การสกัดแคโรทีนอยด์จากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าว: สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยเอนไซม์และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

CAROTENOID EXTRACTION FROM YELLOW PULP OF GAC FRUIT: OPTIMUM EXTRACTION CONDITION BY ENZYMATIC TREATMENT AND ANTIOXIDANT CAPACITIES OF EXTRACT

วรากร เกิดทรัพย์[1] พิสุทธิ หนักแน่น[2] และ ปรมาภรณ์ เกิดทรัพย์[3]
[1]อาจารย์, หมวดวิชาคณิตศาสตร์และวิทยาศาสตร์สำหรับวิศวกร คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษมบัณฑิต เขตสวนหลวง กรุงเทพฯ 10250, warakorn.ker@kbu.ac.th
[2]อาจารย์, สาขาวิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ คณะเทคโนโลยีและนวัตกรรมผลิตภัณฑ์การเกษตร มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110, phisut@g.swu.ac.th
[3]อาจารย์, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพและผลิตภัณฑ์การเกษตร คณะเทคโนโลยีและนวัตกรรมผลิตภัณฑ์การเกษตร มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110, paramapornk@g.swu.ac.th

Warakorn Kerdsup[1], Phisut Naknaen[2] and Paramaporn Kerdsup[3]
[1]Lecturer, Faculty of Engineering, Kasem Bundit University, Suan Luang, Bangkok 10250, Thailand, warakorn.ker@kbu.ac.th
[2] Lecturer, Division of Food Science and Nutrition, Faculty of Agricultural Product Innovation and Technology, Srinakharinwirot University, Wattana, Bangkok 10110, Thailand, phisut@g.swu.ac.th
[3] Lecturer, Division of Biotechnology and Agricultural Product, Faculty of Agricultural Product Innovation and Technology, Srinakharinwirot University, Wattana, Bangkok 10110, Thailand, paramapornk@g.swu.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแคโรทีนอยด์จากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวโดยใช้เอนไซม์ Rapidase Ex Color และประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โดยเริ่มต้นศึกษาระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ในช่วงร้อยละ 0.25–3.0 พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 1 ให้ปริมาณลูทีน ไลโคพีนและเบต้าแคโรทีนสูงสุด ดังนั้นจึงเลือก

ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 1 ไปศึกษาผลของระยะเวลาในการสกัดต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้ พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดคือ 3 ชั่วโมงโดยให้ปริมาณปริมาณลูทีน ไลโคพีน และเบต้าแคโรทีนเท่ากับ 40, 33 และ 48 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดที่เตรียมได้มาทำการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH-RSA, FRAP และ Reducing powder พบว่าสารสกัดจากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวที่ใช้เอนไซม์ในกระบวนการสกัดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการใช้เอนไซม์ในกระบวนการสกัดประมาณ 2 เท่าเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH-RSA และ Reducing power และประมาณ 1.5 เท่าเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP ดังนั้นการใช้เอนไซม์ Rapidase Ex Color สามารถช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดแคโรทีนอยด์จากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวและส่งผลให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเช่นกัน

คำสำคัญ: ฟักข้าว, Rapidase Ex Color, แคโรทีนอยด์, เนื้อสีเหลือง

ABSTRACT

The aims of the current research were to optimize conditions of Rapidase Ex Color-assisted carotenoid extraction from yellow pulp of Gac fruit and to evaluate the antioxidant capacities of its extract. First, the proper Rapidase Ex Color concentrations (0.25–3.0%) were investigated. It was found that the highest lutein, lycopene and β-carotene contents was observed for the sample treated with 1% of enzyme. Thus, 1% of enzyme was selected for further study relating to the effect of pretreatment time on the carotenoid contents. The result showed that the pretreatment time with enzymatic treatment for 3 h gave the highest lutein (40 mg/g), lycopene (33 mg/g) and β-carotene (48 mg/g) contents. Furthermore, the extract, prepared by applying 1% of enzyme and 3 h of pretreatment time, was accessed its antioxidant capacities by DPPH-RSA, FRAP and reducing power methods. The data revealed that the antioxidant capacities of the enzyme-treated sample was higher approximately 2 times for DPPH-RSA and reducing power methods and 1.5 times for FRAP methods when compared to that of the enzyme without enzymatic treatment. Therefore, the utilization of Rapidase Ex Color could assist for increasing yield of carotenoid extraction as well as antioxidant capacities.

KEYWORDS: Gac fruit, Rapidase Ex Color, carotenoid, yellow pulp

1. บทนำ

แคโรทีนอยด์จัดเป็นสารกลุ่มไฟโตเคมิคอล (Phytochemical) ที่พบในธรรมชาติทั้งพืชและสัตว์ สารประกอบในกลุ่มแคโรทีนอยด์ส่วนใหญ่มีสีแดงและเหลือง มีคุณสมบัติละลายได้ในไขมัน โดยสารประกอบในกลุ่มนี้มีมากกว่า 600 ชนิด ซึ่งล้วนมีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์ โดยบางส่วนมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และมีคุณสมบัติในการทำหน้าที่เป็นโปรวิตามินเอ (provitamin A) โดยโปรวิตามินเอที่รู้จักกันดีคือ เบต้า-แคโรทีน (β-carotene) และแอลฟา-แคโรทีน (α-carotene) ซึ่งพืชหลายชนิดจัดว่าอุดมไปด้วยสารประกอบแคโรทีนอยด์ ได้แก่ มะเขือเทศ ฟักทอง แครอท มะละกอ เป็นต้น โดยผักท้องถิ่นของประเทศไทยอีกหนึ่งชนิดที่มีรายงานการวิจัยว่าเป็นแหล่งของแคโรทีนอยด์คือฟักข้าวมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Momordica cochinensis Spreng.* มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีน พม่า ไทย ลาว บังกลาเทศ มาเลเซีย และฟิลิปปินส์ ฟักข้าวเป็นพืชที่อุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มแคโรทีนอยด์ โดยมีลูทีน ไลโคปีน และเบต้าแคโรทีน ซึ่งมีคุณสมบัติในการช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจ และโรคเบาหวาน เป็นกลุ่มสารหลัก อีกทั้งยังมีกรดไขมันชนิดที่ช่วยในการดูดซึมสารไลโคปีน และเบต้าแคโรทีน [1] โดยเยื่อเมล็ดของฟักข้าวมีปริมาณเบต้าแคโรทีนสูงกว่าแครอทถึง 10 เท่า และมีไลโคปีนมากกว่ามะเขือเทศถึง 12 เท่า [2-3] สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Kubola and Siriamornpun [4] พบว่าฟักข้าวบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงมีปริมาณไลโคปีน 7.02 mg/g extract ปริมาณเบต้าแคโรทีน 8.90 mg/g และมีปริมาณลูทีน 6.50 mg/g อย่างไรก็ตามเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวมีการนำมาใช้ประโยชน์มากกว่าเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวซึ่งมีรายงานการวิจัยพบว่าเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวมีปริมาณไลโคปีนประมาณ 4 mg/g ปริมาณเบต้าแคโรทีนประมาณ 3 mg/g และปริมาณลูทีนโดยประมาณ 2 mg/g โดยมีงานวิจัยพบว่าไลโคปีนสามารถช่วยลดอัตราเสี่ยงในการเกิดมะเร็งได้บางชนิด เช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งใน ระบบทางเดินอาหาร และมะเร็งปอด ส่วนเบต้าแคโรทีนนั้นสามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอได้ในร่างกายของมนุษย์ซึ่งมีความจำเป็นต่อสุขภาพและการพัฒนาของเนื้อเยื่อเซลล์ และลูทีนมีประโยชน์ต่อสุขภาพของดวงตา มีส่วนช่วยลดความเสี่ยงการเกิดโรคหลายชนิดด้วยกัน ที่สำคัญคือ โรคต้อกระจก และโรคจุดรับภาพเสื่อม [5]

การสกัดสารกลุ่มไฟโตเคมิคอลจากพืชสามารถทำได้หลายวิธีได้แก่ การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (solvent extraction) เช่น เอทานอล เมทานอล และอะซิโตน อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เพียงอย่างเดียวทำให้ได้ร้อยละผลผลิตที่ได้ค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโครงสร้างเนื้อเยื่อของพืชมีการเรียงตัวที่แน่นทำให้ยากต่อการแทรกซึมเข้าไปของตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด การใช้เอนไซม์กลุ่มที่ย่อยผนังเซลล์ของพืช เช่น เอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์เพคติเนสในกระบวนการ pretreatment ก่อนการสกัดด้วยตัวทำละลายจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความนิยมและให้ปริมาณร้อยละผลได้ที่สูงขึ้น โดยจากงานวิจัยของ Sangkasanya et al [6] ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดแคโรทีนอยด์จาก

เนื้อสีเหลืองของฟักข้าวโดยใช้เอนไซม์ Rapidase Pineapple พบว่าการใช้เอนไซม์ดังกล่าวทำให้แคโรทีนอยด์ที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้ตัวทำละลายสกัดเพียงอย่างเดียวซึ่งจะเห็นได้ว่าเอนไซม์มีความสามารถในการช่วยการสกัดเพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้โดยสภาวะที่เหมาะสมคือการใช้เอนไซม์ Rapidase Pineapple ความเข้มข้นร้อยละ 1–2 ได้ปริมาณของสารแคโรทีนอยด์ ได้แก่ ลูทีน ไลโคปีน และเบต้าแคโรทีนประมาณ 16, 15 และ 30 mg/g ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้เอนไซม์เพคติเนสทางการค้าที่มีคุณสมบัติในการสกัดรงควัตถุจากพืชซึ่งก็คือ Rapidase Ex Color ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการสกัดแตกต่างกันในการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดแคโรทีนอยด์จากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวและประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1) เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นและระยะเวลาของการใช้เอนไซม์ Rapidase Ex Color ในกระบวนการ pretreatment ก่อนการสกัดด้วยตัวทำละลายต่อประสิทธิภาพการสกัดสารแคโรทีนอยด์จากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าว

2) เพื่อประเมินคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวที่มีการใช้เอนไซม์ในกระบวนการ pretreatment

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบและเอนไซม์

ฟักข้าวระยะสุกเต็มที่มีความสมบูรณ์จากตลาดไท นำฟักข้าวที่ได้มาล้างทำความสะอาด ปอกเปลือก แยกเอาเฉพาะส่วนเนื้อสีเหลือง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้บรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป และในการวิจัยครั้งนี้จะใช้เอนไซม์เพคติเนสทางการค้า หรือ Rapidase Ex Color จากบริษัทสยามวิกตอรี่ จำกัด

3.2 การศึกษาผลของเอนไซม์เพคติเนสทางการค้า (Rapidase Ex Color) ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารแคโรทีนอยด์จากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าว

3.2.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ Rapidase Ex Color ในการ pretreatment ต่อปริมาณสารแคโรทีนอยด์จากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวที่สกัดได้

สกัดสารแคโรทีนอยด์จากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ 1 โดยมีปัจจัยในการศึกษา คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ Rapidase Ex Color ในช่วงร้อยละ 0.25–3 มีชุดการทดลองควบคุมคือ ชุดการทดลองที่ไม่มีการใช้เอนไซม์ในการช่วยสกัด โดยวิธีการสกัดจะใช้

วิธีการและสภาวะของการใช้เอนไซม์ตามวิธีการของ Sangkasanya et al [6] ซึ่งเริ่มต้นจากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าว 2 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 28 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์ที่มีการห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์และนำไปโฮโมจีไนซ์ 1 นาที เตรียมเอนไซม์ Rapidase Ex Color ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25, 0.5, 1 , 2, และ 3 (ปริมาตร/ปริมาตร) 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาผสมกับตัวอย่างเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวที่เตรียมไว้ ในระหว่างทำการสกัดจะเป่าก๊าซไนโตรเจนเพื่อไล่ก๊าซออกซิเจนออกจากภาชนะสกัดเป็นเวลา 20 วินาที พร้อมทั้งเขย่าโดยใช้ orbital shaker เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาเติมตัวละลายผสมระหว่าง เฮกเซน : อะซิโตน : เอทานอล (50 : 25 : 25) ที่ผสมด้วย BHT (เข้มข้นร้อยละ 0.05) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และนำไปเขย่าซ้ำอีก 30 นาที ถ่ายตัวอย่างลงในกรวยแยก เขย่าเป็นเวลา 3 นาที รอให้แยกชั้น เก็บส่วนใสชั้นบน ทำการสกัดซ้ำ นำส่วนที่สกัดได้ทั้งหมดเก็บรักษาในภาชนะป้องกันแสง และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อไป

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแคโรทีนอยด์ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่ความยาวคลื่น 450 nm ระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ acetonitrile (ACN), dichloromethane (DCM) and methanol (MeOH) ในอัตราส่วน 5 : 4 : 1 (โดยปริมาตร) โดยมีการเติมสาร BHT 0.1% ในตัวทำละลายเคลื่อนที่ อัตราเร็วของตัวทำละลายเคลื่อนที่ 1 mL/min ปริมาตรในการฉีดตัวอย่าง 20 µL และใช้สารมาตรฐานของเบต้าแคโรทีน ไลโคปีน และลูทีน ทำกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณปริมาณเบต้าแคโรทีน ไลโคปีน และลูทีน [7]

3.2.2 การศึกษาผลของระยะเวลาใน pretreatment โดยใช้เอนไซม์ Rapidase Ex Color ต่อปริมาณสารแคโรทีนอยด์จากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวที่สกัดได้

เลือกความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุดจากการทดลองในตอนที่ 2.1 มาศึกษาผลของระยะเวลาในการสกัดได้แก่ 0.5, 1, 2, 3 ,4 และ 5 ชั่วโมงต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้ โดยใช้วิธีการสกัดและการวิเคราะห์เดียวกับการทดลองในตอนที่ 3.2.1

3.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่สกัดโดยใช้เอนไซม์ Rapidase Ex Color จากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าว

เลือกสภาวะการสกัดที่ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุดจากการทดลองในตอนที่ 3.2.2 โดยนำสารสกัดที่เตรียมได้มาวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน 3 วิธี คือ การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity (DPPH-RSA) วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) และวิธี Reducing power โดยมีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

3.3.1 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH-RSA (ดัดแปลงจาก Phakawat et al [8])

เจือจางสารสกัดในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำสารสกัดที่เจือจางได้ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร มาเติม 0.15 mM DPPH reagent 1.5 มิลลิลิตร นำมาบ่มในห้องมืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่มีสารมาตรฐานคือ โทรล็อกซ์ (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Trolox)

3.3.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (ดัดแปลงจาก Phakawat et al [8])

เจือจางสารสกัดในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำสารสกัดที่เจือจางได้ปริมาตร 90 ไมโครลิตร ผสมสารผสมของ FRAP Reagent 2.7 ml (เตรียมจาก 300 mM Sodium acetate trihydrate pH 3.6 25 มิลลิลิตร, 10 mM 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) 2.5 มิลลิลิตร, 1 M Ferric chloride hexahydrate 2.5 มิลลิลิตร) และเติมน้ำกลั่น 0.27 มิลลิลิตร นำมาบ่มในห้องมืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่มีสารมาตรฐานคือ โทรล็อกซ์

3.3.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Reducing power (ดัดแปลงจาก Intarasirisawat et al [9])

เจือจางสารสกัดในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำสารสกัดที่เจือจางได้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 0.2 M Monosodium phosphate pH 6.6 0.5 มิลลิลิตร และ 1% Potassium ferricyanide 0.5 มิลลิลิตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 50ºC เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมด้วย 10% Tri-chloro acetic acid 0.5 มิลลิลิตร และ 0.1% Ferric chloride Hexahydrate 0.2 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่มีสารมาตรฐานคือ โทรล็อกซ์

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 12.0 และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

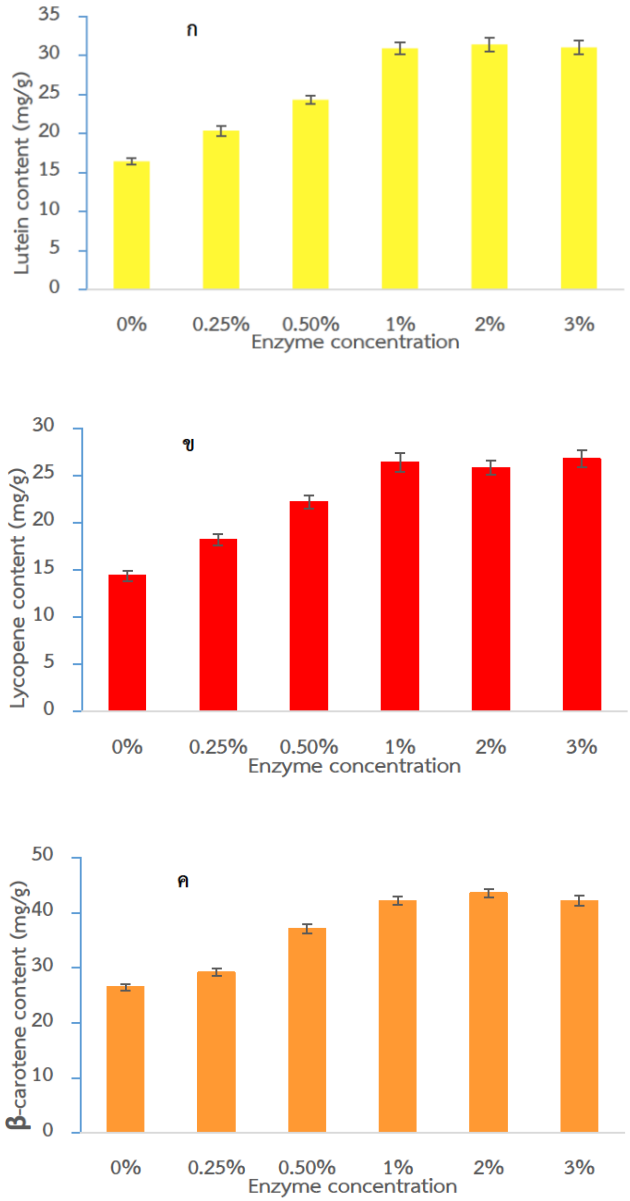
5. ผลและอภิปรายผลการวิจัย

5.1 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ Rapidase Ex Color ในการ pretreatment ต่อปริมาณสารแคโรทีนอยด์จากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวที่สกัดได้

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ Rapidase Ex Color ร้อยละ 0, 0.25, 0.5, 1, 2 และ 3 ในขั้นตอนการ pretreatment ก่อนกระบวนการสกัดแคโรทีนอยด์จากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1 พบว่าทุกชุดการทดลองที่มีการใช้เอนไซม์ในกระบวนการ pretreatment ก่อนการสกัดมีปริมาณลูทีน ไลโคปีน และเบต้าแคโรทีนมากกว่าชุดการทดลองที่สกัดด้วยตัวทำละลายเพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) และเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นในช่วงร้อยละ 0–1 ส่งผลให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้ทั้ง 3 ชนิดเพิ่มขึ้น ($P<0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นในช่วงร้อยละ 1–3 ปริมาณลูทีน ไลโคพีนและเบต้าแคโรทีนเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P\geq0.05$) ดังนั้นความเข้มข้นของเอนไซม์ Rapidase Ex Color ที่เหมาะสมในการสกัดแคโรทีนอยด์จากเนื้อส่วนสีเหลืองของฟักข้าวคือร้อยละ 1 จึงเลือกความเข้มข้นดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาผลของระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดในการศึกษาตอนต่อไป

การใช้เอนไซม์ Rapidase Ex Color ในการ pretreatment ก่อนกระบวนการสกัดสามารถเพิ่มปริมาณแคโรนอยด์ที่สกัดได้เนื่องจาก เอนไซม์ Rapidase Ex color เป็นเอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์เพคติเนสและเอนไซม์เฮมิเซลลูเลสซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มที่มีคุณสมบัติย่อยผนังเซลล์พืช โดยปกติโครงสร้างเนื้อเยื่อของพืชมีการเรียงตัวที่แข็งแรงทำให้ยากต่อการเข้าถึงของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเพียงอย่างเดียว ดังนั้นการใช้เอนไซม์กลุ่มที่ย่อยผนังเซลล์ของพืช จึงส่งผลให้ผนังเซลล์ถูกทำลายและตัวทำละลายสามารถซึมเข้าสู่ผนังเซลล์ได้ง่ายขึ้นส่งผลให้เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ โดยผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Choudhari and Ananthanarayan [10] ศึกษาการใช้เอนไซม์เพคติเนสในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 0.5-4 พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เพคติเนสสามารถเพิ่มปริมาณร้อยละผลได้ (% yield) ของสารไลโคปีนที่สกัดจากมะเขือเทศทั้งผลได้เพิ่มขึ้นโดยความเข้มข้นของเอนไซม์เพคติเนสที่เหมาะสมในการสกัดคือร้อยละ 2 และสามารถเพิ่มปริมาณไลโคปีนได้สูงถึง 90.6 µg/g (188%) เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีการใช้เอนไซม์ อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพคติเนสเพิ่มขึ้นในช่วงร้อยละ 2–4 พบว่าปริมาณไลโคปีนมีแนวโน้มคงที่และลดลงเล็กน้อย และจากงานวิจัยของ Ranveer et al [11] สกัดไลโคปีนจากมะเขือเทศโดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เพคติเนสที่แตกต่างกันพบว่าการใช้เอนไซม์ทำให้ไลโคปีนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้ตัวทำละลายสกัดเพียงอย่างเดียว เอนไซม์เพคติเนสที่ 2.0% สามารถสกัดสารไลโคปีนเพิ่มจาก 200 µg/g เป็น 1000 µg/g และจากงานวิจัยของ Lombardelli et al [12] ทำการสกัด

แคโรทีนอยด์จากมะเขือเทศโดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่าง polygalacturonase, pectate lyase, cellulase และ xylanase พบว่าการใช้เอนไซม์ดังกล่าวช่วยในเพิ่มปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้เช่นกัน



รูปที่ 1 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ Rapidase Ex Color ต่อปริมาณลูทีน (ก) ไลโคพีน (ข) และเบต้าแคโรทีน (ค) ที่สกัดได้จากส่วนเนื้อสีเหลืองของฟักข้าว

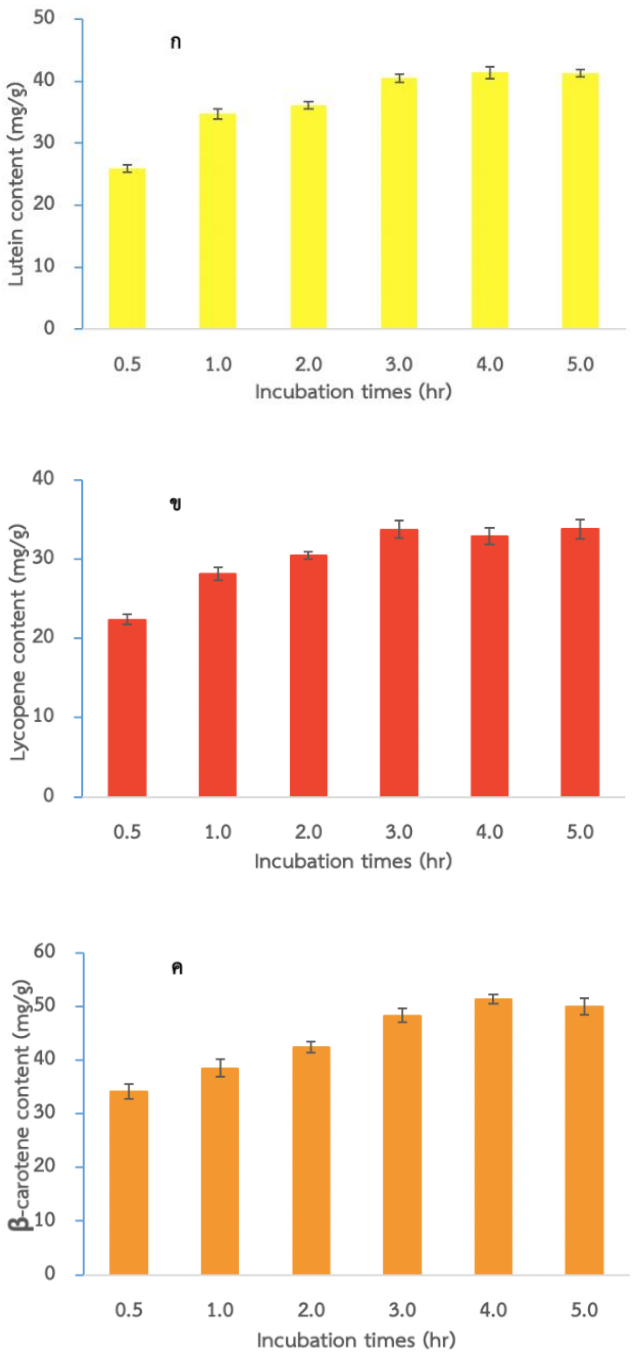
5.2 ผลของระยะเวลาใน pretreatment โดยใช้เอนไซม์ Rapidase Ex Color ต่อปริมาณสารแคโรทีนอยด์จากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวที่สกัดได้

จากการศึกษาผลของระยะเวลาใน pretreatment ได้แก่ 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมงโดยใช้เอนไซม์ Rapidase Ex Color ต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 2 จากผลการทดลองพบว่าเมื่อระยะเวลาในการ pretreatment ด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ($P<0.05$) โดยระยะเวลาในการสกัดที่ให้ปริมาณลูทีน ไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนสูงสุดคือ 3 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเมื่อระยะเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นหลังจาก 3 ชั่วโมงพบว่าปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้มีแนวโน้มไม่เปลี่ยนแปลง ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kha et al [7] ได้ศึกษาผลของระยะเวลาในการ pretreatment ด้วยเอนไซม์เพคติเนส ในช่วง 0–180 นาทีต่อปริมาณน้ำมันที่อุดมไปด้วยสารแคโรทีนอยด์จากฟักข้าวที่สกัดได้โดยจากผลการทดลองพบว่าเมื่อระยะเวลาในการ pretreatment เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณน้ำมันฟักข้าวมีค่าเพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงนาทีที่ 120 จากนั้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำมันฟักข้าวที่สกัดได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ และจากงานวิจัยของ Strati et al [13] ศึกษาการใช้เอนไซม์เพคติเนสและเอนไซม์เซลลูเลสในการสกัดแคโรทีนอยด์จากส่วนเหลือทิ้งจากมะเขือเทศโดยมีการแปรระยะเวลาในการบ่มแตกต่างกันในช่วง 30–240 นาที โดยผลการทดลองพบว่าเมื่อระยะเวลาในการ pretreatment ด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นเช่นกันโดยระยะเวลาที่ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมสูงสุดคือ 180 นาที หลังจากนั้นปริมาณแคโรทีนอยด์รวมมีแนวโน้มลดลง

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแคโรทีนอยด์จากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวคือการใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ Rapidase Ex Color ร้อยละ 1 และใช้ระยะเวลาในการบ่ม 3 ชั่วโมง โดยจะให้สารลูทีน ไลโคพีนและเบต้าแคโรทีนเพิ่มขึ้น เป็น 40, 33 และ 48 mg/g ตามลำดับ (ชุดควบคุมให้ปริมาณสารลูทีน ไลโคปีนและเบต้าแคโรทีน 16, 14 และ 26 mg/g ตามลำดับ)

5.3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแคโรทีนอยด์จากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าว

แคโรทีนอยด์เป็นสารที่พบได้ในธรรมชาติพบมากในพืชที่มีสีแดง ส้ม และเหลือง มีคุณสมบัติเป็นทั้งสารต้านอนุมูลอิสระ สารก่อมะเร็งในสิ่งแวดล้อมและช่วยป้องกันการก่อตัวของอนุมูลอิสระที่เป็นอันตราย โดยเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวเป็นส่วนที่อุดมไปด้วยแคโรทีนอยด์ซึ่งมีคุณสมบัติสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ [4, 14] ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้วัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธีได้ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 1



รูปที่ 2 ผลของระยะเวลาการ **pretreatment** ด้วยเอนไซม์ **Rapidase Ex Color** ต่อปริมาณลูทีน (ก) ไลโคพีน (ข) และเบต้าแคโรทีน (ค) ที่สกัดได้จากส่วนเนื้อสีเหลืองของฟักข้าว

ตารางที่ 1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแคโรทีนอยด์จากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวที่สกัดด้วยเอนไซม์เปรียบเทียบกับไม่ใช้เอนไซม์

วิธีวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (mmol Trolox equivalent /g extract)	
	สารสกัดที่ใช้เอนไซม์ในกระบวนการ pretreatment	สารสกัดที่ไม่ใช้เอนไซม์ในกระบวนการ pretreatment
DPPH-RSA	474.76 ± 3.45	233.49 ± 2.31
FRAP	762.17 ± 2.52	567.75 ± 3.89
Reducing powder	6.30 ± 0.78	2.23 ± 0.31

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เป็นการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนอิสระกับอนุมูลอิสระ โดย DPPH คืออนุมูลอิสระที่มีความเสถียร (stable free radical) เป็นสารที่นิยมนำไปใช้เป็นตัวชี้วัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่สนใจใช้หลักการของ DPPH ในรูปของอนุมูลอิสระที่อยู่ในสารละลายจะมีสีม่วงเข้ม เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปออกซิไดซ์ (DPPH) ซึ่งการลดลงของอนุมูลอิสระดังกล่าวจะสังเกตได้จากการจางลงของสีม่วงในสารละลาย สามารถวัดการค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ลดลง [15] โดยจากการทดลองพบว่าเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวที่ผ่านกระบวนการใช้เอนไซม์พบว่ามีค่าสูงกว่าประมาณ 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดที่ไม่ได้มีการใช้เอนไซม์

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เป็นวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอน (ตัวรีดิวซ์) ซึ่งจะมีผลทำให้ ferric ion (Fe^{3+}) ในสารจะถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระจากสารประกอบเชิงซ้อนเหล็ก Fe^{3+}-TPTZ ได้เป็น ferrous ion (Fe^{2+}) คือเป็น Fe^{2+}- TPTZ ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร [15] โดยจากการทดลองพบว่าเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็กของสารสกัดจากส่วนเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวพบว่าสารสกัดที่มีการใช้เอนไซม์ในกระบวนการสกัดมีความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็กได้ 762.17 mmol Trolox equivalent /g extract โดยสูงกว่าสารสกัดที่ไม่ได้ใช้เอนไซม์ในกระบวนการสกัดซึ่งความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็กได้ 567.74 mmol Trolox equivalent /g extract

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Reducing power อาศัยหลักการที่สารต้านออกซิเดชันในตัวอย่างสามารถรีดิวซ์ Fe^{3+} ในสารประกอบ potassium ferricyanide ทำให้

สีของสารประกอบนี้เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีเขียว และจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตรสูงขึ้น โดยเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากฟักข้าวที่สกัดโดยใช้เอนไซม์เมื่อวัดด้วยวิธี reducing power พบว่ามีค่าสูงกว่าสารสกัดจากฟักข้าวที่สกัดโดยวิธีไม่ใช้เอนไซม์ถึงเกือบ 3 เท่า

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการใช้เอนไซม์ในกระบวนการ pretreatment ก่อนการสกัดสามารถเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวได้ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่วิเคราะห์ได้ข้างต้น ทั้งนี้เนื่องมาจากการใช้เอนไซม์ช่วยให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้มีค่าเพิ่มขึ้นซึ่งแคโรทีนอยด์มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Phan-Thi et al [1] และ Kha et al [7] ซึ่งได้ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS-RSA (2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6- sulfonic acid)) ในเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว พบว่าแคโรทีนอยด์โดยเฉพาะ lycopene มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ Chuyen et al [16] ได้รายงานว่าสารสกัดแคโรทีนอยด์จากเปลือกฟักข้าวมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน นอกจากนี้แคโรทีนอยด์จากพืชแหล่งอื่นได้แก่ ไลโคปีนจากแตงโม [14] ไลโคปีนจากฝรั่งสีชมพู [17] ก็พบรายงานฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อตรวจวัดด้วยวิธี DPPH-RSA และ FRAP เช่นกัน

6. สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการสกัดสารกลุ่มแคโรทีนอยด์โดยใช้เอนไซม์กลุ่มย่อยผนังเซลล์พืชคือ Rapidase Ex color พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแคโรทีนอยด์จากเนื้อสีเหลืองของฟักข้าวคือการใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ Rapidase Ex Color ร้อยละ 1 และใช้ระยะเวลาในการบ่ม 3 ชั่วโมง โดยให้ปริมาณลูทีน ไลโคพีนและเบต้าแคโรทีนสูงที่สุดซึ่งเพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 2 เท่า และส่งผลให้ความสามารถในการต้านอนุนูลอิสระของสารสกัดเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าเมื่อตรวจวัดด้วยวิธี DPPH-RSA และ Reducing power และประมาณ 1.5 เท่าเมื่อตรวจวัดด้วยวิธี FRAP เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีการใช้เอนไซม์ในกระบวนการสกัด

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเกษมบัณฑิต ปีการศึกษา 2561

References

[1] Phan-Thi H, Wache Y. Isomerization and increase in the antioxidant properties of lycopene from *Momordica cochinchinensis* (gac) by moderate heat treatment with UV–Vis spectra as a marker. Food Chemistry 2014;156:58-63.

[2] Nhung DT, Bung PN, Ha NT, Phong TK. Changes in lycopene and beta carotene contents in aril and oil of gac fruit during storage. Food Chemistry 2010;121:326-31.

[3] Vuong LT, Franke AA, Custer LJ, Murphy SP. *Momordica cochinchinensis* Spreng. (gac) fruit carotenoids reevaluated. Journal of Food Composition and Analysis 2006;19:664-8.

[4] Kubola J, Siriamornpun S. Physicochemicals and antioxidant activity of different fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai Gac (*Momordica cochinchinensis Spreng*). Food Chemistry 2011;127:1138-45.

[5] Becerra MO, Contrerac LM, Lo MH, Diaz JM, Herrera GC. Lutein as a functional food ingredient: Stability and bioavailability. Journal of Functional Foods 2020;66:1033771-91.

[6] Sangkasanya S, Naknaen P, Suntikul N, Lertpitakthum S. Enhancing Extraction Efficiency of Carotenoids from Yellow Pulp of Gac Fruit (*Momordica cochinensis* (Lour.) *Spreng*) by Biological Process: Effect of Rapidase Concentration. Proceeding of The 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference; 2016 November 28-30, Thailand.

[7] Kha TC, Phan-Tai H, Nguyen MH. Effects of pre-treatments on the yield and carotenoid content of Gac oil using supercritical carbon dioxide extraction. Journal of Food Engineering 2014;120:44-9.

[8] Phakawat T, Soottawat B, Thummanoon P. Effects of oxygen and antioxidants on the lipid oxidation and yellow discolouration of film from red tilapia mince. Journal of the Science of Food and Agriculture 2012:92;2507-17

[9] Intarasirisawat R, Benjakul S, Visessanguan W, Wu J. Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (*Katsuwonous pelamis*) roe. Food Chemistry 2012;135:3039-48.

[10] Choudhari SM, Anathanarayan L. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. Food Chemistry 2007;102:77-81.

[11] Ranveer RC, Patil SN, Sahoo A K. Effect of different parameters on enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste. Food and Bioproducts Processing 2013;91:370-5.

[12] Lombardelli C, Liburdi K, Benucci I, Esti M. Tailored and synergistic enzyme-assisted extraction of carotenoid-containing chromoplasts from tomatoes. Food and Bioproducts Processing 2020;121:43-53.

[13] Strati IF, Gogou E, Oreopoulou V. Enzyme and high pressure assisted extraction of carotenoids from tomato waste. Food and Bioproducts Processing 2015;94:668-74.

[14] Kim CH, Park MK, Kim SK, Cho YH. Antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of lycopene in watermelon. International Journal of Food Science and Technology 2014;49:2083-91.

[15] Kittipat Sopittummakhun and Panthip Rattanasinganchan. Extraction and determination of antioxidant activity in herbal plant. Huachiew Chalermprakiat Science and Technology Journal 2017;1:86-94 (In Thai)

[16] Chuyen HV, Roach PD, Golding JB, Park SE, Nguyen MH. Encapsulation of carotenoid-rich oil from Gac peel: Optimisation of the encapsulating process using a spray drier and the storage stability of encapsulated powder. Powder Technology 2019;344:373-9.

[17] Kong KW, Ismail A. Lycopene content and lipophilic antioxidant capacity of by-products from *Psidium guajava* fruits produced during puree production industry. Food and Bioproducts Processing 2011;89:53-61.

ประวัติผู้เขียนบทความ

วรากร เกิดทรัพย์ ตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ หมวดคณิตศาสตร์และวิทยาศาสตร์สำหรับวิศวกร คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษมบัณฑิต E-mail: warakorn.ker@kbu.ac.th
สนใจงานวิจัยด้านการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง

พิสุทธิ หนักแน่น ตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ คณะเทคโนโลยีและนวัตกรรมผลิตภัณฑ์การเกษตร มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ E-mail: phisut@g.swu.ac.th
สนใจงานวิจัยด้านการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารจากตาลโตนด ผลิตภัณฑ์อาหารพลังงานต่ำ ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในอาหาร

ปรมาภรณ์ เกิดทรัพย์ ตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพและผลิตภัณฑ์การเกษตร คณะเทคโนโลยีและนวัตกรรมผลิตภัณฑ์การเกษตร มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
E-mail: paramapornk@g.swu.ac.th
สนใจงานวิจัยด้านการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร และการพัฒนาบรรจุภัณฑ์ที่ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหาร

Article History:
Received: April 20, 2023
Revised: December 8, 2023
Accepted: December 13, 2023