ 1 ml/g ของปริมาณชีวมวล จะให้ปริมาณการสกัดไลโคปีนในช่วง 73% ถึง 85% และให้ปริมาณการสกัดไลโคปีนสูงสุดที่สกัดได้คือ 92% ที่อุณหภูมิ 52°C ความดัน 349 bar และเวลา 1.1 และการใช้ตัวทำละลายร่วมจะช่วยให้ได้ปริมาณไลโคปีนเพิ่มขึ้น

Lamin et al. (2008) ได้สกัดสารไลโคปีนจากเปลือกของมะเขือเทศแห้ง โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติในการสกัดร่วมกับอะซีโตน และศึกษาผลของอุณหภูมิ ความดัน และเวลาที่ใช้ในการสกัดที่มีต่อปริมาณสารไลโคปีนที่สกัดได้ จากการศึกษาพบว่า การใช้อุณหภูมิในช่วง 45-70°C ความดัน 25-45 MPa และตัวทำละลายร่วม 5 และ 15 พบว่าสามารถสกัดปริมาณการสกัดทราน-ไลโคปีนได้ 33% ที่อุณหภูมิ 62°C ความดัน 45 MPa และตัวทำละลายร่วม 14% และการใช้ตัวทำละลายร่วมจะช่วยให้ได้ปริมาณไลโคปีนเพิ่มขึ้น

Shi et al. (2009) ได้ศึกษาความสามารถในการละลายของสารไลโคปีนจากมะเขือเทศ ที่สกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติที่อุณหภูมิและความดันต่างๆ โดยในการสกัดจะใช้อุณหภูมิ 50-80 °C และความดัน 200-400 bar พบว่า ความสามารถในการละลายของสารไลโคปีนจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิและความดันเพิ่มขึ้น ความสามารถในการละลายของสารไลโคปีนสูงสุดคือ 1.9×10−6 mol fraction ที่อุณหภูมิ 80°C และความดัน 250 bar ที่อุณหภูมิและความดันสูงกว่านี้พบว่า ไลโคปีนเกิดการสลายตัว

Beatriz et al. (2009) ได้สกัดสารไลโคปีนจากเศษมะเขือเทศพันธ์โปตุเกต ได้แก่เปลือกและเมล็ด โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติในการสกัดแบบต่อเนื่อง และศึกษาผลของปริมาณความชื้น องค์ประกอบของสารตั้งต้น ขนาดอนุภาค อัตราการไหลของตัวทำละลาย อุณหภูมิและความดันที่มีต่อปริมาณสารไลโคปีนที่สกัดได้ จากการศึกษาพบว่า ปริมาณสารไลโคปีนที่สกัดได้จะขึ้นกับปริมาณขององค์ประกอบตอนเริ่มต้น และปริมาณสารไลโคปีนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเมื่อเมื่อความดันและอัตราการไหลของตัวทำละลายเพิ่มขึ้น และขนาดอนุภาคมีขนาดเล็กลง ผลของอุณหภูมิและปริมาณความชื้นในสารตั้งต้นจะมีความซับซ้อน โดยพบว่า ปริมาณสารไลโคปีนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเมื่อ

ปริมาณสารไลโคปีนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มจาก 40° C เป็น 60 °C แต่กลับลดลงเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 80 °C ปริมาณการสกัดไลโคปีนสูงสุดที่สกัดได้คือ 93% ที่อุณหภูมิ 60 °C ความดัน 300 bars อัตราการไหลของตัวทำละลาย 0.59 g/min ขนาดอนุภาค 0.36 mm และปริมาณความชื้น 4.6%

Ciurlia et al. (2009) ได้สกัดสารไลโคปีนจากเยื่อและเปลือกของมะเขือแห้งไม่รวมเมล็ดและสกัดน้ำมันจากเมล็ดฮาเซลนัท โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติในการสกัดเพื่อให้สารให้สีของไลโคปีนที่สกัดได้ละลายอยู่ในน้ำมันจากฮาเซลนัท ภาวะในการสกัดจะใช้อุณหภูมิ 60 °C และความดัน 400 bar อัตราคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติที่ใช้เป็น 10 kg/h ศึกษาพบว่าปริมาณการสกัดไลโคปีนสูงสุดที่สกัดได้คือ 72.5% และปริมาณน้ำมันจากฮาเซลนัท 80% สามารถสกัดสารไลโคปีนได้ทั้งแบบ trans-lycopene ซึ่งจะตกตะกอน และแบบ cis-lycopene ซึ่งจะละลายอยู่ในน้ำมัน

Yi et al. (2009) ได้ทำการศึกษาสภาวะต่าง ๆ ของเทคนิคของเหลวเหนือวิกฤตคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีผลต่อการสกัดสารไลโคปีนและปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระของสารไลโคปีนจากเปลือกมะเขือเทศ โดยใช้เทคนิค Box-Behnken Design ในการศึกษาตัวแปรอิสระสามชนิด ได้แก่ อุณหภูมิ 40 ถึง 100 องศาเซลเซียส แรงดัน 20 ถึง 40 MPa และอัตราการไหล 1.0 ถึง 2.0 ml/min พบว่า ปริมาณสารสกัดไลโคปีนที่มากที่สุดคือ 31.25 ไมโครกรัมต่อมะเขือเทศ 1 กรัม ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส แรงดัน 40 MPa และอัตาการไหล 1.5 ml/min

Saldana et al. (2010) ได้สกัดสารไลโคปีนและเบตา–แคโรทีน จากเปลือกและเยื่อมะเขือเทศ โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติทั้งแบบที่ใช้และไม่ใช้ตัวทำละลายร่วม โดยตัวทำละลายร่วมที่ใช้คือน้ำมันและเอทานอล ภาวะในการสกัดจะใช้อุณหภูมิ 40 °C และความดัน 400 bar อัตราการไหลของตัวทำละลาย 0.5 และ 1.2 L/min และใช้เวลา 180 นาที พบว่า ความสามารถในการละลายของไลโคปีนที่สกัดได้โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติจะน้อยกว่าการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติร่วมกับตัวทำละลาย โดยตัวทำละลายร่วมที่เป็นน้ำมันจะให้ไลโคปีนมากกว่าตัวทำละลายร่วมที่เป็นเอทานอล อันเป็นผลมาจากความการละลายในสภาวะที่มีขั้วแตกต่างกันของตัวทำละลายร่วม

Juliana et al. (2010) ได้สกัดสารไลโคปีนจากน้ำมะเขือเทศ โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติโดยไม่ต้องทำให้สารตั้งต้นแห้งเสียก่อน แต่ใช้เอทานอลล้างน้ำที่อยู่ในเนื้อของแข็งในน้ำมะเขือเทศ ศึกษาผลของอุณหภูมิและความดัน ที่มีผลต่อความสามารถในต้านออกซิเดชัน พบว่าภาวะในการสกัดที่ให้สารไลโคปีนที่มีความสามารถในต้านออกซิเดชันสูงสุด คือที่อุณหภูมิ 40 °C และความดัน 350 bar และให้ปริมาณการสกัดไลโคปีนสูงสุดที่สกัดได้คือ 76.7%

Yahya et al. (2010) ได้ทำการศึกษาการสกัดใบเตยด้วยการใช้ คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤตและการใช้ตัวทำละลาย โดยผู้วิจัยต้องการสกัดกลิ่น 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) จากใบเตย การสกัดสารโดยทั่วไปจะใช้ตัวทำละลายเพราะเป็นวิธีที่ง่าย ทำได้รวดเร็ว ราคาไม่แพง แต่อย่างไรก็ตามอาจมีตัวทำละลายตกค้างในสารที่สกัดได้ ทางผู้วิจัยจึงศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดด้วยการใช้ตัวทำละลายกับการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤต เนื่องจากวิธีสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤตจะไม่มีตัวทำละลายตกค้าง ราคาไม่แพง และได้ความบริสุทธิ์

สูง ผลการทดลองพบว่า ผลผลิตของสารที่สกัดด้วยการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤตต่ำกว่าการสกัดที่ใช้เฮกเซน 10 เท่า แต่ผลผลิตทั้งหมดที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้น 50% ถ้าลดขนาดของใบเตยลง

Siti Machmudah et al. (2012) ได้สกัดสารไลโคปีนจากเปลือกมะเขือเทศซึ่งมีเมล็ด โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติในการสกัด ภาวะในการสกัดจะใช้อุณหภูมิ 70-90 °C และความดัน 20-40 MPa ขนาดของอนุภาค 1.05 - 0.10 mm อัตราการไหลของตัวทำละลาย 2–4 mL/min และใช้เวลา 180 นาที ศึกษาผลของความเข้มข้นของไลโคปีนในสารละลายคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติอันเป็นผลมาจากความหนาแน่นที่อุณหภูมิต่างๆ ที่แปรเปลี่ยนไป พบว่าปริมาณไลโคปีนที่สกัดได้เหมาะสมที่สุดคือ 56% ซึ่งได้จากการสกัดที่อุณหภูมิ 90 °C และความดัน 40 MPa อัตราส่วนของเปลือกต่อเม็ดมะเขือเทศ 37/63 อัตราการไหลของตัวทำละลาย 2–4 mL/min และใช้เวลา 180 นาที มะเขือเทศที่มีเมล็ดสามารถสกัดไลโคปีนได้มากขึ้นจาก 18% เป็น 56%

Aoki et al. (2002) ได้ทำการศึกษาสารให้สีแคโรทีนอยด์ในผลฟักข้าวโดยทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเบต้าแคโรทีน (β-carotene) ไลโคปีน (lycopene) ซีแซนทิน (Zeaxanthin) และเบต้าคริบโทแซนทิน (β-cryptoxanthin) ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า ในเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวมีสารไลโคปีนอยู่ 380 μg/g ซึ่งความเข้มข้นของไลโคปีนที่พบมากกว่าความเข้มข้นของไลโคปีนในผักและผลไม้ที่อุดมไปด้วยไลโคปีนถึง 10 เท่า แสดงให้เห็นว่าผลฟักข้าวเป็นแหล่งอาหารใหม่ที่อุดมไปด้วยสารไลโคปีนที่มีประโยชน์

Ishida et al. (2004) ได้ทำการวิเคราะห์ fatty acid และแคโรทีนอยด์ ในผลฟักข้าว โดยพบ tran- และ cis-isomer ของแคโรทีนอยด์ (วิเคราะห์โดยใช้ reverse-phase HPLC, C30 column) ในเยื่อหุ้มเมล็ด 1342 และ 204 μg ตามลำดับ และพบไลโคปีนทั้งหมด 2227 μg นอกจากนี้เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวยังประกอบด้วย 22% fatty acid โดยน้ำหนัก ซึ่งมี 32% oleic acid, 29% palmitic acid และ 28% linoleic acid

และยังมีงานวิจัยที่มีการใช้ประโยชน์ไลโคปีนในผลิตภัณฑ์อาหารซึ่งโดยส่วนใหญ่จะใช้มะเขือเทศเป็นวัตถุดิบ ได้แก่

Garcia et al. (2009) ได้ทำการศึกษาเนื้อแฮมเบอเกอร์ผสมไลโคปีนจากเปลือกมะเขือเทศอบแห้ง โดยใส่เปลือกมะเขือเทศอบแห้ง (0-6% w/w) ในเนื้อแฮมเบอเกอร์ พบว่า การเติมเปลือกมะเขือเทศอบแห้งปริมาณ 6% ทำให้สีของเนื้อเพิ่มขึ้น และเนื้อสัมผัสก็เปลี่ยนไปเนื่องจากปริมาณเส้นใยของเปลือกมะเขือเทศ แต่ถ้าเติมเปลือกมะเขือเทศอบแห้งปริมาณ 4.5% เนื้อแฮมเบอร์เกอร์จะมีคุณภาพที่ดีในทุกด้าน และมีปริมาณไลโคปีน 4.9 mg/100 g ของเนื้อแฮมเบอเกอร์ที่ปรุงสุกแล้ว

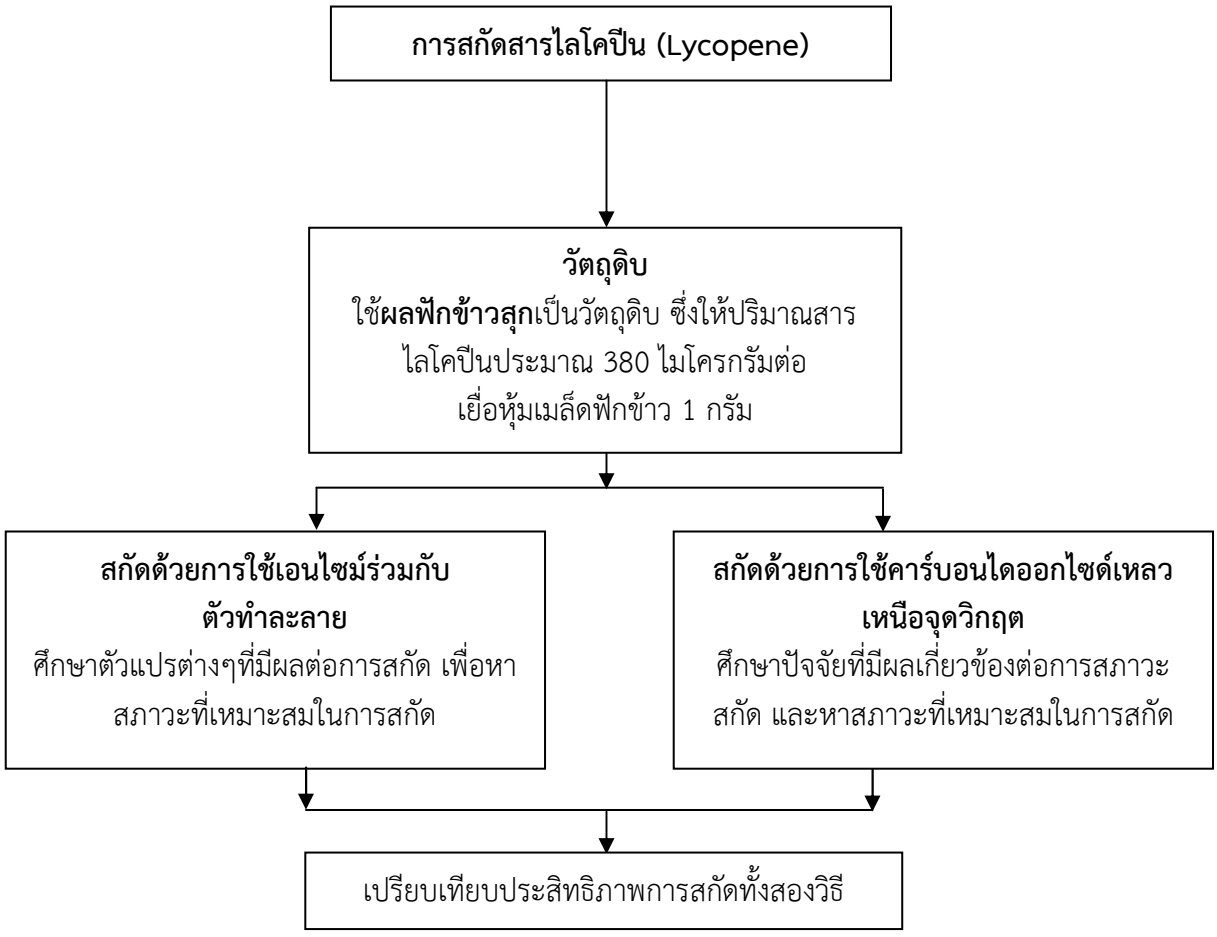
Dehghan-Shoar et al. (2010) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของขนมขบเคี้ยวที่ใส่ไลโคปีนจากมะเขือเทศ โดยได้ผสมเนื้อหรือเปลือกมะเขือเทศอบแห้งในแป้งที่ใช้ทำขนม พบว่า ในขนมขบเคี้ยวที่ใช้แป้งผสมด้วยเปลือกมะเขือเทศมีปริมาณไลโคปีนอยู่ค่อนข้างสูง และการเพิ่มอุณหภูมิในกระบวนการผลิตไม่มีผลต่อปริมาณไลโคปีนในผลิตภัณฑ์อย่างมีนัยสำคัญ

นอกจากนั้นในปัจจุบันคนไทยเองเริ่มหันมาสนใจฟักข้าวกันเพิ่มมากขึ้น ทำให้นักวิจัยจากหลายหน่วยงานเริ่มทำการศึกษาวิจัยเพื่อปรับปรุงพันธุ์ฟักข้าวให้มีปริมาณสารไลโคปีน และเบต้าแคโรทีนในเยื่อหุ้มเมล็ดสูง และมีผลผลิตของเยื่อหุ้มเมล็ดสูงขึ้นด้วย ได้แก่

Banchong et al. (2010) ได้ทำการศึกษาสมรรถภาพการเจริญเติบโตและผลผลิตของฟักข้าวแหล่งพันธุ์ไทยและเวียดนามในการเก็บเกี่ยวปีแรก พบว่า ฟักข้าวแหล่งพันธุ์ไทยมีการเจริญเติบโตและผลผลิตสูงกว่าแหล่งพันธุ์เวียดนามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีความยาวของเถาและเส้นผ่านศูนย์กลางโคนต้นเฉลี่ยเมื่ออายุ 1 ปี เท่ากับ 8.33 เมตร และ 5.24 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ฟักข้าวแหล่งพันธุ์เวียดนามมีความยาวของเถาและเส้นผ่านศูนย์กลางโคนต้นเฉลี่ย 6.12 เมตร และ 3.19 เซนติเมตร ตามลำดับ ในด้านการให้ผลผลิตพบว่า ฟักข้าวแหล่งพันธุ์ไทยให้ผลผลิตตลอดปี ในขณะที่แหล่งพันธุ์เวียดนามให้ผลผลิตในช่วงเดือนเมษายนถึงกรกฎาคม

แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยในด้านการปรับปรุงสายพันธ์ซึ่งเป็นการสนับสนุนให้วัตถุดิบที่จะนำมาแปรรูปเป็นอาหารเพื่อสุขภาพมีคุณภาพสูงนั้นยังอยู่ในขั้นดำเนินการ จึงยังไม่มีผลงานวิจัยเผยแพร่ออกมา

กรอบแนวคิดในการวิจัย



บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบ

ผลฟักข้าวสุกพันธุ์พื้นเมืองนครปฐม ดังแสดงในภาพที่ 3.1

ภาพที่ 3.1 ผลฟักข้าวสุก

วัสดุอุปกรณ์

1. UV-Visible Spectrophotometer (shimadzu, Japan)
2. HPLC (Shimadzu, Japan)
3. เครื่องคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤต (Parr 4848, USA)
4. Centrifuge (Beckman, USA)
5. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Buchi, Germany)
6. เครื่องกลั่นแอมโมเนีย (Buchi, Germany)
7. Muffle Furnance (Thermolyne, USA)
8. Hot air oven (Memmert, Germany)
9. Analytical balance (Percisa, Swizerland)
10. Magnetic Stirrer Plate (Harmony, Japan)
11. pH meter (Cyber Scan 510, Singapore)
12. Water bath (Memmert, Germany)

สารเคมี

1. Pectinase (Novo, Japan)
2. Cellulase (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Kanaya Lab, Japan)
3. Lycopene Standard (HPLC grade: Sigma-aldrich, Germany)
4. Hexane (AR grade: Duksan, Korea)

5. Ethanol (AR grade: Duksan, Korea)
6. Ethyl acetate (AR grade: Duksan, Korea)
7. Ethyl lactate (AR grade: Sigma-aldrich, Germany)
8. Acetic acid (AR grade: LAB-SCAN, Ireland)
9. Sodium acetate (AR grade: Ajex, Australia)
10. Petroleum ether (AR grade: LAB-SCAN, Ireland)
11. Potassium sulfate (AR grade: Ajex, Australia)
12. Copersulfate heptahydrate (AR grade: Ajex, Australia)
13. Sulfuric acid (AR grade: Merck, Germany)
14. Sodium hydroxide (AR grade: Fluka, Germany)
15. Boric acid (AR grade: QReC, New Zealand)
16. Hydrochloric acid (AR grade: Merck, Germany)
17. Methanol (HPLC grade: Duksan, Korea)
18. Acetronitrile (HPLC grade: Duksan, Korea)
19. Dichloromethane (HPLC grade: LAB-SCAN, Ireland)
20. Carbondioxide (99.995%)
21. Nitrogen (99.995%)

วิธีการทดลอง

1. การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของผลฟักข้าวสุก

1.1 นำผลฟักข้าวสุกมาทำการผ่าครึ่งและแยกส่วนออกเป็นทั้งหมด 4 ส่วน คือ ส่วนของเนื้อผล (สีเหลือง) ส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ด (สีแดง) ส่วนของเมล็ด และส่วนของเปลือกผล จากนั้นนำมาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่

-การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (ตามวิธีทาง AOAC., 2000) ดังแสดงในภาคผนวก ก.1

-การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (ตามวิธีทาง AOAC., 2000) ดังแสดงในภาคผนวก ก.2

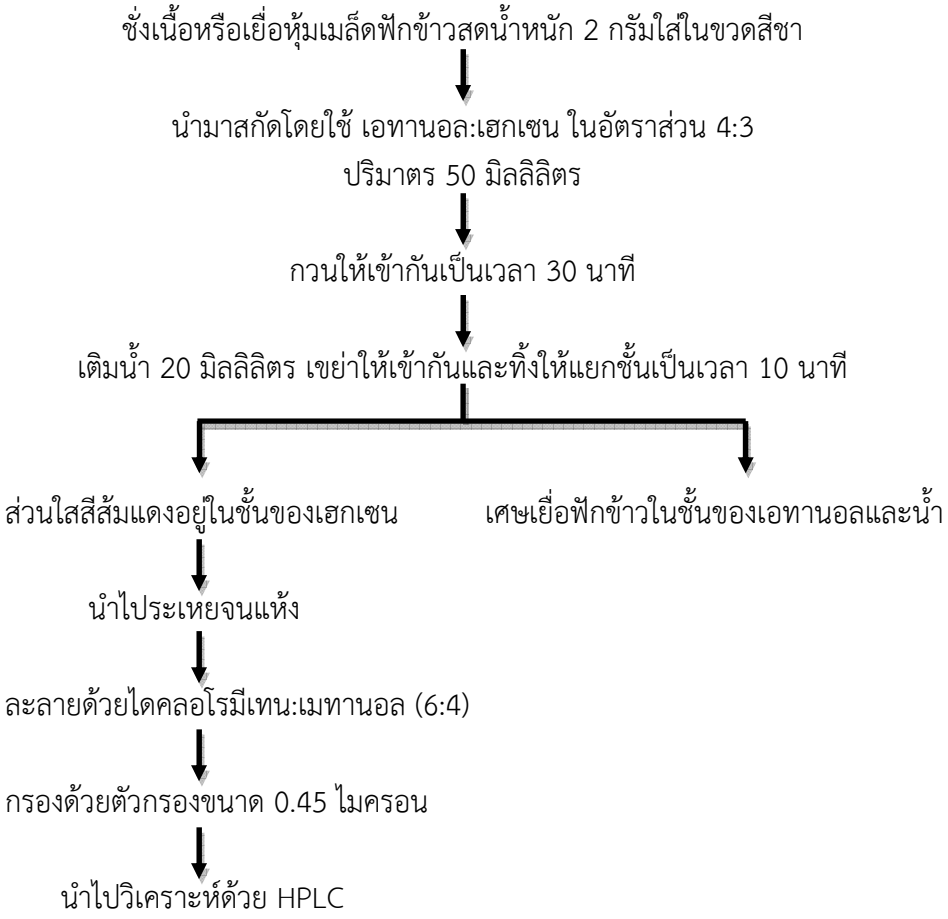
-การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (ตามวิธีทาง AOAC., 2000) ดังแสดงในภาคผนวก ก.3

-การวิเคราะห์ปริมาณเส้นใย (ตามวิธีทาง AOAC., 2000) ดังแสดงในภาคผนวก ก.4

-การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า(ตามวิธีทาง AOAC., 2000) ดังแสดงในภาคผนวก ก.5

-ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ได้จากการคำนวณผลต่างขององค์ประกอบทางเคมีทั้งหมดกับผลรวมของปริมาณความชื้น ไขมัน โปรตีน เส้นใย และเถ้าที่วิเคราะห์ได้ วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ก.6

1.2 วิเคราะห์ปริมาณสารไลโคปีนในส่วนของเนื้อผล (สีเหลือง) และส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ด (สีแดง) โดยมีขั้นตอนการสกัด (ดัดแปลงตามวิธีของ Taungbodhitham et al., 1998) ดังนี้



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการสกัดไลโคปีนด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเฮกเซน

การวิเคราะห์ปริมาณสารไลโคปีนด้วยเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ดัดแปลงตามวิธีของ Nhung et al., 2010 ซึ่งจะเป็นการเทียบกับสารมาตรฐานแบบ external standard โดยใช้

Column : Inertsil ODS-3 (150 x 4.6 mm ID, 5 μm)

Mobile phase A : Dichloromethane:Acetonotile (6:4) และ 0.05%BHT

B : Methanol

The gradient elution : 70% mobile phase A และ 30% mobile phase B เวลา 5 นาที
80% mobile phase A และ 20% mobile phase B เวลา 5 นาที
70% mobile phase A และ 30% mobile phase B เวลา 5 นาที

Flow rate : 0.9 ml/min

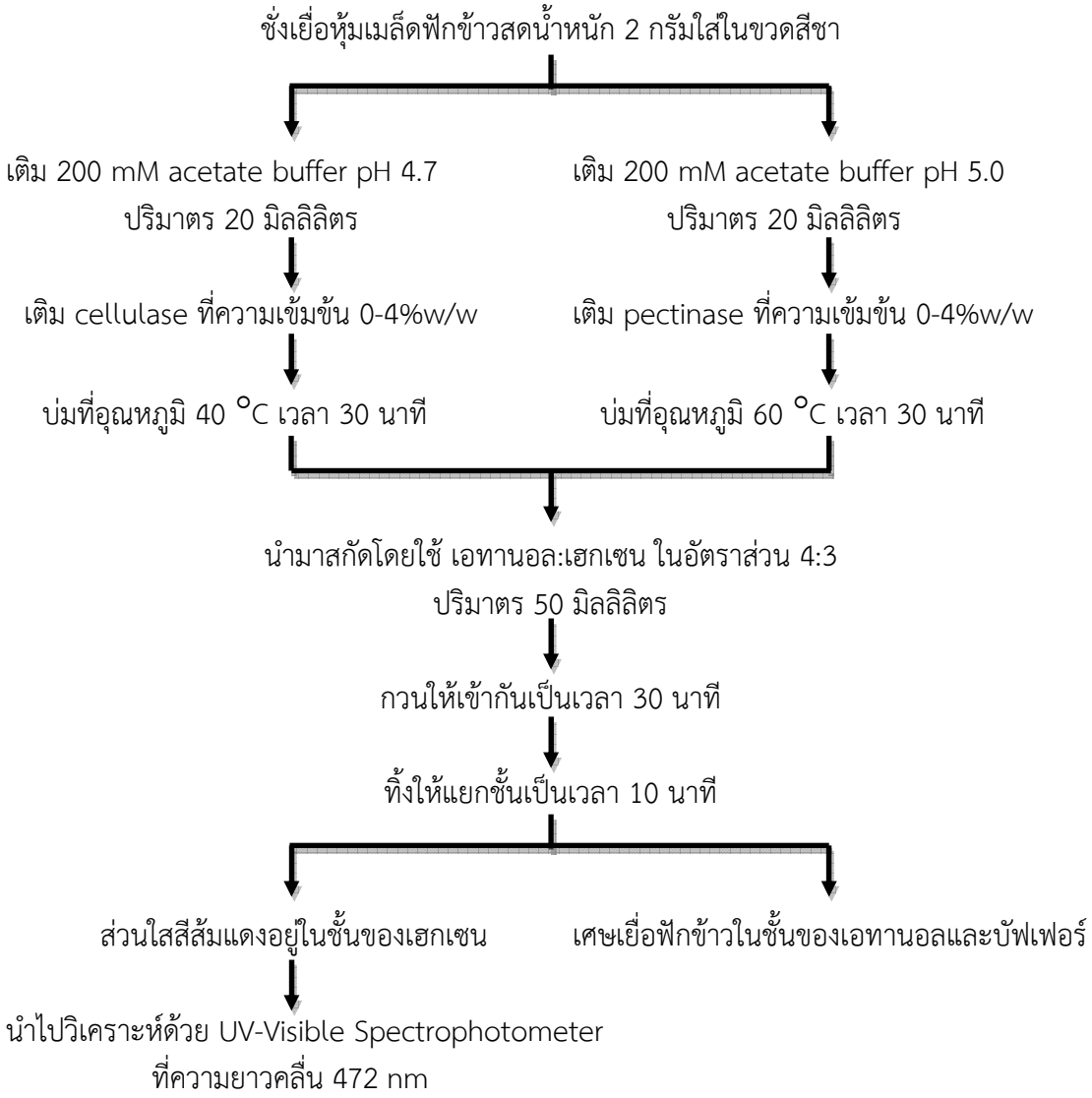
Wavelength : 472 nm

Temperature : 30 ^{o}C

2. การศึกษาวิธีการสกัดไลโคปีนจากผลฟักข้าว

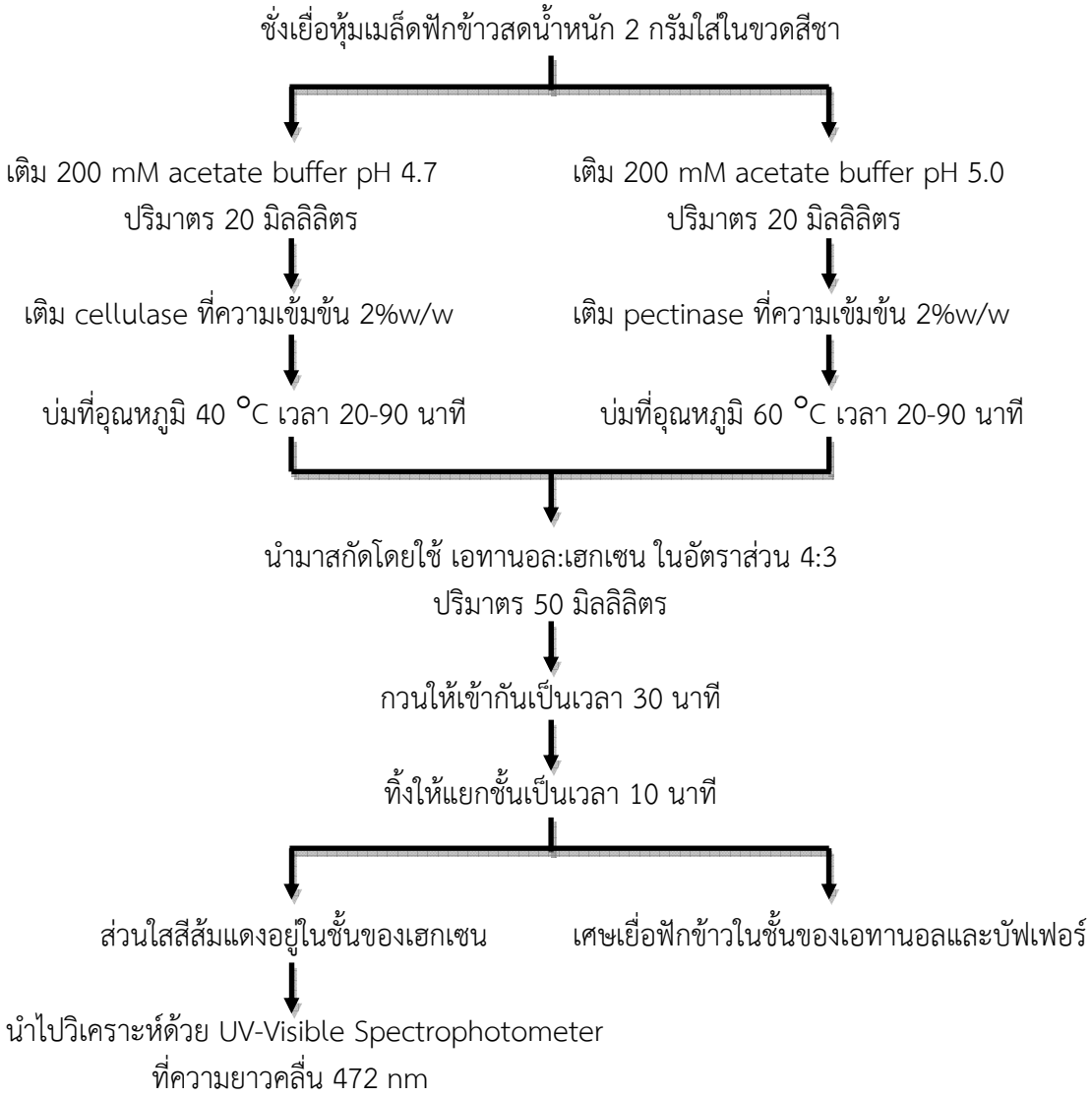
2.1 การศึกษาวิธีการสกัดไลโคปีนด้วยการใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ (ดัดแปลงตามวิธีของ Choudhari & Ananthanarayan, 2007)

2.1.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการสกัดไลโคปีนจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว



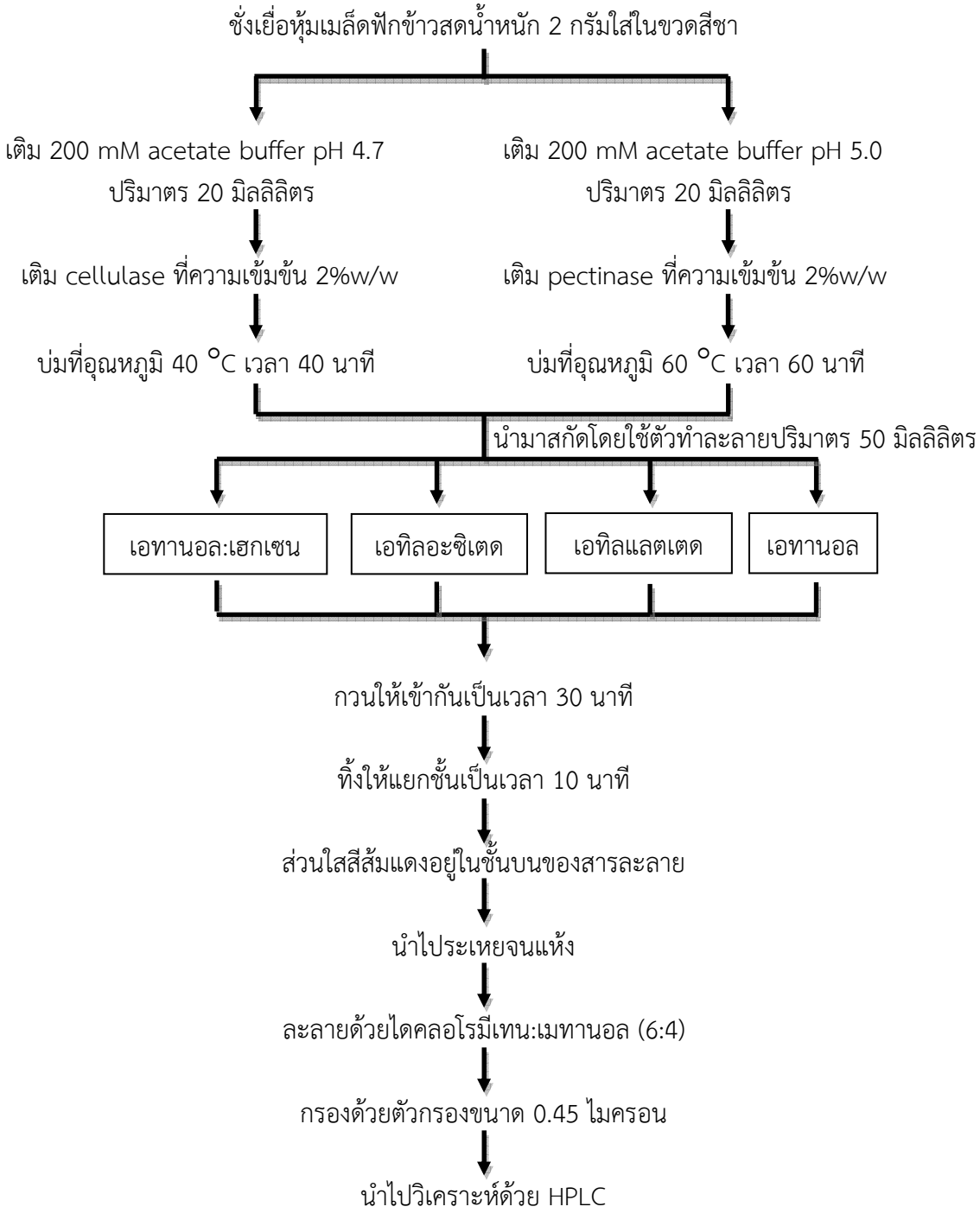
ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการสกัดไลโคปีนโดยแปรผันตามความเข้มข้นของเอนไซม์

2.1.2 การศึกษาผลของเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ต่อการสกัดไลโคปีนจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว



ภาพที่ 3.4 ขั้นตอนการสกัดไลโคปีนโดยแปรผันตามเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์

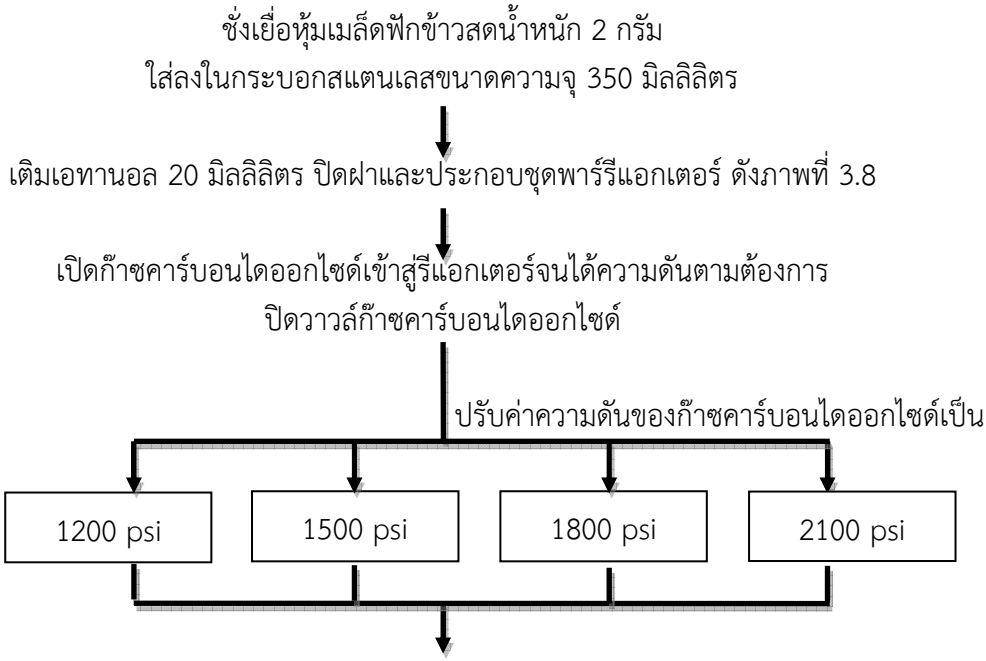
2.1.3 การศึกษาตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการสกัดไลโคปีนจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว



ภาพที่ 3.5 ขั้นตอนการสกัดไลโคปีนโดยแปรผันตัวทำละลายอินทรีย์

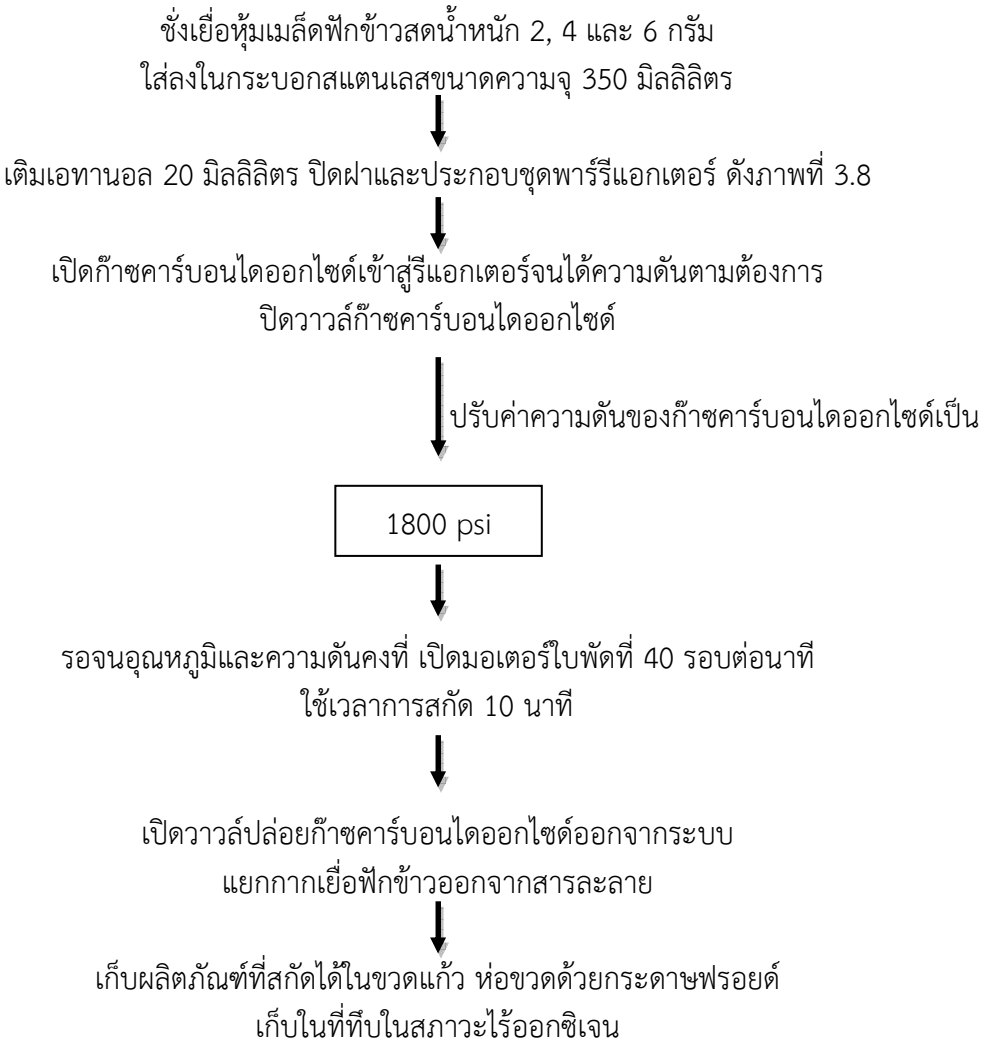
2.2 การศึกษาวิธีการสกัดไลโคปีนด้วยการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤต

2.2.1 การศึกษาความดันของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการสกัดไลโคปีนจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว



ภาพที่ 3.6 ขั้นตอนการสกัดไลโคปีนโดยแปรผันความดัน

2.2.2 การศึกษาปริมาณเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวต่อการสกัดไลโคปีน



ภาพที่ 3.7 ขั้นตอนการสกัดไลโคปีนโดยแปรผันปริมาณเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว

ภาพที่ 3.8 ชุดพาร์รีแอกเตอร์

3. การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิคการใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์และเทคนิคการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤตในการสกัดสารไลโคปีนจากผลฟักข้าว โดยนำผลของไลโคปีนที่สกัดได้จากวิธีในหัวข้อ 2.1.3 มาทำการเปรียบเทียบกับผลของไลโคปีนที่สกัดได้จากวิธีในหัวข้อ 2.2.2

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. ห้องปฏิบัติการเคมี หลักสูตรวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร โรงเรียนการเรือน มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

2. ศูนย์เครื่องมือปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

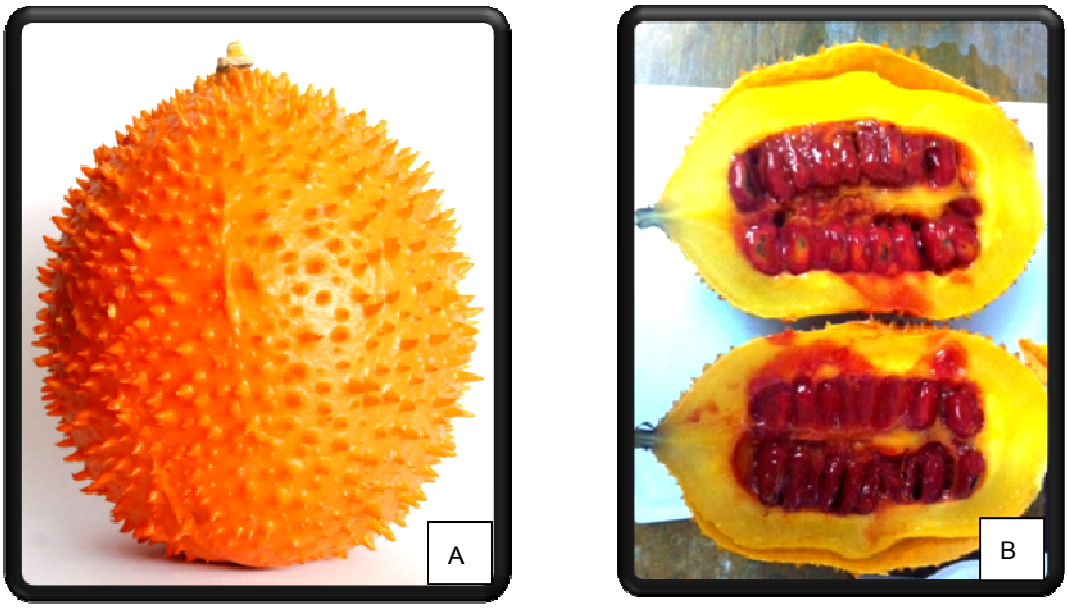
3. สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของผลฟักข้าวสุก

1. การเตรียมตัวอย่างผลฟักข้าวสุก

นำตัวอย่างผลฟักข้าวสุกพันธุ์พื้นเมืองนครปฐมที่มีเปลือกสีส้มแดงมาทำการผ่าครึ่ง พบว่าภายในมีเนื้อฟักข้าวสีเหลือง และเมล็ดซึ่งมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงอยู่ตรงกลางผลเป็นจำนวนมาก ดังแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ลักษณะของผลฟักข้าวสุก (A) เปลือก (B) เนื้อและเมล็ดฟักข้าว

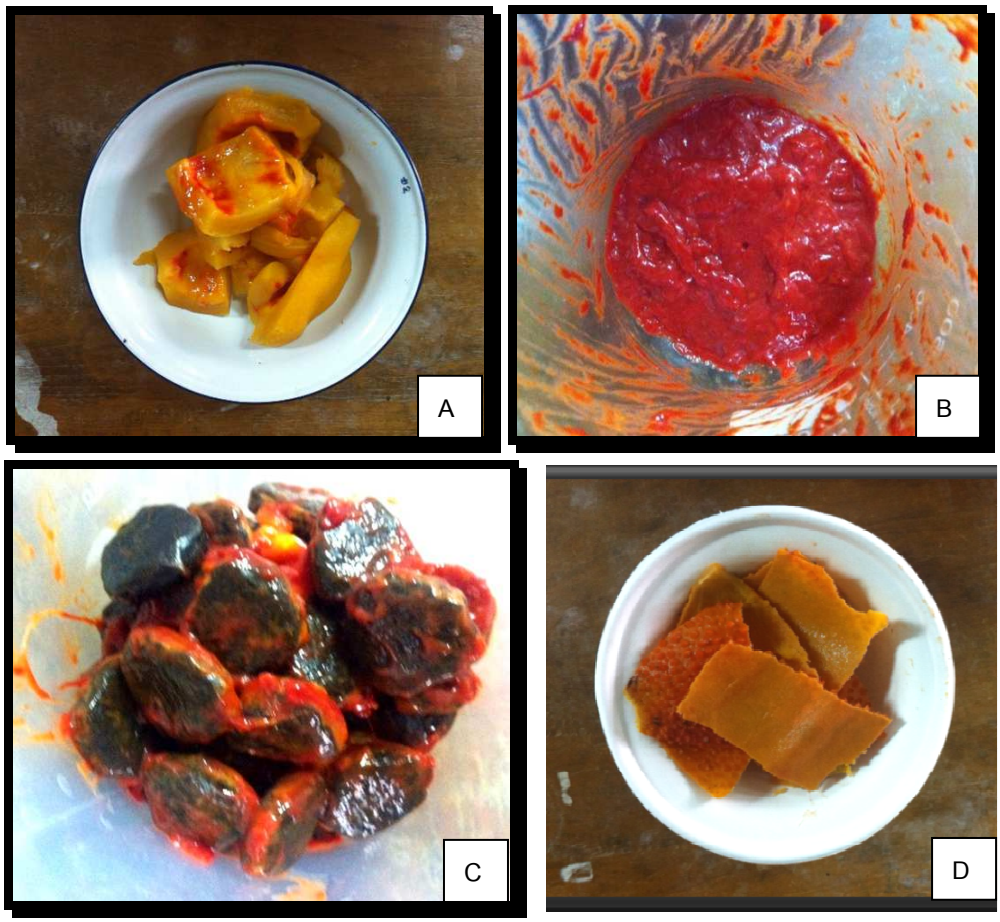
หลังจากนั้นนำผลฟักข้าวสุกมาแยกออกเป็น 4 ส่วน ก่อนนำไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการดังแสดงในภาพที่ 4.2 คือ

1. ส่วนของเนื้อผล ซึ่งมีสีเหลือง เนื้อค่อนข้างนิ่ม และมีอยู่ปริมาณมาก

2. ส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ด ซึ่งมีลักษณะเป็นสีแดงจัด เป็นเยื่อบาง ๆ ล้อมรอบเมล็ดบริเวณกลางผล เมื่อสัมผัสจะมีลักษณะลื่นเหมือนมีไขมันเคลือบอยู่

3. ส่วนของเมล็ด มีลักษณะเป็นทรงกลมแบน มีสีดำ ขนาดใหญ่ และมีอยู่เป็นจำนวนมากในฟักข้าว 1 ผล

4. ส่วนของเปลือกผล เปลือกของฟักข้าวค่อนข้างบาง มีลักษณะคล้ายหนามอยู่โดยรอบ สีส้มแดง และเมื่อผลฟักข้าวสุกเปลือกของฟักข้าวจะนิ่มลง



ภาพที่ 4.2 ส่วนต่าง ๆ ของผลฟักข้าวสุก (A) เนื้อผล (B) เยื่อหุ้มเมล็ด (C) เมล็ด และ (D) เปลือก

2. การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของผลฟักข้าวสุก

นำส่วนต่าง ๆ ของผลฟักข้าวสุกทั้ง 4 ส่วนมาทำการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ ความชื้น ไขมัน เส้นใย เถ้า โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีการของ AOAC., 2000 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่า ในเนื้อผลฟักข้าวมีปริมาณความชื้นสูงที่สุด รองลงมาคือเยื่อหุ้มเมล็ด และเปลือก อยู่ที่ร้อยละ 90, 83.48 และ 75.85 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ แสดงว่าผลฟักข้าวสุกจะมีน้ำเป็นองค์ประกอบเป็นส่วนใหญ่ และมีอยู่มากในส่วนของเนื้อผล เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันจะพบว่ามีอยู่ในส่วนของเมล็ดและเยื่อหุ้มเมล็ดเท่านั้น ซึ่งมีอยู่ร้อยละ 31.76 และ 11.20 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนในเนื้อและเปลือกของฟักข้าวมีปริมาณไขมันอยู่น้อยมากหรือแทบจะไม่มีไขมันอยู่เลย โดยสารไลโคปีนจะเกิดการสูญเสียได้อย่างรวดเร็วเมื่อสัมผัสอากาศ และแสง (Topal et al., 2006) แต่จะละลายได้ดีมากในไขมัน เนื่องจากไลโคปีนเป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม hydrophobic ซึ่งละลายน้ำได้น้อยมาก (Ishida & Chapman, 2009) ดังนั้นจะสามารถพบสารไลโคปีนในส่วนของฟักข้าวที่มีไขมันได้มากกว่าส่วนของฟักข้าวที่ไม่มีไขมัน ปริมาณเส้นใยหยาบพบในเปลือกของฟักข้าวเป็นส่วนใหญ่สูงถึงร้อยละ 58.09 โดยน้ำหนักแห้ง เนื่องจากที่เปลือกของพืชชั้นสูงโดยทั่วไปจะพบเส้นใยอยู่ในส่วนของผนังเซลล์ ซึ่งเส้นใยเหล่านี้มีหน้าที่ช่วยให้ความแข็งแรงแก่พืช รวมถึงช่วยพยุงลำต้นให้มี

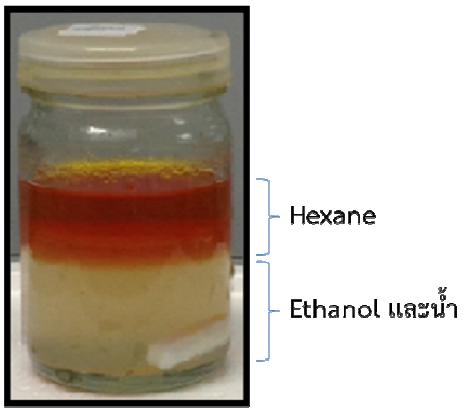
ลักษณะตั้งตรงและแข็งแรง รองลงมาคือเมล็ดฟักข้าวมีอยู่ที่ร้อยละ 39.69 โดยน้ำหนักแห้ง ปริมาณเถ้าพบมาที่เนื้อผล และเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว ซึ่งมีอยู่ร้อยละ 18.48 และ 14.55 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ปริมาณโปรตีนพบมากในเมล็ด อยู่ที่ร้อยละ 22.81 โดยน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือเยื่อหุ้มเมล็ด และเนื้อผล สำหรับปริมาณคาร์โบไฮเดรตจะพบมากในเนื้อผลและเยื่อหุ้มเมล็ดซึ่งมีค่าที่ใกล้เคียงกัน คือร้อยละ 54.81 และ 53.87 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 คุณค่าทางโภชนาการของส่วนต่าง ๆ ของผลฟักข้าวสุก

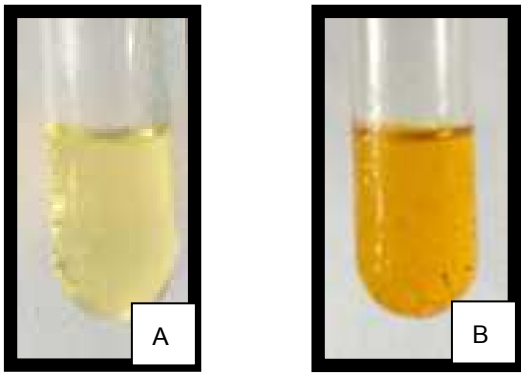
ส่วนของผลฟักข้าว	คุณค่างทางโภชนาการ (ร้อยละในตัวอย่างน้ำหนักแห้ง)					
	ความชื้น	**ไขมัน**	**เส้นใยหยาบ**	**เถ้า**	**โปรตีน**	**คาร์โบไฮเดรต**
เนื้อผล	90.00±0.19	0.33±0.41	15.20±0.85	18.48±0.46	11.18±0.20	54.81
เยื่อหุ้มเมล็ด	83.48±0.89	11.20±0.19	6.18±0.15	14.55±1.99	14.20±0.32	53.87
เมล็ด	27.97±0.28	31.76±3.00	39.69±0.20	2.54±0.14	22.81±0.49	3.20
เปลือกผล	75.85±0.81	0.26±0.18	58.09±0.61	7.37±0.02	9.05±0.31	25.23

3. การวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีน

ทำการวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีนเบื้องต้นที่มีในผลฟักข้าวสุก โดยเลือกเฉพาะส่วนที่มีสีเหลือง สีส้ม และสีแดง เนื่องจากไลโคปีนเป็นรงควัตถุที่ให้สีส้มแดง ดังนั้นบริเวณที่มีสีส้มแดงจึงคาดว่าจะมีปริมาณไลโคปีนสูง ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการเลือกส่วนของเนื้อผลและเยื่อหุ้มเมล็ดมาทำการวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีนเบื้องต้นเท่านั้น ด้วยการสกัดโดยตัวทำละลายเอทานอลและเฮกเซนซึ่งเป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดไลโคปีน (Taungbodhitham et al., 1998) โดยหลังจากทำการสกัดด้วยตัวทำละลายจะได้สารสกัดที่มีลักษณะดังแสดงในภาพที่ 4.3

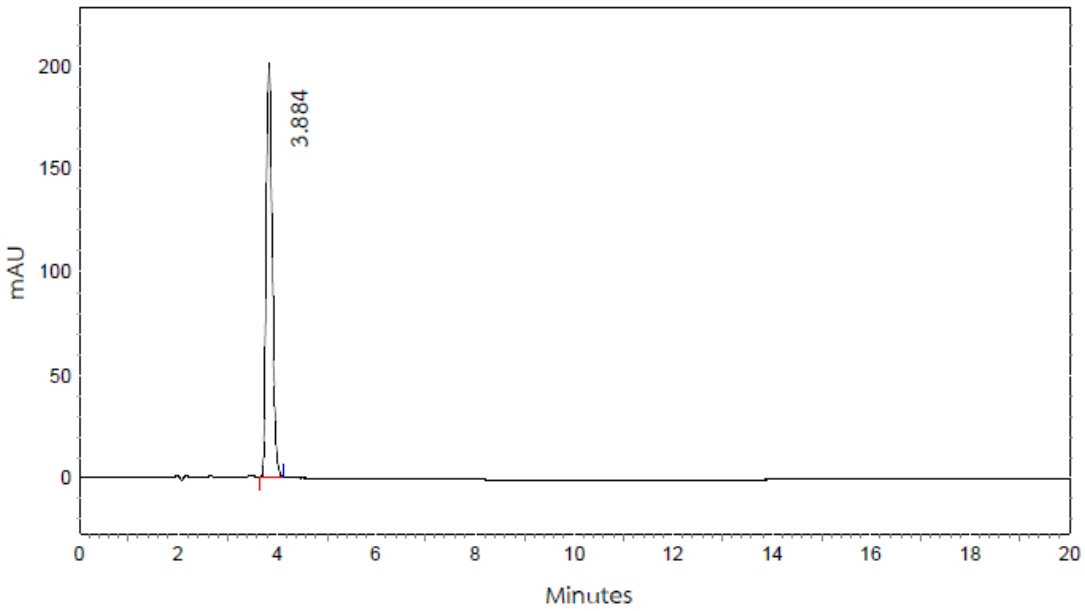


ภาพที่ 4.3 ลักษณะการแยกชั้นในตัวทำละลายเอทานอลและเฮกเซนโดยใช้เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว



ภาพที่ 4.4 สารสกัดไลโคปีนในตัวทำละลายเฮกเซนโดย
(A) เนื้อผลฟักข้าว (B) เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว

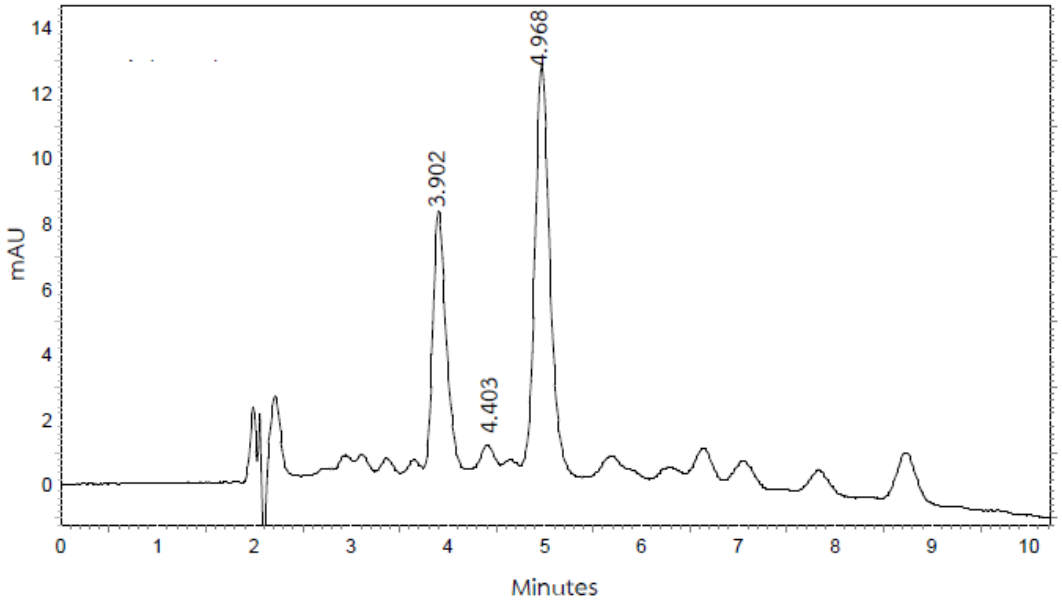
สารสกัดจะแยกชั้นกันโดยไลโคปีนจะอยู่ในชั้นของเฮกเซนที่อยู่ด้านบน ส่วนชั้นล่างจะมีสีขาวขุ่นซึ่งเป็นชั้นของตัวทำละลายเอทานอลและน้ำ ในชั้นของเฮกเซนจะมีสีเหลืองเมื่อใช้ส่วนของเนื้อผลในการสกัด และมีสีส้มแดงเมื่อใช้ส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดในการสกัด (ดังแสดงในภาพที่ 4.4) หลังจากนั้นนำสารสกัดไลโคปีนที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีนด้วยเครื่อง HPLC โดยเทียบกับสารมาตรฐานแบบ external standard สารมาตรฐานไลโคปีนที่วิเคราะห์ได้ดังแสดงในภาพที่ 4.5 ซึ่งพีคของไลโคปีนจะออกมาที่เวลา (retention time) 3.884 นาที



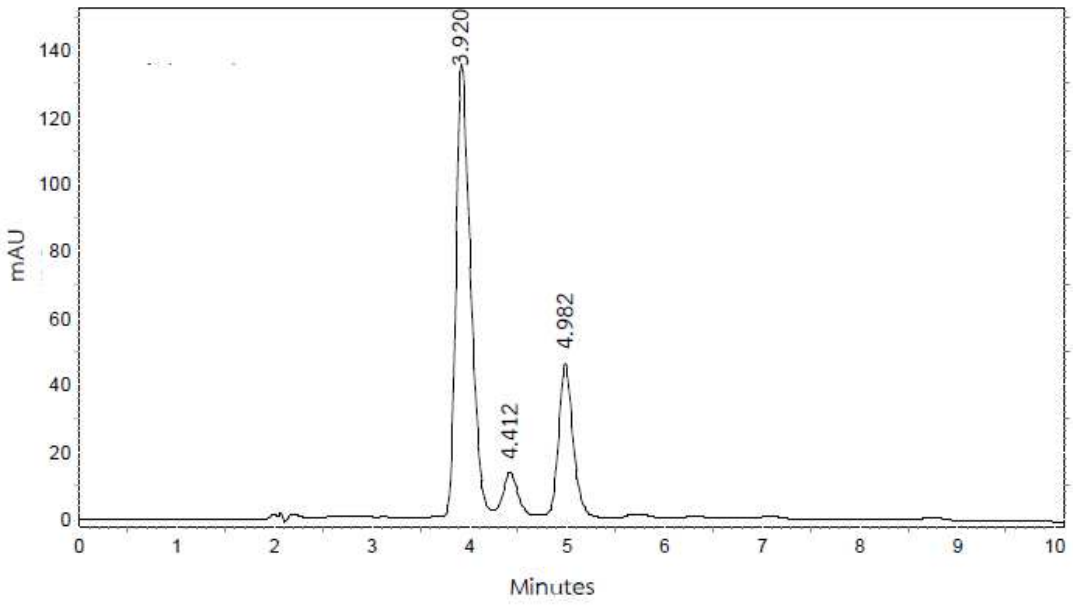
ภาพที่ 4.5 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานไลโคปีน

และเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีนในส่วนของเนื้อผลและเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4.6-4.7 ซึ่งในภาพที่ 4.6 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดไลโคปีนในส่วนของเนื้อผลฟักข้าว พบว่า มีพีคเกิดขึ้นหลายพีค อาจเป็นเพราะสารไลโคปีนมีปริมาณค่อนข้างน้อย ทำให้เห็นพีคของ

สารประกอบปริมาณน้อยอื่น ๆ ได้ง่ายขึ้น โดยพีคที่สนใจมี 3 พีคออกมาที่เวลา 3.902, 4.403 และ 4.968 ซึ่งทั้ง 3 พีคพบได้เช่นกันในภาพที่ 4.7 (โครมาโทแกรมของสารสกัดไลโคปีนในส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว) ที่เวลา 3.920, 4.412 และ 4.982 โดยพีคที่เวลา 3.902 (ภาพที่ 4.6) และ 3.920 (ภาพที่ 4.7) คือพีคของสารไลโคปีนเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานไลโคปีน ทั้งเวลาที่ออกมาใกล้เคียงและสเปคตรัมที่เหมือนกับสารมาตรฐานไลโคปีน (ภาคผนวกค.1 และ ค.2) ซึ่งความสูงและพื้นที่ใต้พีคของสารไลโคปีนในเนื้อผลฟักข้าวจะมีปริมาณน้อยกว่าสารไลโคปีนในเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว และพีคที่เวลา 4.403 (ภาพที่ 4.6) และเวลา 4.412 (ภาพที่ 4.7) น่าจะเป็นสารไลโคปีนในแบบ cis-form โดยปกติในธรรมชาติสารไลโคปีนจะอยู่ในรูป trans-isomeric form แต่หากผ่านกระบวนการที่ใช้ความร้อน หรือการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น จะมีผลทำให้สารไลโคปีนบางส่วนเปลี่ยนเป็น cis-form ได้ (Topal et al., 2006) สำหรับพีคที่ 3 ที่เวลา 4.968 (ภาพที่ 4.6) และเวลา 4.982 (ภาพที่ 4.7) คาดว่าน่าจะเป็น β-carotene ซึ่งมักพบเมื่อทำการสกัดสารไลโคปีนทั้งในฟักข้าว, มะเขือเทศ และผักที่มีสีส้มแดง (Aoki et al., 2002, Kubola & Siriamornpun, 2011, Kha et al., 2013, Kubola et al., 2013, Topal et al., 2006 และ Barba et al., 2006) และเมื่อทำการตรวจสอบสเปคตรัมพบว่าลักษณะของสเปคตรัมของพีคที่ 3 (ภาคผนวก ค.3) เหมือนกับสเปคตรัมของ β-carotene (Nhung et al., 2010 และ Hoang et al., 2011) ซึ่งปริมาณ β-carotene จะพบมากกว่าปริมาณไลโคปีนในเนื้อผลฟักข้าวแต่ปริมาณ β-carotene จะพบได้น้อยกว่าปริมาณ ไลโคปีนในเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว สอดคล้องกับงานวิจัยของ Aoki et al., 2002 ซึ่งพบว่า ในเนื้อฟักข้าวจะมีปริมาณไลโคปีนอยู่ 0.91 μg/g และ β-carotene อยู่ 22.1 μg/g แต่ในทางตรงกันข้าม เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวจะพบไลโคปีนมากกว่า ซึ่งมีอยู่ประมาณ 380 μg/g และ β-carotene อยู่ 101 μg/g



ภาพที่ 4.6 โครมาโทแกรมของสารสกัดไลโคปีนในส่วนของเนื้อผลฟักข้าว



ภาพที่ 4.7 โครมาโทแกรมของสารสกัดไลโคปีนในส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว

ปริมาณไลโคปีนในส่วนของเนื้อผลและเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวแสดงในตารางที่ 4.2 โดยในเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวที่มีสีแดงสดมีปริมาณไลโคปีน 925.75 μg/g มากกว่าในส่วนของเนื้อผล (30.89 μg/g) อยู่ถึง 30 เท่า ดังนั้นในการศึกษาวิธีการสกัดไลโคปีนจากฟักข้าว จึงเลือกตัวอย่างที่มาทำการสกัดคือ เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวสุกเท่านั้น เพราะเป็นส่วนที่ให้ปริมาณไลโคปีนสูงที่สุด

ปริมาณไลโคปีนที่ตรวจพบมีปริมาณมากกว่าในงานวิจัยของ Aoki et al., 2002 (380 μg/g) แต่มีปริมาณน้อยกว่างานวิจัยของ Ishida et al., 2004 (3.053 mg/g) และ Nhung et al., 2010 (2.378 mg/g) อาจเนื่องมาจากใช้ตัวทำละลายในการสกัด วิธีการสกัด แหล่งปลูกและสายพันธุ์ฟักข้าวที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.2 ปริมาณไลโคปีนในส่วนต่าง ๆ ของผลฟักข้าวสุก

ผลฟักข้าว	ปริมาณไลโคปีน (μg/g)
เนื้อผล	30.89
เยื่อหุ้มเมล็ด	925.75

การศึกษาวิธีการสกัดสารไลโคปีนจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว

1. การสกัดไลโคปีนด้วยการใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์

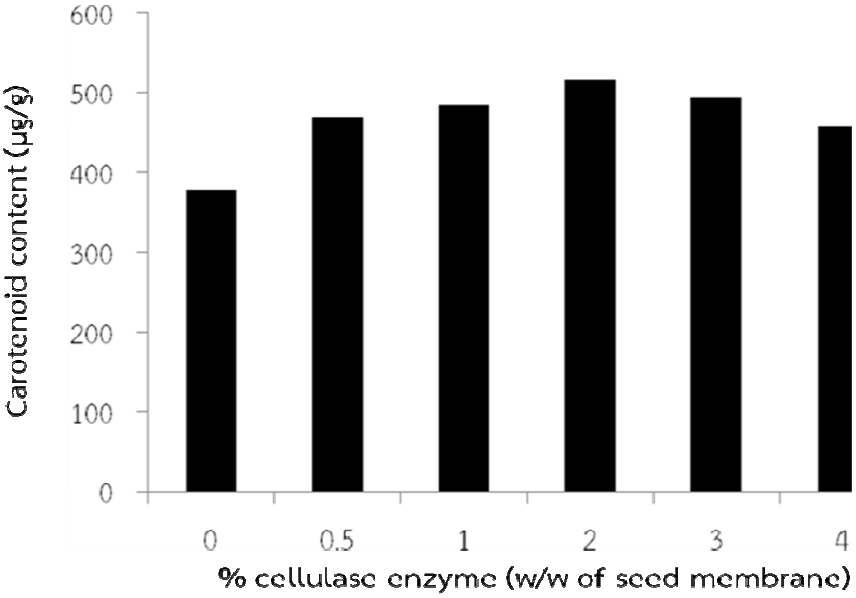
ขั้นตอนการทดลองในการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ต่อการสกัดไลโคปีน ได้ทำการตรวจวัดปริมาณไลโคปีน ซึ่งอยู่ในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ (carotenoids)

โดยใช้เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 472 nm ตามวิธีของ Choudhari & Ananthanarayan, 2007 ซึ่งใช้ค่าสัมประสิทธิ์จำเพาะ (extinction coefficient) เท่ากับ 3450 เมื่อใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายและ blank (Toor et al., 2006) เนื่องด้วยเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วต่อการตรวจวัดปริมาณไลโคปีน แต่ปริมาณไลโคปีนที่ได้อาจไม่ใช่ปริมาณไลโคปีนที่แท้จริง เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์จำเพาะที่ใช้ในการคำนวณจากเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer เป็นค่าที่อ้างอิงจากงานวิจัยที่เคยทำไว้ก่อนหน้านี้ ไม่ได้มีการคำนวณหาจากการทดลองด้วยตนเอง แต่เป็นเทคนิคที่ทำให้ทราบถึงแนวโน้มของปริมาณสารในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ และสามารถนำข้อมูลที่ได้มาพิจารณาเลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดสารไลโคปีนต่อไป สำหรับการศึกษาตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการสกัดไลโคปีน ได้ตรวจวัดปริมาณไลโคปีนด้วยเครื่อง HPLC โดยเทียบกับสารมาตรฐานไลโคปีนแบบ external standard ทำให้ทราบปริมาณไลโคปีนที่แน่นอนและแม่นยำ โดยค่าที่ได้จะเป็นค่าปริมาณไลโคปีนที่แท้จริงที่ได้จากการทดลอง

1.1 ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการสกัดไลโคปีน

ความเข้มข้นของเอนไซม์ cellulase และ pectinase ที่ใช้ในการศึกษา คือ 0, 0.5, 1, 2, 3 และ 4% w/w ของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว ซึ่งความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาและทำให้ได้สารไลโคปีนที่มีปริมาณมากที่สุด โดยในการทดลองได้กำหนดให้ความเข้มข้นของสารตั้งต้น (substrate) คือเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวคงที่ และเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ขึ้นเรื่อย ๆ ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ส่งผลต่อการสกัดไลโคปีนจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว ดังแสดงในภาพที่ 4.7 และ 4.8 เอนไซม์ cellulase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารตั้งต้นโดยมีน้ำในปฏิกิริยา (hydrolytic enzyme) ที่ระดับความเข้มข้นที่ 2% w/w จะสามารถสกัดปริมาณสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุดถึง 516.80 μg/g (136 %) ดังแสดงในตารางที่ 4.3 โดยในช่วงแรก (0-2% w/w) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ ปริมาณสารในกลุ่มของแคโรทีนอยด์จะเพิ่มขึ้น จนถึงที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 2% w/w หลังจากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ขึ้น ปริมาณสารในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ไม่ได้เพิ่มขึ้นอีก ดังนั้นการใส่เอนไซม์ cellulose ที่ความเข้มข้น 2% w/w จึงเพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยาเมื่อใช้เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวปริมาณ 2 กรัม เอนไซม์ cellulase จะทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสที่อยู่ในเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว และได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นกลูโคส เซลลูไบโอส และพอลิเมอร์ของกลูโคส

ผลที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Choudhari & Ananthanarayan, 2007 ซึ่งพบว่าเอนไซม์ cellulase ที่ระดับความเข้มข้น 3% w/w ของเปลือกมะเขือเทศ จะให้ประสิทธิภาพในการสกัดไลโคปีนออกมาได้สูงที่สุดถึง 424 μg/g



ภาพที่ 4.8 ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดด้วยเอนไซม์ cellulase ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

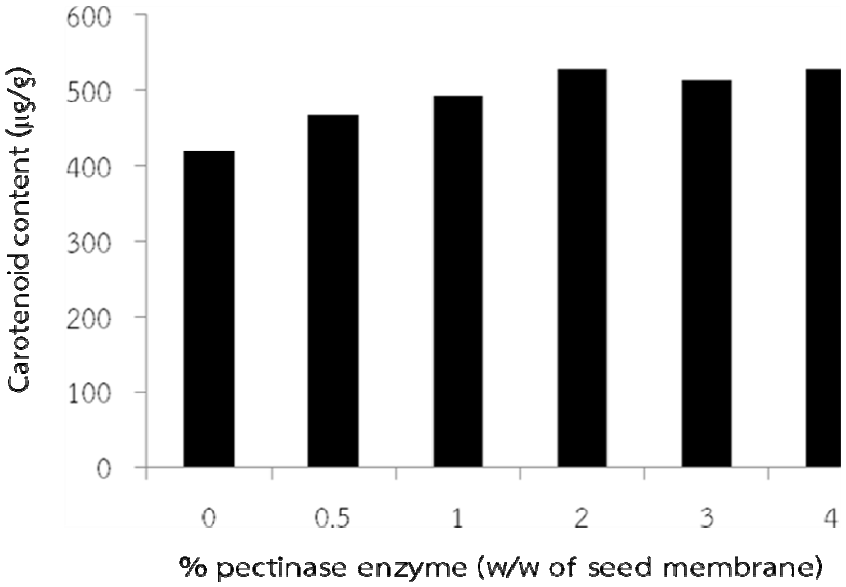
ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

ความเข้มข้นของเอนไซม์ cellulase (% w/w ของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว)	ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (µg/g)
0	379.53
0.5	468.98
1	483.88
2	516.80
3	493.20
4	456.55

สำหรับเอนไซม์ pectinase ที่ระดับความเข้มข้นที่ 2% w/w มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการสกัดสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ ดังแสดงในภาพที่ 4.8 ซึ่งจะให้ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ออกมาสูงถึง 527.36 µg/g (126 %) ดังแสดงในตารางที่ 4.4 โดยในช่วงแรก (0-2% w/w) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์จะเพิ่มขึ้น จนถึงที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 2% w/w หลังจากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ขึ้น ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ไม่ได้เพิ่มขึ้นอีก แต่เริ่มคงที่ ดังนั้นการใส่เอนไซม์ pectinase ที่ความเข้มข้น 2% w/w จึงเพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยา และทำให้ได้ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์มากที่สุด หากใส่เอนไซม์มากกว่า 2% w/w ไม่ได้ทำให้เกิดปฏิกิริยาเพิ่มมากขึ้น แต่จะเป็นการสิ้นเปลืองเอนไซม์ เอนไซม์ pectinase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยเพคตินและอนุพันธ์ของเพคติน ซึ่งมีพอลิเมอร์ของ galacturonic acids อยู่ประมาณ

100-200 units ซึ่งพบได้ในผนังเซลล์ของพืชชั้นสูงและชั้นระหว่างเซลล์ของพืช (Choudhari & Ananthanarayan, 2007)

ผลที่ได้มีสอดคล้องกับงานวิจัยของ Choudhari & Ananthanarayan, 2007 ซึ่งพบว่าเอนไซม์ pectinase ที่ระดับความเข้มข้น 2% w/w ของเปลือกมะเขือเทศ จะให้ประสิทธิภาพในการสกัดไลโคปีนออกมาได้สูงที่สุดถึง 712 µg/g



ภาพที่ 4.9 ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดด้วยเอนไซม์ pectinase ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

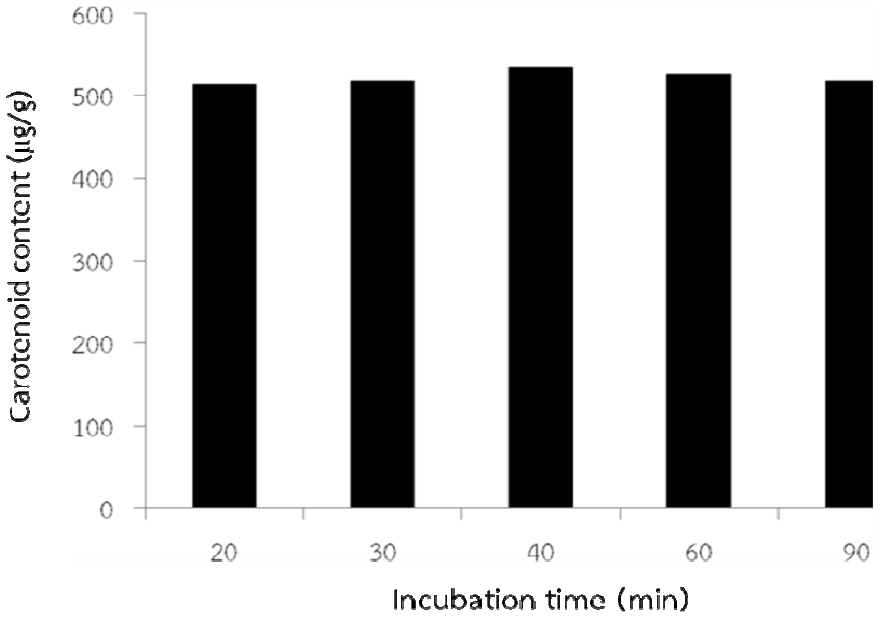
ตารางที่ 4.4 ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ pectinase ระดับต่าง ๆ

ความเข้มข้นของเอนไซม์ pectinase (% w/w ของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว)	ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (µg/g)
0	419.28
0.5	468.35
1	493.20
2	527.36
3	512.46
4	527.99

1.2 เวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ต่อการสกัดไลโคปีน

เวลาที่ใช้ในการศึกษาการย่อยเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวด้วยเอนไซม์ คือ 20, 30, 40, 60 และ 90 นาที ซึ่งผลของเวลาที่ใช้ในการย่อยเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวด้วยเอนไซม์ที่ส่งผลต่อการสกัดสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ ดังแสดงในรูปที่ 4.9 และ 4.10 เอนไซม์ cellulase ที่ระดับความเข้มข้นที่ 2%

w/w ของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว ใช้เวลาในการย่อย 40 นาที ให้ปริมาณสารสกัดกลุ่มแคโรทีนอยด์สูงที่สุดถึง 534.20 μg/g ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ซึ่งเอนไซม์ cellulase จะทำการย่อยผนังเซลล์ของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว ส่งผลให้สารไลโคปีนออกมาเพิ่มมากขึ้น ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์จะคงที่และลดลงเล็กน้อยเมื่อเพิ่มเวลาในบ่มด้วยเอนไซม์มากขึ้น อาจเนื่องมาจากประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาได้สูงสุดที่ 40 นาที และการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ระหว่างการบ่มด้วยเอนไซม์ โดยไลโคปีนเป็นสารที่สูญเสียได้ง่ายโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน เมื่อสัมผัสกับออกซิเจนและแสง

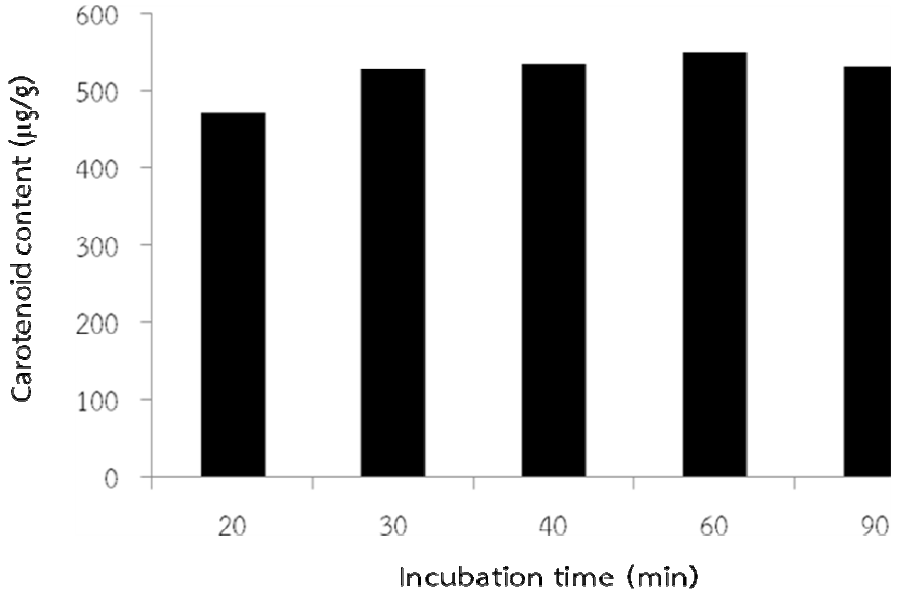


ภาพที่ 4.10 ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดด้วยเอนไซม์ cellulase ที่ระยะเวลาในการย่อยต่าง ๆ

ตารางที่ 4.5 ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในการย่อยด้วยเอนไซม์ cellulase

ระยะเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ cellulase (นาที)	ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (μg/g)
20	513.70
30	516.80
40	534.82
60	525.50
90	516.80

สำหรับเอนไซม์ pectinase ที่ระดับความเข้มข้นที่ 2% w/w ของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว ใช้เวลาในการย่อย 60 นาที ให้ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์สูงที่สุดถึง 548.48 μg/g ดังแสดงในตารางที่ 4.6 เวลาในการย่อยเพิ่มมากขึ้นจะทำให้ได้ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ย่อยสลายเซลล์พืชทำให้สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชสามารถละลายออกมาได้เพิ่มมากขึ้น



ภาพที่ 4.11 ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดด้วยเอนไซม์ pectinase ที่ระยะเวลาในการย่อยต่าง ๆ

ตารางที่ 4.6 ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในการย่อยด้วยเอนไซม์ pectinase

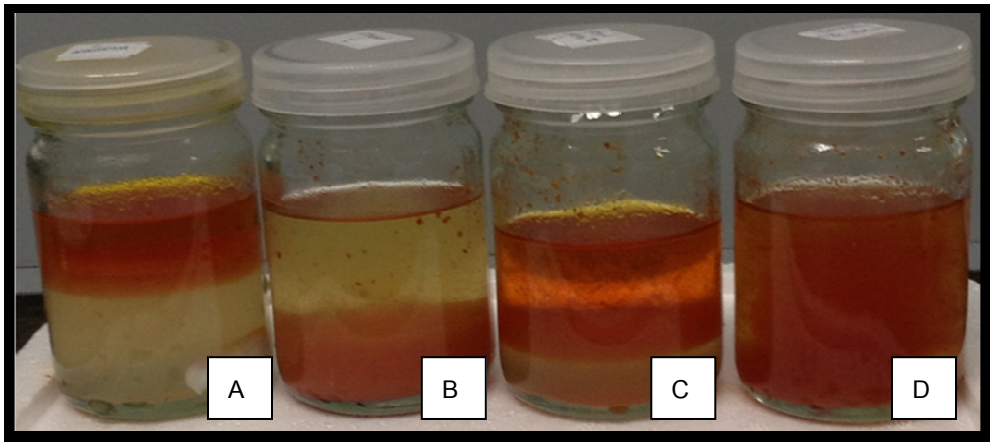
ระยะเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ pectinase (นาที)	ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (μg/g)
20	417.46
30	527.36
40	534.20
60	548.48
90	530.47

Choudhari & Ananthanarayan, 2007 พบว่า เอนไซม์ cellulase และ pectinase จะใช้เวลาเพียง 15 และ 20 นาทีตามลำดับ ในการบ่มเพื่อย่อยมะเขือเทศทั้งลูก และทำให้ได้สารไลโคปีนออกมามากที่สุด แต่เมื่อใช้เวลาในการบ่มด้วยเอนไซม์นานขึ้น จะส่งผลให้สารไลโคปีนที่สกัดได้ลดต่ำลงอย่างชัดเจน

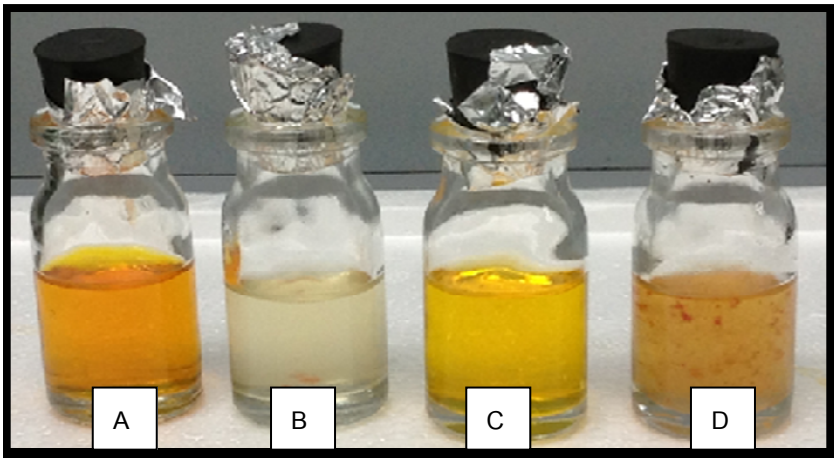
Kanyakam & Uriyapongson, 2010 พบว่า การใช้เอนไซม์ทางการค้า 2 ชนิด ชื่อ EnzA และ EnzB ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ pectinase, cellulase และ hemicellulase จะใช้เวลาในการย่อยผงมะเขือเทศซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมทำมะเขือเทศเข้มข้นที่ 50 นาที สำหรับ EnzA และ 60 นาที สำหรับ EnzB และได้สารไลโคปีนสูงที่สุด 30.14 และ 29.95 mg/100g ตัวอย่างตามลำดับ

1.3 ตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการสกัดไลโคปีน

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตด เอทิลแลตเตด และเอทานอล โดยเมื่อพิจารณาจากความมีขั้วจะเรียงลำดับได้ดังนี้ เฮกเซน < เอทิลอะซิเตด < เอทิลแลตเตด < เอทานอล ซึ่งเฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว และเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วมากที่สุด โดยมีค่า dielectric constant ที่ 20°C เท่ากับ 1.89 < 6.4 < 13.1 < 24.3 (25°C) ตามลำดับ ยกเว้นเอทานอลที่ 25°C (www.instrumatics.co.nz) โดยทั่วไปการสกัดสารที่ไม่มีขั้วนิยมใช้เฮกเซน เนื่องจากเฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วเช่นกันซึ่งทำให้สารสกัดที่ไม่มีขั้วละลายออกมาได้ดีที่สุด แต่ hexane เป็นสารที่มีพิษต่อร่างกายคน ทำให้เกิดการระคายต่อดวงตา ทางเดินหายใจ และผิวหนัง หากได้รับเป็นเวลานานอาจส่งผลต่อระบบประสาทได้ (Ishida & Chapman, 2009) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดไลโคปีนโดยพิจารณาจากขั้วของตัวทำละลายและการที่ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อร่างกาย ซึ่งเอทิลอะซิเตด เอทิลแลตเตด และ เอทานอล เป็นตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าเฮกเซน แต่ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบปริมาณไลโคปีนที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดกับปริมาณไลโคปีนที่ได้จากการใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย โดยลักษณะของสารสกัดที่ได้ในตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด ที่ใช้เอนไซม์ cellulose และเอนไซม์ pectinase ในการสกัดออกมามีลักษณะเหมือนกัน ดังแสดงในภาพที่ 4.12 และเมื่อทำการแยกสารละลายที่อยู่ชั้นบนออก จะได้สารละลายดังแสดงในภาพที่ 4.13 เมื่อพิจารณาลักษณะของสารสกัดจะพบว่าเมื่อใช้เอทิลอะซิเตดเป็นตัวทำละลาย สารสกัดที่ได้จะมีการแยกชั้นกันโดยกากของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวจะตกตะกอนอยู่ด้านล่างและสารที่ให้สีส้มแดงใสจะละลายอยู่ในเอทิลอะซิเตดด้านบน (ภาพที่ 4.12C) สำหรับสารสกัดที่ใช้เอทิลแลกเตดเป็นตัวทำละลาย (ภาพที่ 4.13D) เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวที่ถูกย่อยยังคงแขวนลอยอยู่ในสารละลาย และสีที่อยู่ในเยื่อหุ้มเมล็ดออกมาในตัวทำละลายได้ไม่หมด ในทางตรงกันข้ามเมื่อใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่า ทั้งเยื่อหุ้มเมล็ดและสารสกัดที่ให้สีส้มแดงตกตะกอนอยู่ด้านล่างไม่สามารถแยกออกจากกันได้ และละลายในเอทานอลได้น้อยที่สุด (ภาพที่ 4.12B) ดังนั้นสารสกัดที่ให้สีส้มแดงออกมามากที่สุด และได้สารละลายที่มีลักษณะใส คือสารสกัดที่ใช้เอทิลอะซิเตดเป็นตัวทำละลาย และเมื่อทำการเปรียบเทียบสีของสารสกัดที่ใช้เอทิลอะซิเตดเป็นตัวทำละลาย (ภาพที่ 4.13C) กับสารสกัดที่ใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย (ภาพที่ 4.13A) พบว่าสารสกัดให้สีเหลืองส้มที่ใกล้เคียงกัน แต่ความเข้มของสีแดงที่ได้ยังคงน้อยกว่าสารสกัดที่ใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย



ภาพที่ 4.12 ลักษณะการละลายของไลโคปีนจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวในตัวทำละลาย
(A) เฮกเซน (B) เอทานอล (C) เอทิลอะซิเตด (D) เอทิลแลกเตด



ภาพที่ 4.13 สารสกัดไลโคปีนจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวโดยใช้ตัวทำละลาย
(A) เฮกเซน (B) เอทานอล (C) เอทิลอะซิเตด (D) เอทิลแลกเตด

สำหรับปริมาณไลโคปีนที่ได้จากการตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC จากสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด ร่วมกับเอนไซม์ cellulase และ pectinase แสดงในภาพที่ 4.14 และตารางที่ 4.7 พบว่า เฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการนำมาใช้สกัดสารไลโคปีนจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว เพราะเฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำที่สุด ซึ่งเมื่อใช้เฮกเซนร่วมกับการใช้เอนไซม์จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด โดยสามารถสกัดไลโคปีนได้ถึง 2224.26 μg/g เมื่อใช้เอนไซม์ cellulase และ 2386.01 μg/g เมื่อใช้เอนไซม์ pectinase ในการสกัด ซึ่งประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นถึง 240% และ 257% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเพียงชนิดเดียว (925.75 μg/g) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อใช้เอทิลอะซิเตดร่วมกับการใช้เอนไซม์ก็มีความสามารถในการสกัดสารไลโคปีนได้เช่นกัน ถึงแม้ว่าปริมาณไลโคปีนที่ได้จะลดต่ำกว่าใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายประมาณ 50% โดยสกัดไลโคปีนได้ 954.25 และ 1363.43 μg/g เมื่อใช้สกัดร่วมกับเอนไซม์

cellulose และ pectinase ตามลำดับ แต่เอทิลอะซิเตดเป็นตัวทำละลายที่ไม่ก่อให้เกิดสารพิษ สามารถนำสารที่สกัดได้มาใช้กับอาหารได้ เอทิลอะซิเตดจึงเป็นตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจนำมาใช้สกัดสารไลโคปีนได้ สำหรับเอทิลแลกเตดและเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้สกัดไลโคปีนร่วมกับการใช้เอนไซม์ เนื่องจากสารไลโคปีนที่สกัดได้ค่อนข้างน้อย โดยเฉพาะเมื่อใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ปริมาณไลโคปีนที่ได้ต่ำมากที่สุด โดยสกัดได้เพียงประมาณ 6.59-6.61 μg/g

ภาพที่ 4.14 ปริมาณสารไลโคปีนที่สกัดด้วยเอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

ตารางที่ 4.7 ปริมาณไลโคปีนที่สกัดได้ที่ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างชนิดกัน

ชนิดของเอนไซม์	ชนิดของตัวทำละลาย	ปริมาณไลโคปีน (μg/g)
cellulase	เฮกเซน	2224.26
	เอทิลอะซิเตด	945.25
	เอทิลแลกเตด	432.96
	เอทานอล	6.61
pectinase	เฮกเซน	2386.01
	เอทิลอะซิเตด	1363.43
	เอทิลแลกเตด	457.4
	เอทานอล	6.59

จากผลการทดลองด้วยเทคนิคการสกัดด้วยเอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลาย พบว่า เอนไซม์ pectinase เป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวได้ดีกว่าเอนไซม์ cellulase

ในทุกตัวทำละลาย ยกเว้นเอทานอลที่ให้ผลที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งประสิทธิภาพของเอนไซม์ pectinase จะย่อยได้ดีกว่าเอนไซม์ cellulase ที่ 6.78, 30 และ 5.43% เมื่อใช้เฮกเซน เอทิลอะซิเตด และเอทิลแลกเตด เป็นตัวทำละลายตามลำดับ

Ishida & Chapman, 2009 ได้ทำการศึกษาการสกัดสารกลุ่มแคโรทีนอยด์จากพืช พบว่าเอทิลแลกเตดเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดทั้ง trans- และ cis-lycopene isomers จากผงมะเขือเทศ โดยจะมีการเติม α-tocopherol และ β-lipolic acid เป็นสารป้องกันการเกิด oxidation

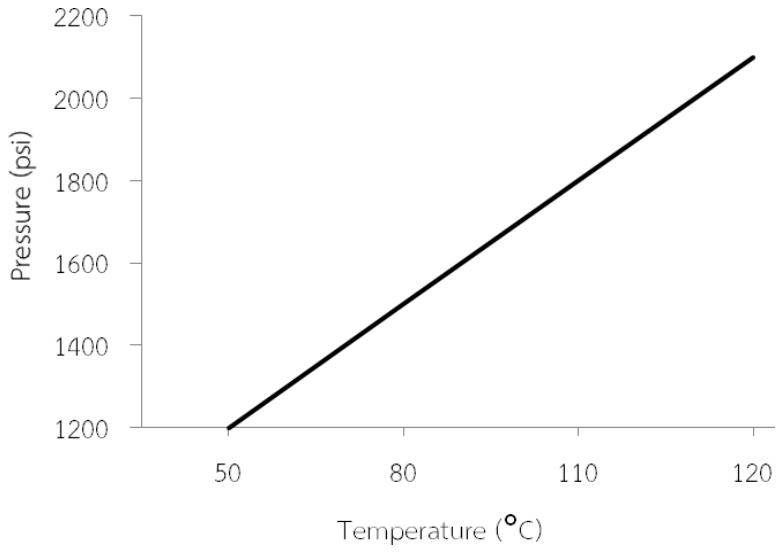
Kanyakam & Uriyapongson, 2010 ได้ศึกษาการใช้เอนไซม์สกัดร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ เอทิลอะซิเตด เอทานอล และไดเอทิลอีเทอร์ พบว่า การใช้เอนไซม์ EnzA ที่ระยะเวลาการย่อย 50 นาที และใช้เอทิลอะซิเตดเป็นตัวทำละลาย ให้ประสิทธิภาพในการสกัดไลโคปีนจากผงมะเขือเทศสูงที่สุด ซึ่งมากถึง 50.3 mg/100 g ของผงมะเขือเทศ

Lavecchia & Zuorro, 2008 ได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดไลโคปีนจากเปลือกมะเขือเทศด้วยเทคนิคการใช้เอนไซม์ พบว่า เอนไซม์ Peclyve LI ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยา pectinolytic, cellulolytic และ hemicellulolytic เป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการสกัดไลโคปีนได้ดีที่สุด โดยใช้ร่วมกับตัวทำละลายสารผสมระหว่างเฮกเซน/เอทานอล/เอทิลอะซิเตด (50:25:25 v/v) ซึ่งจะได้ไลโคปีนสูงถึง 440.2 mg/100g ของผงมะเขือเทศ

2. การสกัดไลโคปีนด้วยการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติ

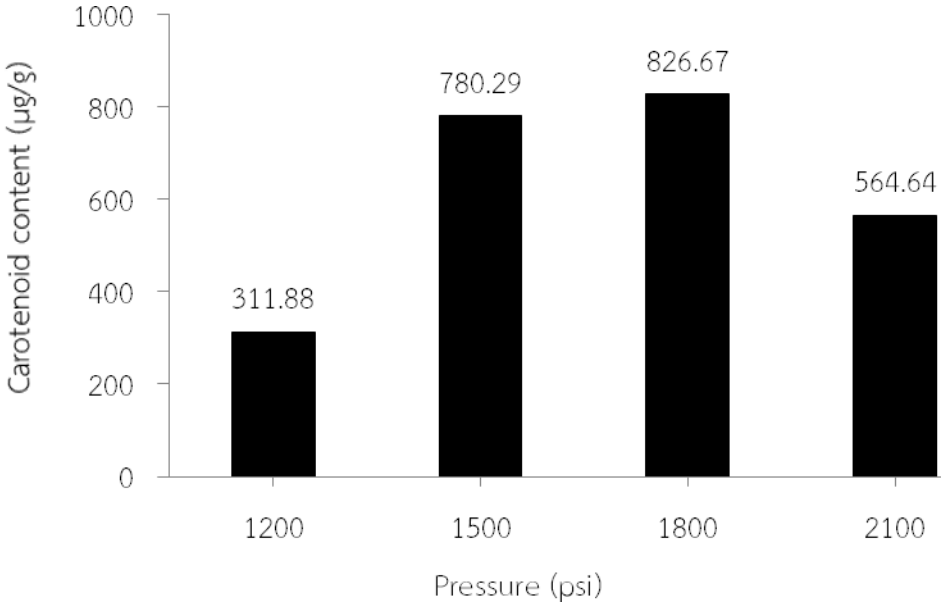
2.1 ผลของความดันต่อการสกัดไลโคปีน

ในการศึกษาการสกัดไลโคปีด้วยเทคนิคคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติร่วมกับเอทานอลที่ความดันต่าง ๆ คือ 1,200, 1,500, 1,800 และ 2,100 psi พบว่า เมื่อความดันในการสกัดเพิ่มขึ้น อุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างความดันและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดแสดงในภาพที่ 4.15



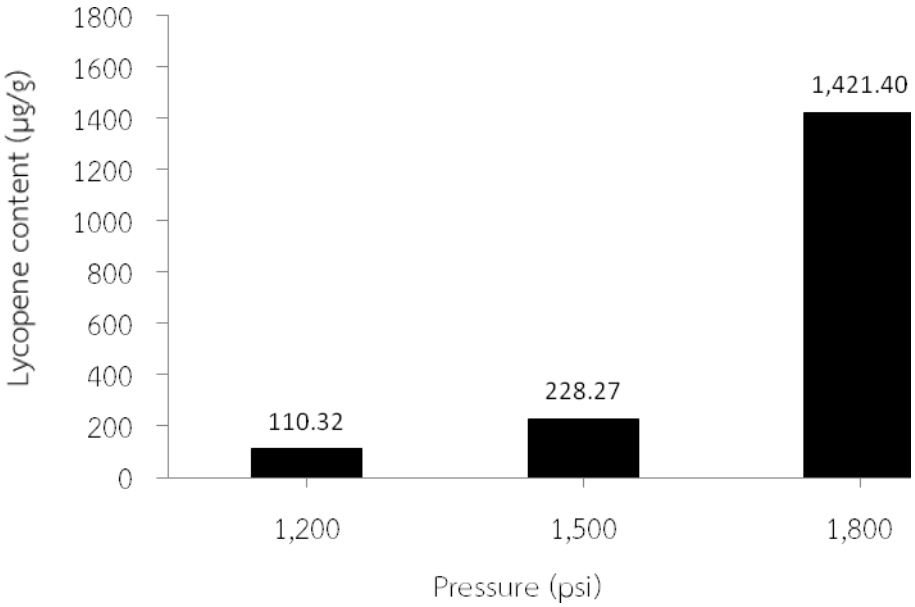
ภาพที่ 4.15 ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและความดันของคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติ

ในการศึกษาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้เบื้องต้น โดยได้นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสกัดไปวิเค ราะห์ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ผลการวิเคราะห์พบว่า เมื่อความดันเพิ่มขึ้นจาก 1200 เป็น 1500 และ 1800 psi ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์จะเพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 4.16 การที่ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นเนื่องจากการเพิ่มความดันของระบบจะทำให้ความหนาแน่นของคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้แรงดึงดูดระหว่างสารกลุ่มแคโนทีนอยด์เพิ่มขึ้นและเพิ่มความสามารถในการละลายของตัวสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ให้มากขึ้น นอกจากนี้อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะช่วยตัวละลายเกิดการระเหยเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ความดันย่อยของระบบเพิ่มขึ้น การถ่ายเทมวลสารจึงเกิดได้ดีขึ้น ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จึงเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความดันเป็น 2,100 psi พบว่าปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์จะลดลง เนื่องจากเมื่อความดันเพิ่ม อุณหภูมิจะเพิ่มขึ้น ความดันและอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวเกิดการไหม้และเปื่อยยุ่ยทำให้สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้กลับไปเกาะติดกับเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวอีกครั้ง และสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่ได้เกิดการสลายตัวเนื่องจากความร้อน จึงทำให้ได้ปริมาณสารที่สกัดได้ลดลง



ภาพที่ 4.16 ปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติที่ความดันต่าง ๆ

ในการศึกษาขั้นต่อมาได้คัดเลือกสารสกัดที่ได้จากการสกัดที่ความดัน 1200 – 1800 psi ไปตรวจสอบปริมาณสารไลโคปีนด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เทียบกับสารมาตรฐานไลโคปีน แบบ external standard พบว่า เมื่อความดันเพิ่มขึ้นจาก 1200 เป็น 1500 และ 1800 psi ปริมาณสารไลโคปีนจะเพิ่มขึ้น โดยที่ความดัน 1800 psi ให้ปริมาณสารไลโคปีนสูงสุดถึง 1421.40 µg/g ซึ่งปริมาณไลโคปีนเพิ่มขึ้น 84% จากความดัน 1500 psi ผลการทดลอง ดังแสดงในภาพที่ 4.17



ภาพที่ 4.17 ปริมาณสารไลโคปีนที่สกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติที่ความดันต่าง ๆ

ซึ่งผลการทดลองจากการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ John et al., 2009 ซึ่งศึกษาผลของความดันและอุณหภูมิที่มีต่อความสามารถในการละลายของสารไลโคปีนในคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติ ซึ่งพบว่า ที่อุณหภูมิ 50–70 °C และความดัน 200- 400 bar ความสามารถในการละลายของสารไลโคปีนเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและความดัน แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 80 °C ความสามารถในการละลายของสาร ไลโคปีนจะลดลงอย่างมากเนื่องจากการสลายตัวของไลโคปีนเนื่องจากความร้อน

Egydio et al., 2010 ซึ่งทำการสกัดสารไลโคปีนจากน้ำมะเขือเทศด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติ ซึ่งพบว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 40 °C เป็น 80 °C ที่ความดันคงที่ 200 bar ปริมาณสารไลโคปีนที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้นจาก 7.7% เป็น 72.1% และเมื่อเพิ่มความดันเป็น 350 bar ที่อุณหภูมิ 80 °C ปริมาณสารไลโคปีนที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้น เป็น 76.9%

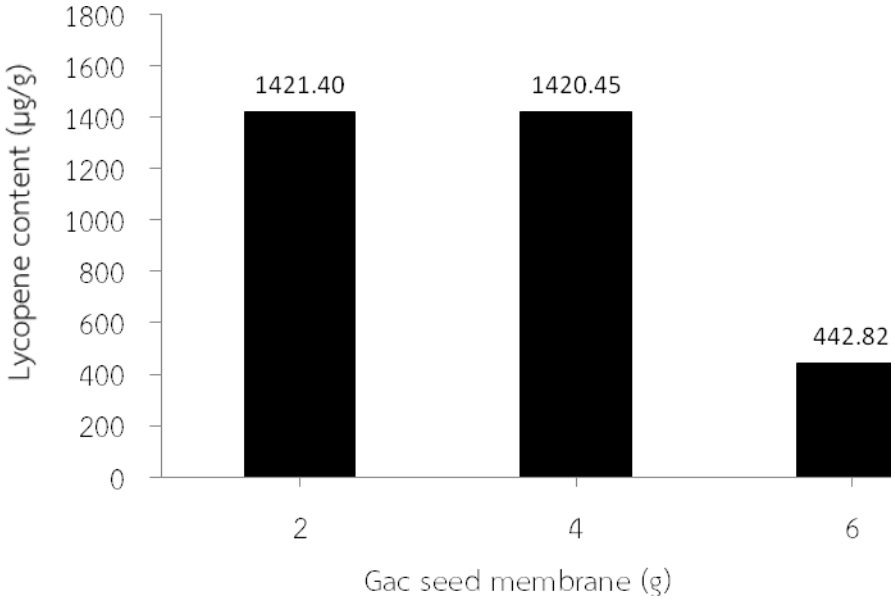
Kassama et al., 2008 ที่ศึกษาการสกัดไลโคปีนจากเปลือกมะเขือเทศด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติร่วมกับเอทานอล ซึ่งพบว่า ที่ความดันและอุณหภูมิระดับปานกลางที่ 6300 psi และ 62°C จะให้ปริมาณไลโคปีนที่สักดได้สูงสูด 23 µg/g ปริมาณไลโคปีนที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความดันและอุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้สารไลโคปีนลดลง เนื่องจากการปล่อยให้สารไลโคปีนอยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงจะทำให้เกิดการสลายตัวของไลโคปีนเนื่องจาก thermolytic effect

Choudhari & Singhal, 2008 ได้สกัดสารไลโคปีนจาก Mated cultures of Blakeslea trispora NRRL 2895 and 2896 พบว่า ปริมาณไลโคปีนสูงสุด 92% จะได้จากการสกัดที่ 45 °C ความดัน 350 bar ใช้เวลา 1 ชั่วโมง แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 65 °C และความดัน 400 bar ใช้เวลา

1.5 ชั่วโมง ปริมาณไลโคปีนที่ได้จากการสกัดจะลดลงเหลือ 65% เนื่องจากไลโคปีนเป็นสารที่ไวต่อความร้อน เมื่อสภาวะการสกัดมีอุณหภูมิและความดันสูงสารไลโคปีนจะเกิดการสลายตัวได้ง่าย

2.2 ผลของปริมาณเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวต่อการสกัดไลโคปีน

ในการศึกษาการสกัดสารไลโคปีนด้วยเทคนิคคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติที่ความดัน 1800 psi โดยเปลี่ยนปริมาณเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวจาก 2 กรัม เป็น 4 และ 6 กรัม พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวจาก 2 กรัม เป็น 4 กรัม ปริมาณสารไลโคปีนที่สกัดได้จะลดลง 0.07 % แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวเป็น 6 กรัม พบว่าปริมาณสารไลโคปีนลดลง 68.85 % ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.18 การลดลงของปริมาณไลโคปีนอาจมีผลเนื่องมาจากในขั้นตอนการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากระบบเมื่อสกัดเสร็จเรียบร้อยแล้ว ทำให้ของเหลวในระบบลดระดับลงเหลือเพียงเอทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายร่วม ทำให้สารไลโคปีนที่ได้จากการสกัดบางส่วนจะไปติดกับเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวอีกครั้ง เมื่อปริมาณเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวเพิ่มขึ้นโอกาสที่ ไลโคปีนจะกลับไปติดกับเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวจะเพิ่มมากขึ้น ทำให้ปริมาณไลโคปีนที่ได้ลดลง นอกจากนี้ที่สภาวะอุณหภูมิและความดันคงที่ เมื่อเพิ่มปริมาณเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวมากขึ้นปริมาณ ไลโคปีนที่ลดลงอาจเป็นผลมาจากความสามารถในการละลายของไลโคปีนในคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติลดลง



ภาพที่ 4.18 ปริมาณสารไลโคปีนที่สกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติที่ปริมาณเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวต่าง ๆ

ซึ่งผลการทดลองจากการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ John et al., 2009 ซึ่งรายงานว่าไลโคปีนเป็นสารโมเลกุลใหญ่ (MW= 536.9 $gmol^{-1}$) จึงละลายในคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติได้จำกัด มีค่าการละลายสูงสุดที่ 1.9×10^{-6} $molmol^{-1}$ ที่อุณหภูมิ 80 °C ความ

ดัน 250 bar ปริมาณสารที่เพิ่มขึ้นจะลดพื้นที่ในการเข้าทำละลายของคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติลง

Saldana et al., 2010 รายงานว่าการกำหนดปริมาณของสารตั้งต้นที่ใช้ในการสกัด จะพิจารณาว่าตัวทำละลายต้องไม่สูญเสียความสามารถในการละลายในปริมาณสารตั้งต้นที่กำหนด ต้องสามารถสกัดสารได้ในระยะเวลาที่กำหนด ต้องสามารถควบคุมการกระจายตัวของสารตั้งต้นในตัวทำละลายได้ดีและต้องมั่นใจว่าสารตั้งต้นเพียงพอที่จะทำให้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติอิ่มตัว ซึ่งในการวิจัยของ Saldana เลือกใช้ปริมาณสารตั้งต้นที่ 10 g ทำการสกัดที่ 40 °C และ 400 bar

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิคการใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์และเทคนิคการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติในการสกัดสารไลโคปีนจากผลฟักข้าว

จากผลการทดลองของเทคนิคการใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์และเทคนิคการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติ เมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบในด้านต่าง ๆ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดของทั้งสองเทคนิค

ปัจจัย	เอนไซม์ pectinase ร่วมกับตัวทำละลายต่าง ๆ		คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติ
ปริมาณเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว	2 กรัม		2 กรัม
อุณหภูมิ	60 °C		100 °C
เวลา	90 นาที		10 นาที
ตัวทำละลาย	เฮกเซน	เอทิลอะซิเตด	เอทานอล
ปริมาณไลโคปีน (µg/g)	2386.01	1363.43	1421.40

เทคนิคทั้งสองที่นำมาใช้ในการสกัดไลโคปีนจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน โดยเทคนิคการใช้เอนไซม์จะใช้เวลาที่มากกว่าเทคนิคคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติ ดังนั้นจึงต้องมีการเติมสารป้องกันการเกิด oxidation ลงไป เพื่อช่วยลดการเกิดปฏิกิริยา oxidation ในระหว่างกระบวนการสกัด แต่สำหรับเทคนิคคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติไม่ต้องใส่สารป้องกัน เนื่องจากใช้เวลาในการสกัดเพียง 10 นาที แต่อุณหภูมิในระหว่างกระบวนการสกัดค่อนข้างสูงประมาณ 100 °C อาจส่งผลทำให้ไลโคปีนเกิดการเปลี่ยนแปลง isomer หรือเกิดการสูญสลาย ทำให้ได้สารไลโคปีนที่น้อยลงได้ ทางด้านตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด เทคนิคคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติใช้เอทานอลในการละลายไลโคปีนออกมาจากพาร์รีแอกเตอร์ ซึ่งเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ไม่ก่อให้เกิดอันตราย สามารถนำมาใช้ในอาหารและเครื่องดื่มได้ ส่วนเทคนิคการใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลายนั้นหากใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายจะให้ปริมาณสารไลโคปีนออกมาในปริมาณมาก (2386.01 µg/g) แต่เฮกเซนเป็นสารที่มีพิษต่อร่างกาย หากต้องนำมาใช้ใน

ผลิตภัณฑ์อาหารต้องมีกระบวนการกำจัดเฮกเซนออกให้หมด ให้เหลือเพียงไลโคปีนเท่านั้น แต่ถ้าใช้เอทิลอะซิเตดเป็นตัวทำละลายจะได้สารไลโคปีนน้อยกว่า (1363.43 µg/g) แต่ปริมาณไลโคปีนที่ได้จะใกล้เคียงกับเทคนิคคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติ (1421.40 µg/g) ซึ่งเอทิลอะซิเตดเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของเอสเทอร์ นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร มีความปลอดภัยมากกว่าการใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย ถ้าเทียบทั้งสองเทคนิคด้วยกันจะได้ปริมาณไลโคปีนที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจะใช้เทคนิคไหนในการสกัดก็สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดไลโคปีนจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวได้ดีกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายเพียงอย่างเดียว (925.75 µg/g) และสารสกัดที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นอาหารเสริมหรือสารเติมแต่งในอาหารได้ต่อไป

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของผลฟักข้าวสุกพันธุ์พื้นเมืองนครปฐม พบว่า จะมีน้ำเป็นองค์ประกอบโดยส่วนใหญ่ และรองลงมาคือคาร์โบไฮเดรต ซึ่งจะพบมากในส่วนของเนื้อผลและเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว สำหรับปริมาณไขมันพบมากในส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดและเมล็ดเท่านั้น และเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีน พบว่า ในผลฟักข้าวสุกจะมีสารไลโคปีนอยู่มากที่เยื่อหุ้มเมล็ดซึ่งมีสีแดงสด ซึ่งมีมากถึง 925.75 µg/g ของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว สูงกว่าสารไลโคปีนในเนื้อผลถึง 30 เท่า

การศึกษาวิธีการสกัดไลโคปีนจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวด้วยเทคนิคการใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ จะพบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ cellulase ที่ความเข้มข้น 2% w/w ที่เวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ 40 นาที โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายจะสามารถสกัดไลโคปีนได้ 2224.26 µg/g หรือใช้เอทิลอะซิเตดเป็นตัวทำละลายจะสามารถสกัดไลโคปีนได้ 954.25 µg/g และหากใช้เอนไซม์ pectinase ที่ความเข้มข้น 2% w/w ที่เวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ 60 นาที โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายจะสามารถสกัดไลโคปีนได้ 2386.01 µg/g หรือใช้เอทิลอะซิเตดเป็นตัวทำละลายจะสามารถสกัดไลโคปีนได้ 1363.43 µg/g ซึ่งเอนไซม์ pectinase เป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการสกัดไลโคปีนได้ดีกว่าเอนไซม์ cellulase สำหรับเทคนิคคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติ โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่าที่ความดัน 1800 psi และใช้ปริมาณเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว 2 กรัม จะให้ปริมาณไลโคปีนสูงที่สุดที่ 1421.40 µg/g

การเปรียบเทียบเทคนิคการใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์และเทคนิคคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติ พบว่าทั้งสองเทคนิคให้ปริมาณไลโคปีนที่ใกล้เคียงกัน เมื่อใช้เอทิลอะซิเตดเป็นตัวทำละลายในเทคนิคการใช้เอนไซม์ สำหรับเทคนิคคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติจะดีกว่าตรงที่ใช้เวลาในการสกัดน้อยกว่า แต่ไม่ดีตรงที่อุณหภูมิสูงกว่าเทคนิคการใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

1. ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยเป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีประโยชน์ต่อนักวิจัย และนักวิชาการที่จะนำไปพัฒนาต่อยอดงานวิจัยเพื่อปรับปรุงเทคนิคในการสกัดไลโคปีนได้ดีและเหมาะสมมากยิ่งขึ้น
2. ข้อมูลทางด้านคุณสมบัติทางเคมีและเทคนิคการสกัดไลโคปีนที่ได้จากงานวิจัย เป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจในด้านการแปรรูปอาหารและการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพในเชิงพานิชย์ได้

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

1. ศึกษาการใช้เอนไซม์ pectinase และ cellulase ร่วมกันในการสกัด โดยมีการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดเพื่อให้ได้สารไลโคปีนออกมามากที่สุด หรือมีการทดลองใช้เอนไซม์ hemicellulase เพิ่มขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ hemicellulase เป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายผนังเซลล์ของพืชชั้นสูงเช่นกัน

2. ศึกษาสารละลายอินทรีย์ที่มีส่วนผสมทั้งเฮกเซนและเอทิลอะซิเตด ในเทคนิคการใช้เอนไซม์ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อเพิ่มปริมาณไลโคปีน และลดความพิษของเฮกเซนลง

3. ศึกษาผลของปริมาณเอทานอลที่ใช้เป็นตัวทำละลายร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติ ที่มีต่อปริมาณสารไลโคปีนที่สกัดได้

4. ศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเหนือจุดวิกฤติร่วมกับเอทานอลที่มีต่อปริมาณและความจำเพาะของสารไลโคปีนที่สกัดได้

5. ศึกษาผลของขนาดอนุภาคของเยื่อฟักข้าวที่มีต่อปริมาณสารไลโคปีนที่สกัดได้

บรรณานุกรม

บรรณานุกรมภาษาไทย

ปราณี อ่านเปรื่อง. (2547). *เอนไซม์ทางอาหาร.* กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มลนพรรษ สงพิมพ์. (2551). *การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เพคเตทไลเอสจากเชื้อแบคทีเรีย Paenibacillus polymyxa สายพันธุ์ N10 ด้วยวิธีการหาพื้นผิวการตอบสนอง.* ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุธาทิพย์ ภมรประวัติ. (2550). *ฟักข้าวอาหารต้านมะเร็ง*. 1 พฤศจิกายน 2555. http://www.elib-online.com/doctors50/food_momordica001.html

บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ

Association of Official Analytical Chemists (15 th ed.). (2000). Washington DC.

Aoki, H., Kieu, N. T. M., Kuze, N., Tomisaka, K., & Chuyen, N. V. (2002). Carotenoid pigments in GAC fruit (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,* 66, 2479-2482.

Banchong, Y., Haruthaithanasan, M., Haruthaithanasan, K., & Haruthaithanasan, V. (2010). Growth Performance and Productivity of Gac (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng.) Thai and Vietnam Provenance in the First Year. *Agricultural Sciences Journal*, 41, 1-4.

Beatriz, P. N., Antonio, F. P., Fernando, L. P. P., & Rui, L. M. (2009). Supercritical CO_2 extraction of trans-lycopene from Portuguese tomato industrial waste. *Food Chemistry*, 116, 680–685.

Cadoni, E., De Giorgi, M. R., Medda, E., & Poma, G. (2000). Supercritical CO_2 extraction of lycopene and b-carotene from ripe tomatoes. *Dyes and Pigments*, 44,27-32.

Cao-Hoang, L., Phan-Thi, H., Osorio-Puentes, F. J., & Wache, Y. (2011). Stability of carotenoid extracts of gac (*Momordica cochinchinensis*) towards cooxidation-protective effect of lycopene on β-carotene. *Food Research International*, 44, 2252-2257.

Choudhari, S. M., & Ananthanarayan, L. (2007). Enzyme aids extraction of lycopene from tomato tissues. *Food Chemistry*, 102, 77-81.

Choudhari, S. M., & and Singhal, R. S. (2008). Supercritical carbon dioxide extraction of lycopene from mated cultures of Blakeslea trispora NRRL 2895 and 2896. *Journal of Food Engineering*, 89, 349–354.

Ciurli, L., Bleve, M., & Rescio, L. (2009). Supercritical carbon dioxide co-extraction of tomatoes (*Lycopersicum esculentum* L.) and hazelnuts (*Corylus avellana* L.): A new procedure in obtaining a source of natural lycopene. *The Journal of Supercritical Fluids*, 49, 338–344.

Dehghan-Shoar, Z., Hardacre, A. K., & Brennan, C. S. (2010). The physico-chemical characteristics of extruded snacks enriched with tomato lycopene. *Food Chemistry*, 123, 1117-1122.

Dielectric constant values. 1 สิงหาคม 2556. http://www.instrumatics.co.nz

Egydio, J. A., Moraes, A. M., & Rosa, P. T. V. (2010). Supercritical fluid extraction of lycopene from tomato juice and characterization of its antioxidation activity. *The Journal of Supercritical Fluids,* 54, 159–164.

Garcia, M. L., Calvo, M. M., & Selgas, M. D. (2009). Beef hamburgers enriched in lycopene using dry tomato peel as an ingredient. *Meat Science*, 83, 45-49.

Goodwin, T.W. (1967). *Chemistry and biochemistry of plant pigment*. London: Academic Press Inc.

Huang, W., Li, Z., Niu, H., Li, D., & Zhang, J. (2008). Optimization of operating parameters for supercritical carbon dioxide extraction of lycopene by response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 89, 298–302.

Institute of Medicine. (2000). *Food and Nutrition Board. Beta-carotene and other carotenoids.* Washington, D.C.:National Academy Press

Ishida, B. K., & Chapman, M. H. (2009). Carotenoid extraction from plants using a novel, environmentally friendly solvent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 57, 1051-1059.

Ishida, B. K., Turner, C., Chapman, M. H., & McKeon, T. A. (2004). Fatty acid and carotenoid composition of gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 52, 274-9.

Kanyakam, K., & Uriyapongson, J. (2010). Lycopene extraction from tomato waste using enzymatic methods with different solvents. *Agricultural Science Journal*, 41, 289-292.

Kassama, L. S., Shi, J., & Mittal, G. S. (2008). Optimization of supercritical fluid extraction of lycopene from tomato skin with central composite rotatable design model. *Separation and Purification Technology*, 60, 278–284.

Kha, T. C., Nguyen, M. H., Roach, P. D., & Stathopoulos, C. E. (2013) Effects of gac aril microwave processing conditions on oil extraction efficiency, and β-carotene and lycopene contents. *Journal of Food Engineering*, 117, 486-491.

Kubola, J., Meeso, N., & Siriamornpun, S. (2013). Lycopene and beta carotene concentration in aril oil of gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng) as influenced by aril-drying process and solvents extraction. *Food Research International*, 50, 664-669.

Kubola, J., & Siriamornpun, S. (2011). Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Food Chemistry*, 127, 1138-1145.

Lavecchia, R., & Zuorro A. (2008). Enhancement of lycopene extraction from tomato peels by enzymatic treatment. *Chemical Engineering Transactions*, 14, 301-308.

Machmudah, S., Zakaria, Winardi, S., Sasaki, M., Goto, M., Kusumoto, N., & Hayakawa, K. (2012). Lycopene extraction from tomato peel by-product containing tomato seedusing supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 108, 290–296.

Nhung, O. T. T., Bung, P. N., Ha, N. T., & Phong, T. K. (2010). Changes in lycopene and beta carotene contents in aril and oil of gac fruit during storage. *Food chemistry*, 121, 326-331.

Olives Barba, A. I., Camara Hurtado, M., Sanchez Mata, M. C., Fernandez Ruiz, V., & Lopez Saenz de Tejada, M. (2006). Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β-carotene in vegetables. *Food chemistry*, 95, 328-336.

Rao, A. V., & Rao, L.G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacology Research*, 55, 207-216.

Saldana, M. D. A., Temelli, F., Guigard, S. E., Tomberli, B., & Gray, C. G. (2010). Apparent solubility of lycopene and b-carotene in supercritical CO_2, CO_2 + ethanol and CO_2 + canola oil using dynamic extraction of tomatoes. *Journal of Food Engineering,* 99, 1–8.

Sharma, S. K., & Maguer, M. L. (1996). Kinetics of lycopene degradation in tomato pulp solids under different processing and storage conditions. *Food Research International*, 29, 309-375.

Shi, J., Khatria, M., Xue, S. J., Mittal, G. S., Ma, Y., & Li, D. (2009). Solubility of lycopene in supercritical CO_2 fluid as affected by temperature and pressure. *Separation and Purification Technology*, 66, 322–328.

Takeoka, G. R., Dao, L., Flessa, S., Gillespie, D. M., Sewell, W. T., Huebner, B., Bertow, D., & Ebeler, S. E. (2001). Processing effects on lycopene content and

antioxidant activity of tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 49, 3713-3717.

Taungbodhitham, A. K., Jones, G. P., Wahlqvist, M. L., & Briggs, D. R. (1998). Evaluation of extraction method for the analysis of carotenoids in fruits and vegetables. *Food chemistry*, 63, 577-584.

Topal, U., Sasak, M., Goto, M., & Hayakawa, K. (2006). Extraction of lycopene from tomato skin with supercritical carbon dioxide: Effect of operating conditions and solubility analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 54, 5604-5610.

Toor, R. K., Savage, G. P., & Heeb, A. (2006). Influence of different types of fertilisers on the major antioxidant components of tomatoes. *Journal of Food Composition and Analysis,* 19, 20-27.

Tran, T. H., Nguyen, M. H., Zabaras, D., & Vu, L. T. T. (2008). Process development of gac powder by using different enzymes and drying techniques. *Journal of Food Engineering*, 85, 359-365.

Uemura, S., Ishihara, M., & Jellison, Jody. (1993). Differential responses of wood-rot fungi cellulases towards polyclonal antibodies against *Trichoderma viride* cellobiohydrolases I. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39, 788-794.

Vasapollo, G., Longo, L., Rescio, L., & Ciurlia bInnovative, L. (2004). Supercritical CO_2 extraction of lycopene from tomato in the presence of vegetable oil as co-solvent. *The Journal of Supercritical Fluids,* 29, 87–96.

Yahya, F., Lu, T., Santos, R. C. D., Fryer, P. J., & Bakalis, S. (2010). Supercritical carbon dioxide and solvent extraction of 2-acetyl-1-pyrroline from Pandan leaf: The effect of pre-treatment. *Journal of Supercritical Fluids*, 55, 200-207.

Yi, C., Shi, J., Xue, S. J., Jiang, Y., & Li, D. (2009). Effect of supercritical fluid extraction parameters on lycopene yield and antioxidant activity, *Food Chemistry*, 113, 1088-1094.

Zuknik, M. H., Nik Norulaini, N. A., & Mohd Omar, A. K. (2012). Supercritical carbon dioxide extraction of lycopene. *Journal of Food Engineering*, 112, 253-262.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ภาคผนวก ก.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (ตามวิธีของ AOAC., 2000)

อุปกรณ์

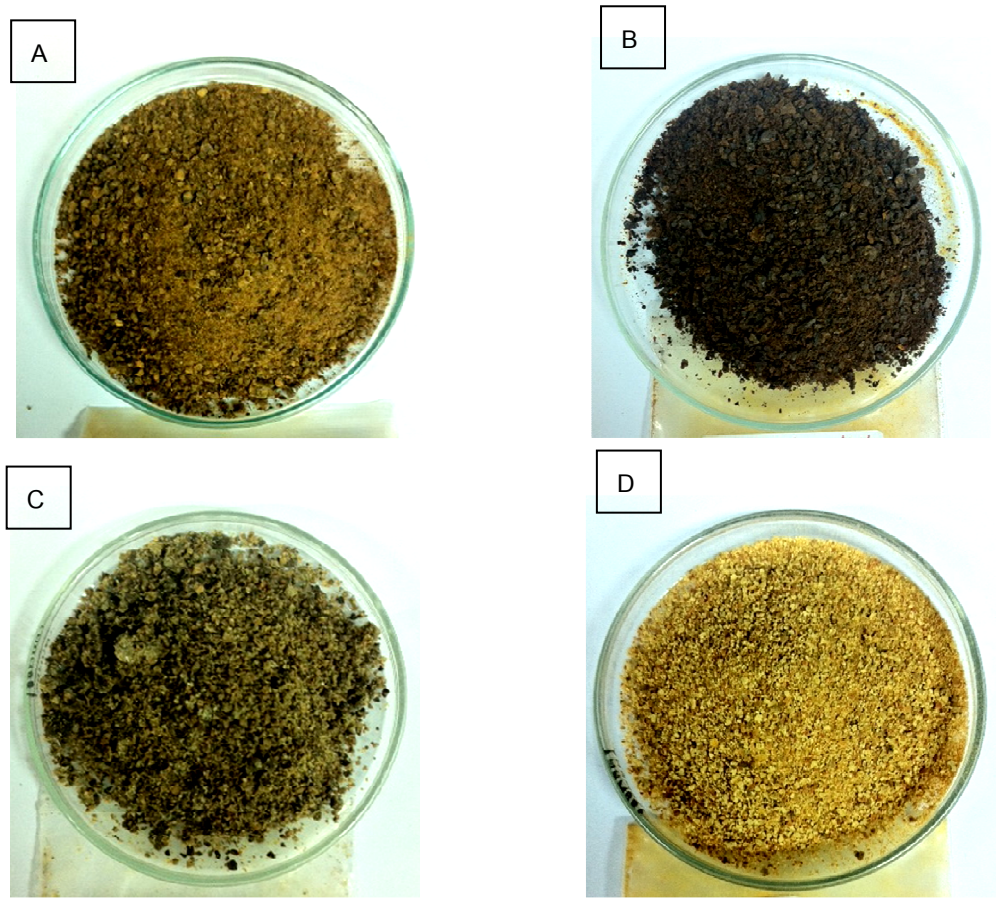
1. Aluminium foil
2. Spatula stainless / plastic
3. Hot air oven
4. Analytical balance
5. Desiccator
6. Forcep

วิธีวิเคราะห์

1. นำ Aluminium foil ที่ทำเป็นรูปถ้วย (Aluminium dish) ไปอบในตู้อบ (Hot air oven) ที่ 100$\pm$5°C แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่าง 2 - 5 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ใน Aluminium dish
3. นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100$\pm$5°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
4. นำ Aluminium dish กับตัวอย่างที่ผ่านการอบไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่ง แล้วนำไปอบจนได้น้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ Moisture} = \frac{(\text{Wt. sample ก่อนอบ} - \text{Wt. sample หลังอบ})}{\text{Wt. sample}} \times 100$$



รูปภาคผนวก ก-1 ตัวอย่างหลังผ่านการอบหาปริมาณความชื้น
เนื้อผลสีเหลือง (A) เยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง (B) ส่วนของเมล็ด (C) เปลือกผล (D)

ภาคผนวก ก.2 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (ตามวิธีของ AOAC., 2000)

อุปกรณ์

1. ชุดกลั่น Soxhlet ประกอบด้วย Condenser, Soxhlet apparatus และ Round bottom flask
2. Spatula stainless / plastic
3. Hot air oven
4. Analytical balance
5. Desiccator
6. Forcep
7. Water bath
8. Cooling
9. Thimble
10. กระดาษกรอง
11. Cylinder / Beaker ขนาด 250 มล.

สารเคมี

1. Petroleum ether

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างที่แห้ง 2 – 3 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ในกระดาษกรอง แล้วนำไปใส่ใน Thimble ใน Extraction tube ของ Soxhlet apparatus
2. ใส่ 250 มล. Petroleum ether ลงในขวดก้นกลมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน
3. นำไป Reflux บน Heating mantle (โดยใช้ Water bath แทน) ใช้อุณหภูมิปานกลาง โดยให้อัตราการกลั่นตัวของ Petroleum ether 2 – 3 หยด / วินาที ใช้เวลาในการ Reflux $\simeq$ 10 ชั่วโมง
4. ระเหยเอา Petroleum ether ออกจากขวดก้นกลม (Round bottom flask) ที่สกัดไขมัน
5. จากนั้นนำไปอบในตู้อบ (Hot air oven) ที่ $100 \pm 5^{\circ}C$ แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ Fat} = \frac{(\text{Wt. ขวดก้นกลมกับน้ำมัน} - \text{Wt. ขวดก้นกลม})}{\text{Wt. sample}} \times 100$$

รูปภาคผนวก ก-2 ตัวอย่างที่ทำการสกัดไขมันโดยวิธี Soxhlet

ภาคผนวก ก.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (ตามวิธีของ AOAC., 2000)

อุปกรณ์

1. ชุดย่อย ประกอบด้วย Kjeldahl flask และเครื่องย่อยแบบรวดเร็ว (SpeedDigester) รุ่น K-425 ® Buchi ประเทศเยอรมัน
2. ชุดกลั่น (Distillation unit) รุ่น K-350 ® Buchi ประเทศเยอรมัน
3. Spatula stainless / plastic (ช้อนตักสาร)
4. Analytical balance
5. Erlenmeyer flask 250 มล.
6. Burette ขนาด 25 มล.
7. Hood (ตู้ดูดควัน)
8. Volumetric flask

สารเคมี

1. Potassium sulphate
2. Copper sulphate heptahydrate
3. Sulfuric acid
4. Sodium hydroxide
5. Boric acid
6. Hydrochloric acid
7. Mixed indicator
8. DI water

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างแห้ง 0.5 - 2 กรัม ใส่ใน Kjeldahl flask
2. เติม Catalyst 7 กรัม (95 กรัม K_2SO_4 : 5 กรัม $CuSO_4.5H_2O$)
3. เติม 15 มล. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
4. นำไปย่อยบนเตาไฟจนได้ของเหลวสีเขียวใส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
5. เติม 50 มล. DI water
6. เติม 32% NaOH ลงใน Kjeldahl flask
7. นำ Erlenmeyer flask ขนาด 250 มล. ซึ่งบรรจุ 50 มล. 4% Boric acid และหยด 2 – 3 หยด Mixed indicator ต่อเข้ากับชุดกลั่นโดยให้ปลายล่างของ Condenser อยู่ใต้ระดับของเหลวใน Erlenmeyer flask
8. กลั่นจนได้ของเหลวประมาณ 150 มล. นำ Erlenmeyer flask ออก ล้างปลาย Condenser ด้วย DI water
9. นำมาทำการ titrate สารที่กลั่นได้กับ 0.1 N HCl ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

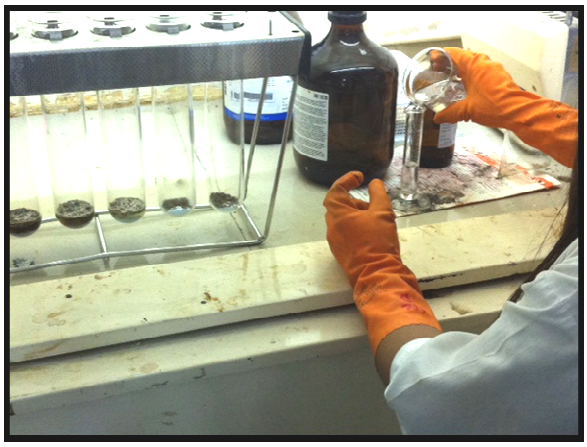
วิธีการคำนวณ

$$N = (\text{Vol. HCl}_{\text{titrate}} - \text{Vol. HCl}_{\text{blank}}) \times N_{HCl} \times 0.014007$$

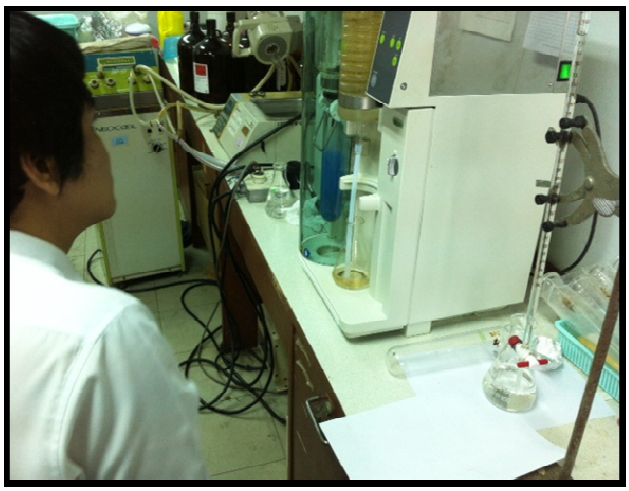
$$\% N = \frac{N \times 100}{\text{Wt. sample}}$$

$$\% \text{ Protein} = \% N \times \text{factor}$$

<u>หมายเหตุ</u> factor ที่ใช้คำนวณ = 6.25



รูปภาคผนวก ก-3 ตัวอย่างก่อนนำไปย่อยด้วยเครื่องย่อยแบบรวดเร็ว (SpeedDigester)



รูปภาคผนวก ก-4 ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแล้วนำมาทำการกลั่นด้วยเครื่อง Distillation Unit

ภาคผนวก ก.4 การวิเคราะห์ปริมาณเส้นใย (ตามวิธีของ AOAC., 2000)

อุปกรณ์

1. Erlenmeyer flask 500 มล.
2. Spatula stainless / plastic (ช้อนตักสาร)
3. Hot air oven
4. Analytical balance
5. Desiccator
6. Forcep
7. Cylinder 50 / 100 มล.
8. Hot plate
9. ชุดกรอง
10. Suction pump
11. กระดาษกรอง
12. เตาเผาอุณหภูมิสูง (Muffle Furnance) รุ่น CWF 12/13 ประเทศอังกฤษ
13. Tong (ที่คีบถ้วย Crucible)
14. Crucible

สารเคมี

1. Sulfuric acid
2. Sodium hydroxide
3. DI Water
4. Ethyl alcohol

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างแห้งที่สกัดไขมันออกแล้ว (ยกเว้นกรณีที่ไขมันน้อยกว่า 1%) 2 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask 500 มล.
2. เติม 50 มล. 5% H_2SO_4 และเติม 200 มล. DI Water
3. ต้มให้เดือดนาน 30 นาที บน Hot plate (ขณะต้มให้หมุน Erlenmeyer flask เป็นครั้งคราวเพื่อไม่ให้มีส่วนแข็งติด)
4. นำมากรองในชุดกรองผ่านกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) โดยใช้ Suction pump ล้าง Erlenmeyer flask ด้วยน้ำร้อน 50 – 70 มล. แล้วเทลงผ่านกระดาษกรอง
5. ใช้น้ำร้อน 50 มล. ล้างซ้ำอีก 2 – 3 ครั้ง
6. นำกากที่ได้ใส่ใน Erlenmeyer flask เติม 50 มล. 5% NaOH เติม 200 มล. DI Water
7. ต้มให้เดือดนาน 30 นาที บน Hot plate (ขณะต้มให้หมุน Erlenmeyer flask เป็นครั้งคราวเพื่อไม่ให้มีส่วนแข็งติด)

8. กรองโดยใช้วิธีเดียวกับข้อ 4 และ 5

9. ล้างด้วย 25 มล. 1.25% H_2SO_4 ล้างตามด้วยน้ำร้อน 50 มล. และ 25 มล. Alcohol ตามลำดับ นำกระดาษกรองพร้อมกากเส้นใยใส่ใน Crucible ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

10. นำไปอบในตู้อบ (Hot air oven) ที่ 100±5°C แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

11 นำไปเผาที่อุณหภูมิ 600±5°C เป็นเวลานาน 30 นาที ทำให้เย็นใน Desiccator ชั่งน้ำหนักอีกครั้ง และนำไปเผาจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ Fiber} = \frac{(\text{Wt. sample หลังอบ} - \text{Wt.กระดาษกรอง}) - \text{Wt. sample หลังเผา}}{\text{Wt. sample}} \times 100$$

รูปภาคผนวก ก-5 การย่อยตัวอย่างก่อนเผาเพื่อหาปริมาณเส้นใยหยาบ

ภาคผนวก ก.5 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (ตามวิธีของ AOAC., 2000)

อุปกรณ์

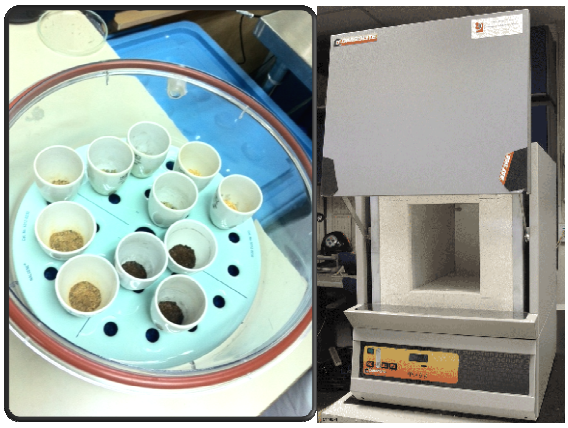
1. Crucible
2. Spatula stainless / plastic (ช้อนตักสาร)
3. Hot air oven
4. Analytical balance
5. Desiccator
6. Forcep
7. Hood
8. เตาเผาอุณหภูมิสูง (Muffle Furnance) รุ่น CWF 12/13 ประเทศอังกฤษ
9. Tong

วิธีวิเคราะห์

1. นำ Crucible ไปเผาที่เตาเผา ที่ 550±5°C แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ใน Crucible
3. นำไปเผาบน Hot plate ในตู้ดูดควัน (Hood) จนหมดควันสีดำ
4. นำไปเผาในเตาเผาที่ 550±5°C แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก และนำไปเผาจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ Ash} = \frac{\text{Wt. sample หลังเผา}}{\text{Wt. sample}} \times 100$$



รูปภาคผนวก ก-6 การเผาตัวอย่างด้วยเครื่อง Muffle furnance

ภาคผนวก ก.6 วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตเป็นค่าที่ได้จากการนำร้อยละของปริมาณความชื้น ไขมัน โปรตีน เส้นใย และเถ้ามารวมกัน นำไปหักออกจาก 100

% ปริมาณคาร์โบไฮเดรต = 100-ร้อยละของ (ความชื้น+ไขมัน+โปรตีน+เส้นใย+เถ้า)

ภาคผนวก ข

การหาปริมาณไลโคปีนทั้งหมด

ภาคผนวก ข1 การหาปริมาณไลโคปีนทั้งหมดด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer
(ตามวิธีของ Choudhari & Ananthanarayan., 2007)

วิธีการคำนวณ

$$\text{ปริมาณไลโคปีน} = \frac{A \times dil \times ml \times 10}{E^{1\%}_{1\ cm}}$$

โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในคิวเวตขนาด 1 เซนติเมตร
dil คือ จำนวนเท่าของการเจือจาง
ml คือ ปริมาณสารที่สกัดได้ทั้งหมด (มิลลิลิตร)
$E^{1\%}_{1\ cm}$ คือ ค่าสัมประสิทธิ์จำเพาะของไลโคปีน เท่ากับ 3,450

ภาคผนวก ข.2 การหาปริมาณไลโคปีนทั้งหมดด้วยเครื่อง HPLC

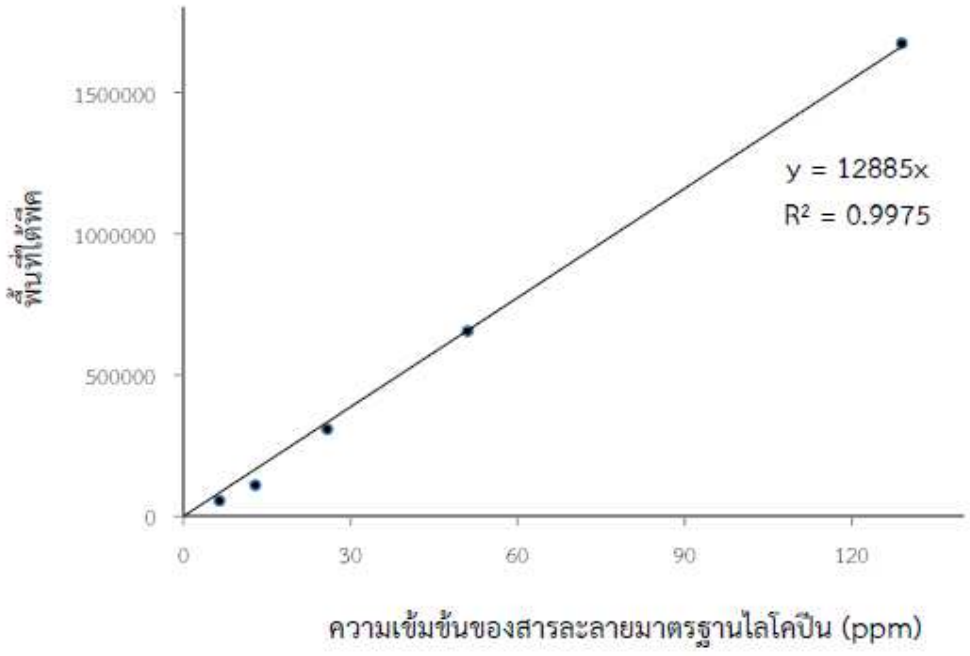
การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. ชั่งสารมาตรฐานไลโคปีน 20 มิลลิกรัม ละลายด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน:เมทานอล ในอัตราส่วน 6:4 และใส่ในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยตัวทำลายให้ถึงขีดวัดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายมาตรฐานไลโคปีนความเข้มข้น 200 ppm

2. นำสารละลายมาตรฐานไลโคปีนความเข้มข้น 200 ppm มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นระหว่าง 5-150 ppm

3. นำสารละลายมาตรฐานไลโคปีนที่ได้มาวัดปริมาณไลโคปีนด้วยเครื่อง HPLC

4. นำพื้นที่ใต้พีคที่ได้มา plot กับความเข้มข้นของสารละลายได้เป็นกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานไลโคปีน ดังแสดงในรูปภาคผนวก ข-1

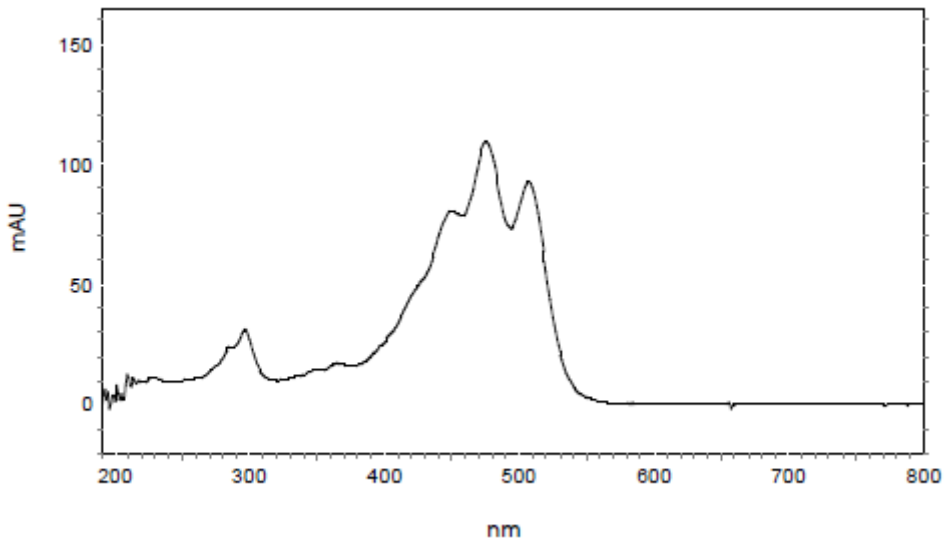


รูปภาคผนวก ข-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานไลโคปีน

ภาคผนวก ค

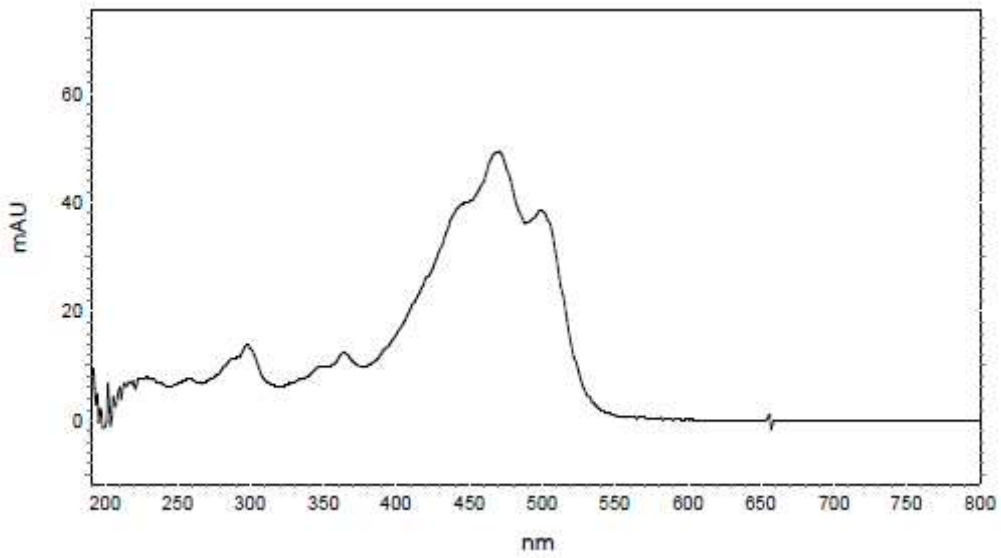
สเปคตรัม

ภาคผนวก ค.1 สเปคตรัมของสารมาตรฐานไลโคปีน



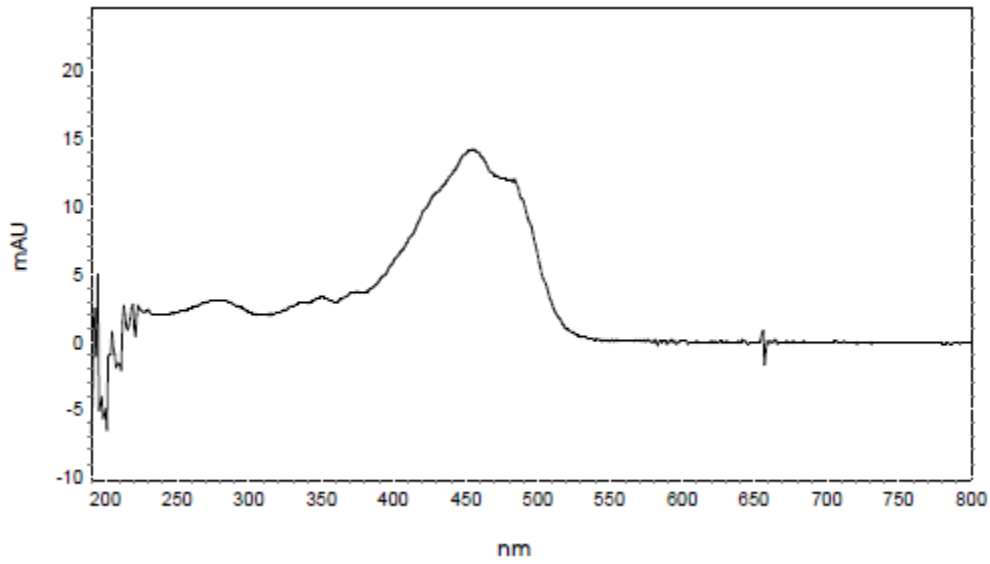
รูปภาคผนวก ค-1 สเปคตรัมของสารละลายมาตรฐานไลโคปีน

ภาคผนวก ค.2 สเปคตรัมของสารไลโคปีนที่ได้จากการสกัด



รูปภาคผนวก ค-2 สเปคตรัมของสารไลโคปีนที่ได้จากการสกัด

ภาคผนวก ค.3 สเปคตรัมของ β-carotene ที่ได้จากการสกัด



รูปภาคผนวก ค-3 สเปคตรัมของ β-carotene ได้จากการสกัด

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล นางสาว ฐิตา ฟูเผ่า

ตำแหน่งปัจจุบัน พนักงานมหาวิทยาลัย ตำแหน่งอาจารย์

หน่วยงานและสถานที่ติดต่อ หลักสูตรเทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร โรงเรียนการเรือน
มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต 228-228/1-3 ถนนสิรินธร
เขตบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700
เบอร์โทรศัพท์ 02-4239435 มือถือ 080-6172529
E-mail: tita_foo@dusit.ac.th

ประวัติการศึกษา

Ph.D. Eng (Biotechnology)	Osaka University, Osaka, Japan
M. Eng. (Biotechnology)	Osaka University, Osaka, Japan
วท.ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)	จุฬาลงกรณ์มหาวิยาลัย
วท.บ. (เทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร)	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ (เกรียตินิยมอันดับที่ 2)

ผลงานวิจัย

1. Sinsereekul, N*., **Foophow, T*.,** Yamanouchi, M., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S. (2011) An alternative mature form of subtilisin homologue, Tk-SP, from *Thermococcus kodakaraensis* identified in the presence of Ca^{2+}. FEBS J. 278(11): 1901-1911.

* These authors contributed equally to this work

2. **Foophow, T.,** Tanaka, S., Angkawidjaja, C., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S. (2010) Crystal structure of a subtilisin homologue, Tk-SP, from *Thermococcus kodakaraensis*: requirement of a C-terminal β-jelly roll domain for hyperstability. *J. Mol. Biol.* 400(4): 865-877.

3. **Foophow, T.,** Tanaka, S., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S. (2010) Subtilisin-like serine protease from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* with N- and C-terminal propeptides. *Protein Eng. Des. Sel*., 23(5), 347-355.

4. Noitang, S., Sooksai, S.A., **Foophow, T.,** and Petsom, A. (2009) Proximate Analysis and Physico-Chemical Properties of Flour from the Seeds of the China Chestnut, *Sterculia monosperma* Ventenat. *PJBS*., 12(19), 1314-1319.

ชื่อ-นามสกุล นางฐิตินาถ สุคนเขตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน พนักงานมหาวิทยาลัย ตำแหน่งอาจารย์
หน่วยงานและสถานที่ติดต่อ ศูนย์เครื่องมือปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
228-228/1-3 ถนนสิรินธร เขตบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700 เบอร์โทรศัพท์ 02-4239442-3 มือถือ 081-7918768
E-mail: tsukonket@gmail.com

ประวัติการศึกษา

ปร.ด. (สาขาปิโตรเคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วท.ม. (ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พิลิเมอร์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วท.บ. (เคมีอุตสาหกรรม) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

ผลงานวิจัย

1. Effect of Temperature on Intermetallic Diffusion in Palladium Membrane on Stainless Steel Supported, *MPSGC*, December 12-14, 2006, National University of Singapore, Singapore
2. Development of Intermetallic Diffusion Barrier for Palladium Membrane Supported on Porous Stainless Steel, *KZA Workshop 2008*, July 19-20, 2008, Sogang University, Seoul, Korea
3. Design and Development of High Performance Catalysts for Multi-Feedstock Hydrogen Production, *8th World Congress of Chemical Engineering*, August 23-27, 2009, Montreal, Quebec, Canada
4. CO_2 reforming of methane over Ni/$Ce_{0.5}$-$Zr_{0.33}$-$M_{0.16}O_2$ in the presence of steam, *Pure and Applied Chemistry International Conference* (PACCON2010), January 20-23, 2010, Ubonratchathani University, Ubonratchathani, Thailand
5. Influence of the catalyst preparation method surfactant amount and steam on CO_2 reforming of CH_4 over 5Ni/$Ce_{0.6}Zr_{0.4}O_2$ catalyst. (2011) *Energy & Fuels.* Vol. 25, 2011, p. 864-877.
6. Thitinat Sukonket, Ataullah Khan, Bappy Saha, Hussameldin Ibrahim, Supawan Tantayanon, Prashant Kumar, Raphael Idem. (2011) Influence of the catalyst preparation method, surfactant amount, and steam on CO_2 reforming of CH_4 over 5Ni/$Ce_{0.6}Zr_{0.4}O_2$ catalysts. *Energy Fuels*., 25, 864–877.
7. Ataullah Khan, Thitinat Sukonket, Bappy Saha, Raphael Idem. (2012) Catalytic Activity of Various 5 wt% Ni/$Ce_{0.5}Zr_{0.33}M_{0.17}O_{2_\delta}$ Catalysts for the CO_2 Reforming of CH_4 in the Presence and Absence of Steam. *Energy Fuels*., 26, 365–379.

ชื่อ-นามสกุล นายวีรชน ภูหินกอง
ตำแหน่งปัจจุบัน พนักงานมหาวิทยาลัย ตำแหน่งนักวิจัย
หน่วยงานและสถานที่ติดต่อ ศูนย์เครื่องมือปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
228-228/1-3 ถนนสิรินธร เขตบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700
เบอร์โทรศัพท์ 02-4239442-3 มือถือ 089-1135504
E-mail: p_veerachon@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

ศษ.บ. (สาขาวิทยาศาสตร์เคมี) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วท.ม. (เคมี) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ผลงานวิจัย

1. ปริมาณโลหะหนักที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ OTOP (หมวดอาหาร) ในเขตพื้นที่จังหวัดนนทบุรี (Heavy metal contaminate in OTOP food product of Nonthaburi)
2. Screen-printed electrode modified with nano-ZnO dispersed in polyaniline nanowires for hydrogen peroxide biosensor, Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON2010), January 20-23, 2010, Ubonratchathani University, Ubonratchathani, Thailand
3. อุดมศักดิ์ กิจทวี, ณัฐบดี วิริยาวัฒน์, และวีรชน ภูหินกอง. (2556). การประเมินคุณภาพเบื้องต้นผลิตภัณฑ์หมูหันพื้นบ้าน. *วารสารวิจัย มสด. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, *6*(2),

ชื่อ-นามสกุล นางศรินทิพ สุกใส (อานามนารถ)
หน่วยงานและสถานที่ติดต่อ สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาคารสถาบัน 3 ชั้น 5
ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330
เบอร์โทรศัพท์ 02-2188073 มือถือ 081-7327350
E-mail: sarintipsooksai@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

Ph.D (Biotechnology)	2541	Osaka University, Osaka, Japan
วท.ม. (Biotechnology)	2533	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วท.บ. (Agriculture)	2530	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลงานวิจัย

1. **Anamnart, S.**, Tomita, T., Fukui, F., Fujimori, K., Harashima, S.*, Yamada, Y. and Oshima, Y. (1997) The P-OLE1 gene of *Pichia angusta* encodes a Δ9-fatty acid desaturase and complements the ole1 mutation of *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 184, 299-306.

2. **Anamnart, S**., Tolstorukov, II., Kaneko, Y. and Harashima, S.* (1998) Fatty acid desaturation in methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* strain CBS 1976 and unsaturated fatty acid auxotrophic mutants. J. Ferment. Bioeng. 85, 476-482.

3. Noitang, S., **Sooksai, S.A.***, Foophow, T. and Petsom, A. (2009) Proximate Analysis and Physico-Chemical Properties of Flour from the Seed of the China Chestnut, *Sterculia monosperma* Ventenat. Pakistan Journal of Biological Sciences 12(19): 1314-1319.

4. Limsuwatthanathamrong, M., **Sooksai, S.***, Chunhabundit, S., Noitung, S., Ngamrojanavanich, N.* and Petsom, A. (2012) Fatty acid profile and lipid composition of farm-raised and wild-caught sandworms, *Perinereis nuntia*, the diet for marine shrimp broodstock. Asian Journal of Animal Sciences. 6(2): 65-75.

5. Panuthai, T., Sihanonth, P., Piapukiew, J., Sooksai, S., Sangvanich, P. and Karnchanatat, A.* (2012) An extracellular lipase from the endophytic fungi *Fusarium oxysporum* isolated from the Thai medical plant, *Croton oblongifolius* Roxb. African Journal of Microbiology Research 6(11): 2622-2638.

6. Chusri, M., Wongphanit, P., Palaga, T., Puthong, S., **Sooksai, S.*** and Komolpis, K.* (2013) Production and characterization of a monoclonal antibody against enrofloxacin. J. Microbiol. Biotechnol. 23(1): 69–75.

7. **Sooksai, S.**, Chewchanlertfa, P.,Yoshinobu, K., Harashima, S. and Laoteng K.* (2013) Alterations in growth and fatty acid profiles under stress conditions of *Hansenula polymorpha* defective in polyunsaturated fatty acid synthesis. Mol Biol Rep DOI 10.1007/s11033-013-2594-3 (Published online: 06 May 2013)

ชื่อ-นามสกุล นางสาวศจี น้อยตั้ง
หน่วยงานและสถานที่ติดต่อ สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาคารสถาบัน 3 ชั้น 5
ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน
กรุงเทพมหานคร 10330
เบอร์โทรศัพท์ 02-2188073 มือถือ 086-8812826
E-mail: jeejee_spot@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

วท.บ. (Food science and technology) 2544 สถาบันราชภัฏจันทรเกษม

ผลงานวิจัย

1. **Noitang S.**, Sooksai S.A., Foophow T. and Petsom A. (2009) Proximate Analysis and Physico-Chemical Properties of Flour from the Seeds of the China Chestnut, *Sterculia monosperma* Ventenat. Pak J Biol Sci. 12 (19), 1314-9.

2. Thongchul, N., **Noitang, S.**, Sooksai, S., Petsom, A., Tantayakom, V. and Prasitchoke, P. Single cell protein production from glycerol residues discharged from biodiesel production plant. 2010 AIChE Annual Meeting, 10 AIChE ; Salt Lake City, UT; November 7 – 12, 2010.

3. Sooksai, S., Thongchula, N., **Noitang, S.**, O-siripuna, S., Chunthonga, P., Talwonga, K., Prasitchokeb, P., Tantayakomb, V. and Petsom, A. Production of yeast extract from *Hansenula polymorpha* IBGE HP-5001 using pressure reactor. The 23rd Annual Meeting of the Thai Society for biotechnology, The Imperial Queen's park hotel, Bankok Thailand; February 1 – 2, 2012 : 204.

4. Limsuwatthanathamrong, M., Sooksai, S., Chunhabundit, S., **Noitung, S.**, Ngamrojanavanich, N. and Petsom, A. (2012) Fatty acid profile and lipid composition of farm-raised and wild-caught sandworms, *Perinereis nuntia*, the diet for marine shrimp broodstock, Asian Journal of Animal Sciences, 6 (2) : 65-72.