บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

1. วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือ

1.1 วัตถุดิบในการทดลอง

1.1.1 กากมะเขือเทศเหลือทิ้งจากโรงงานแปรรูปมะเขือเทศเข้มข้น บริษัท ศรีเชียงใหม่อุตสาหกรรม จำกัด จังหวัดหนองคาย

1.1.2 มะเขือเทศสดชนิดลูกใหญ่ ซื้อจากตลาดท้องถิ่นใน จ.ขอนแก่น เลือกมะเขือเทศสุกที่มีสีแดงจัด น้ำหนักผลประมาณ 70-80 กรัม

1.2 สารเคมี

1.2.1 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) บริษัท Ajax Finechem ประเทศออสเตรีย

1.2.2 ไฮโดรคลอริค (Hydrochloric acid) บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

1.2.3 กรดบอริก (Boric acid) บริษัท Fisher Scientific ประเทศเยอรมัน

1.2.4 ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) บริษัท Fisher Scientific ประเทศอังกฤษ

1.2.5 กรดซัลฟิวริค (Sulfuric acid) บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

1.2.6 สารป้องกันการเกิดฟอง (antifoam) บริษัท Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

1.2.7 เอทานอล Commercial Grade ประเทศไทย

1.2.8 อะซิโตน (Acetone) บริษัท วิทยาศรม ประเทศไทย

1.2.9 ชุดวิเคราะห์ใยอาหารรวม (total dietary fibre Assay kit) บริษัท Megazyme ประเทศไอร์แลนด์

1.2.10 แมกนีเซียมคาร์บอเนต (Magnesium carbonate) บริษัท Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH ประเทศเยอรมัน

1.2.11 เฮกเซน (Hexane) Commercial Grade บริษัท ซีนิธไซเอนซ์ ประเทศไทย

1.2.12 เอทิลอะซีเตต (Ethyl acetate) บริษัท Fisher Scientific ประเทศอังกฤษ

1.2.13 ไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether) บริษัท Fisher Scientific ประเทศอังกฤษ

1.2.14 โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulfate anhydrous) บริษัท Fisher Scientific ประเทศอังกฤษ

1.2.15 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) บริษัท BDH ประเทศอังกฤษ

1.2.16 เมทานอล (Methanol) HPLC Grade บริษัท QRëC ประเทศนิวซีแลนด์

1.2.17 อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile) HPLC Grade บริษัท Fisher Scientific ประเทศอังกฤษ

1.2.18 เอทิลอะซีเตต (Ethyl acetate) HPLC Grade บริษัท Fisher Scientific ประเทศอังกฤษ

1.2.19 ไตรเอทิลเอมีน (Triethylamine) บริษัท Ajax Finechem ประเทศนิวซีแลนด์

1.2.20 สารมาตรฐานไลโคปีน บริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.2.21 สารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) บริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.2.22 สารมาตรฐานโทรล็อก (6 Hydroxy-2,5,7,8-trimethyl-chroman-2-carboxylic acid; Trolox®) บริษัท Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH ประเทศเยอรมัน

1.2.23 ฟอลิน-ซิโอแคลตู รีเอเจนต์ (Folin-Ciocalteu Reagent) บริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี

1.2.24 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) บริษัท Ajax Finechem ประเทศนิวซีแลนด์

1.2.24 2,2-เอไซโนบิส (3-เอทิลเบนไทอะโซลีน-ซัลโฟนิกแอซิต (2,2-Azinobis (3-ethylbenzthiazoline - sulphonic acid) (ABTS) บริษัท Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH ประเทศเยอรมัน

1.2.25 โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate) บริษัท Merck KGaA ประเทศเยอรมัน

1.2.26 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate) บริษัท Ajax Finechem ประเทศนิวซีแลนด์

1.2.27 โพแทสเซียมเฟอร์ริคไซยาไนด์ (Potassium ferricyanide) บริษัท Ajax Finechem ประเทศนิวซีแลนด์

1.2.28 ไตรคลอโรอะซีติคแอซิด (Trichloroacetic acid) บริษัท Fisher Scientific ประเทศอังกฤษ

1.2.29 เฟอร์ริคคลอไรด์ (Ferric chloride) บริษัท RFCL ประเทศอินเดีย

1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1.3.1 เครื่องชั่งละเอียด (Balance) รุ่น PB 4002-S บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

1.3.2 เครื่องผสม (Vortex mixer) รุ่น G-560E บริษัท Scientific industries ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.3.3 เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกสาร (Centrifuge) รุ่น Legend Mach 1.6R บริษัท Thermo Scientific ประเทศเยอรมัน

1.3.4 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) รุ่น ED 115 ของบริษัท Binder ประเทศเยอรมัน

1.3.5 ตู้อบลมร้อน (Cabinet Tray Dryer) ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.3.6 ตู้แช่แข็งแบบ cabinet freezer ของบริษัท Ice land ประเทศไทย

1.3.7 ชุดเครื่องกลั่นโปรตีน (Kjeltec System) รุ่น 1022 Distilling unit บริษัท Tecator ประเทศเนเธอร์แลนด์

1.3.8 ชุดเครื่องสกัดไขมัน (Extraction unit) รุ่น Soxtec system HT6 บริษัท Tecator ประเทศเนเธอร์แลนด์

1.3.9 เตาเผาอุณหภูมิสูง (Muffle furnace) รุ่น ELF 10/4 บริษัท Carbolite ประเทศอังกฤษ

1.3.10 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น DC 100 ประเทศเดนมาร์ก

1.3.11 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Shaking water bath) รุ่น SBD 50 BIO บริษัท Helo Lab Equipmant ประเทศเดนมาร์ก

1.3.12 เครื่องบด (Pin mill) No. 1405 บริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น

1.3.13 เครื่องวัดสี (Chroma meter) CR-300 บริษัท Minolta ประเทศญี่ปุ่น

1.3.14 เครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) รุ่น Rotavapor R-124 บริษัท Büchi ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

1.3.15 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer) รุ่น Lambda 25 บริษัท Perkin-Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.3.16 เครื่องโครมาโตกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ประกอบด้วยปั๊ม (Waters™ controller) รุ่น 600 เครื่องฉีดตัวอย่างแบบอัตโนมัติ (Auto sample) รุ่น 717 Plus และเครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลต (Waters™ Absorbance detector) รุ่น 486 Tunable บริษัท Waters ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.3.17 คอลัมน์วิเคราะห์สารชนิด C_{18} รุ่น Symmetry Reverse-phase ขนาด 250X3.9 มิลลิเมตร ขนาด packing material มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ไมโครเมตร บริษัท Waters ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.3.18 เครื่องโฮโมจิไนเซอร์ รุ่น x16/25 บริษัท Ystral ประเทศเยอรมัน

1.3.19 เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย Buchi Mini Spray Dryer B-191 ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

1.3.20 เครื่องทำแห้งแบบระเหิด รุ่น Freezone 4.5 LabConco Freeze Dry Systems บริษัท LabConco Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.3.21 เครื่องแยกกาก ประเทศไทย

1.3.22 ตะแกรงร่อน ขนาด 30 mesh

1.3.23 หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร

1.3.24 ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 5, 10, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร

1.3.25 กรวยแยก (separatory funnel) ขนาด 250 มิลลิลิตร

1.3.26 ขวดแก้วสีชาขนาด 10 มิลลิลิตร

1.3.27 ถุงพลาสติกเคลือบด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ (OPP/AL/LLDPE : oriented polypropplene/aluminium/linear low density polyethylene) ความหนา 100 ไมโครเมตร

2. วิธีการวิจัย

2.1 การเตรียมและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกากมะเขือเทศ

2.1.1 การเตรียมกากมะเขือเทศ

1) กากมะเขือเทศสดจากโรงงาน

เก็บตัวอย่างกากมะเขือเทศเหลือทิ้งจากโรงงานแปรรูปมะเขือเทศเข้มข้น โดยไปรอรับทันทีเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการผลิต และขนส่งโดยบรรจุในถุงสีดำเก็บไว้ในถังน้ำแข็งที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 4 °ซ เดินทางจากโรงงาน (จ.หนองคาย) มาที่ห้องปฏิบัติการ (จ.ขอนแก่น) ใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง ซึ่งกากมะเขือเทศที่ใช้ได้รับการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ของวัตถุดิบเริ่มต้นวิเคราะห์โดย จันทนี อุริยะพงศ์สรรค์ และคณะ (2552) พบว่า กากมะเขือเทศเหลือทิ้งนี้มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนยีสต์และรา จำนวนโคลิฟอร์ม และ *Salmonella sp.* (4.3×10^5, 6.8×10^2, น้อยกว่า 3 cfu/g และตรวจไม่พบ ตามลำดับ) อยู่ในระดับปลอดภัยซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (1×10^6, 1×10^4, 1×10^2cfu/g และตรวจไม่พบ ตามลำดับ)

นำมาบรรจุแบบสุญญากาศในถุงพลาสติกเคลือบด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ เพื่อป้องกันการเสื่อมเสียของไลโคปีนเนื่องจากออกซิเจนและแสง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 °ซ ในตู้แช่แข็งแบบ cabinet freezer (ดัดแปลงมาจาก Hart and Scott 1995) จนกระทั่งทำการวิเคราะห์

2) ผงมะเขือเทศอบแห้งจากกากโรงงาน

นำมะเขือเทศจากข้อ 1) ไปอบแห้งโดยใช้ตู้อบลมร้อน (Cabinet Tray Dryer) ที่อุณหภูมิ 50-70 °ซ จนได้ความชื้นประมาณร้อยละ 5-8 และบดเป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบด (Pin mill) ตามวิธีการของ จันทนี อุริยะพงศ์สรรค์ และคณะ (2552) จากนั้นร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 30 เมช (mesh) นำมาบรรจุแบบสุญญากาศในถุงพลาสติกเคลือบด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ เพื่อป้องกันการเสื่อมเสียของไลโคปีนเนื่องจากออกซิเจนและแสง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 °ซ ในตู้แช่แข็งแบบ cabinet freezer (ดัดแปลงมาจาก Hart and Scott 1995) จนกระทั่งทำการวิเคราะห์

3) ผงมะเขือเทศอบแห้งจากกากเตรียมในห้องปฏิบัติการ

นำมะเขือเทศสดมาล้างด้วยน้ำสะอาด ลวกด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 °ซ เป็นเวลา 5 วินาที (โดยใช้มะเขือเทศ 1 กิโลกรัม ต่อน้ำ 10 ลิตร) จากนั้นนำมาผ่านกระบวนการแยกกากโดยใช้เครื่องแยกกากที่มีขนาดรูกรอง 0.1 มิลลิเมตร แยกได้เป็นส่วนน้ำมะเขือเทศและกากมะเขือเทศ นำส่วนกากมะเขือเทศไปอบแห้งและบดเป็นผงละเอียด ตามวิธีการของ จันทนี อุริยะพงศ์สรรค์ และคณะ (2552) จากนั้นร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 30 เมช (mesh) นำมาบรรจุแบบสุญญากาศในถุงพลาสติกเคลือบด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ เพื่อป้องกันการเสื่อมเสียของไลโคปีนเนื่องจากออกซิเจนและแสง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 °ซ ในตู้แช่แข็งแบบ cabinet freezer (ดัดแปลงมาจาก Hart and Scott 1995) จนกระทั่งทำการวิเคราะห์

2.1.2 วิเคราะห์ลักษณะทางเคมีและกายภาพของกากมะเขือเทศ

นำตัวอย่างมาทำการละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 4 °ซ แล้ววิเคราะห์ลักษณะเคมีและกายภาพ ดังนี้

2.1.2.1 ปริมาณความชื้น (AOAC 1999, 930.04) (ภาคผนวก ก)

2.1.2.2 ปริมาณโปรตีน (AOAC 1999, 920.152) (ภาคผนวก ก)

2.1.2.3 ปริมาณเถ้า (AOAC 1999, 940.26) (ภาคผนวก ก)

2.1.2.4 ปริมาณไขมัน (AOAC 1999, 954.02) (ภาคผนวก ก)

2.1.2.5 ปริมาณใยอาหารทั้งหมด ใยอาหารชนิดละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ วิเคราะห์โดยใช้ kit จาก Megazyme International, Ireland ซึ่งอ้างอิงวิธีการวิเคราะห์จาก AOAC 991.43 (ภาคผนวก ก)

2.1.2.6 วัดค่าสีในระบบ CIE (L*a*b*) โดยใช้เครื่อง Chroma meter CR-300 บริษัท Minolta และคำนวณค่ามุมเฉดสี (h*)

2.1.2.7 วิเคราะห์ปริมาณสารไลโคปีน (ดัดแปลงตามวิธีของ Taungbodhitham and others 1998) ทำการสกัดไลโคปีนตามภาพที่ 8 โดยชั่งตัวอย่างกากมะเขือเทศ 1 กรัม เติมสารแมกนีเซียมคาร์บอเนต 0.05 กรัม และสารทำละลายอินทรีย์ผสมเอทานอลต่อเฮกเซนในอัตราส่วน 4:3 (โดยปริมาตร) 35 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 × g เป็นเวลา 10 นาที และกรองสุญญากาศผ่าน bucher funnel โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เพื่อแยกส่วนของแข็ง (กากมะเขือเทศ) และส่วนของเหลว (สารสกัด) ออกจากกัน นำส่วนของแข็งมาสกัดตามขั้นตอนข้างต้นอีกครั้งหนึ่ง กรองและล้างกากที่เหลือด้วยเอทานอล 25 มิลลิลิตร และเฮกเซน 12.5 มิลลิลิตร รวบรวมส่วนของเหลว (สารสกัด) แล้วนำไปเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 (โดยมวลต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ในกรวยแยก จะเกิดการแยกชั้นของสารละลายชั้นบน(สีส้มเข้ม) และชั้นล่าง (สีเหลืองอ่อน) เก็บเอาส่วนสารละลายชั้นบน (สีส้มเข้ม) นำไปเติมน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร และทำการแยกสารละลายชั้นบนและล่างออกจากกันโดยใช้กรวยแยก แล้วเก็บสารละลายชั้นบน (สีส้มเข้ม) นำมากรองผ่านสารโซเดียมซัลเฟตเพื่อกำจัดน้ำออก แล้วทำการระเหยสุญญากาศด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 °ซ ความดัน 200 มิลลิบาร์ จากนั้นละลายสารสกัดและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยเฮกเซน วิเคราะห์ปริมาณไลโคปีน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 503 นาโนเมตร โดยใช้เฮกเซนเป็นสารละลายอ้างอิง (blank) คำนวณหาปริมาณไลโคปีน (ภาคผนวก ข)

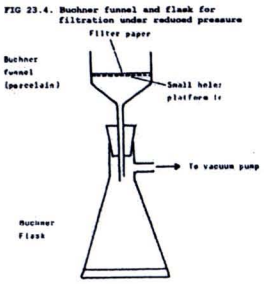
วางแผนการทดลองแบบสุ่มโดยสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Windows version 17.0 ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนและทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทรีทเมนต์โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ในการทดลองขั้นนี้จะทำการทดลอง 2 ซ้ำ

ชั่งน้ำหนักกากมะเขือเทศ 1 กรัม + แมกนีเซียมคาร์บอเนต 0.05 กรัม + เอทานอลต่อเฮกเซน (4:3 v/v) 35 มิลลิลิตร

↓

ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer 2 นาที, ปั่นเหวี่ยง 10,000× g 10 นาที
และกรองสุญญากาศด้วย Büchner funnel โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์1

↓



นำมาสกัดครั้งที่ 2 ตามขั้นตอนข้างต้นอีกครั้งหนึ่ง

↓

ล้างกากที่เหลือด้วยเอทานอล 25 มิลลิลิตร และกรอง

↓

ล้างกากที่เหลือด้วยเฮกเซน 12.5 มิลลิลิตร และกรอง

↓

ส่วนของเหลวที่กรองได้ (สารสกัดทั้งหมด) | ส่วนของแข็ง (กาก)

↓

ย้ายสารสกัดใส่กรวยแยก

↓

เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 10% 100 มิลลิลิตร

↓

สารละลายชั้นบน(สีส้มเข้ม) | สารละลายชั้นล่าง (สีเหลืองอ่อน)

↓

เติมน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร

↓

สารละลายเกิดการแยกชั้น

↓

สารละลายชั้นบน(สีส้มเข้ม) | สารละลายชั้นล่าง

↓

กรองผ่านสารโซเดียมซัลเฟต เพื่อกำจัดน้ำออก

↓

ระเหยสุญญากาศด้วยเครื่อง rotary evaporator (40°ซ) ความดัน 200 มิลลิบาร์

↓

นำไปวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีนด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 503

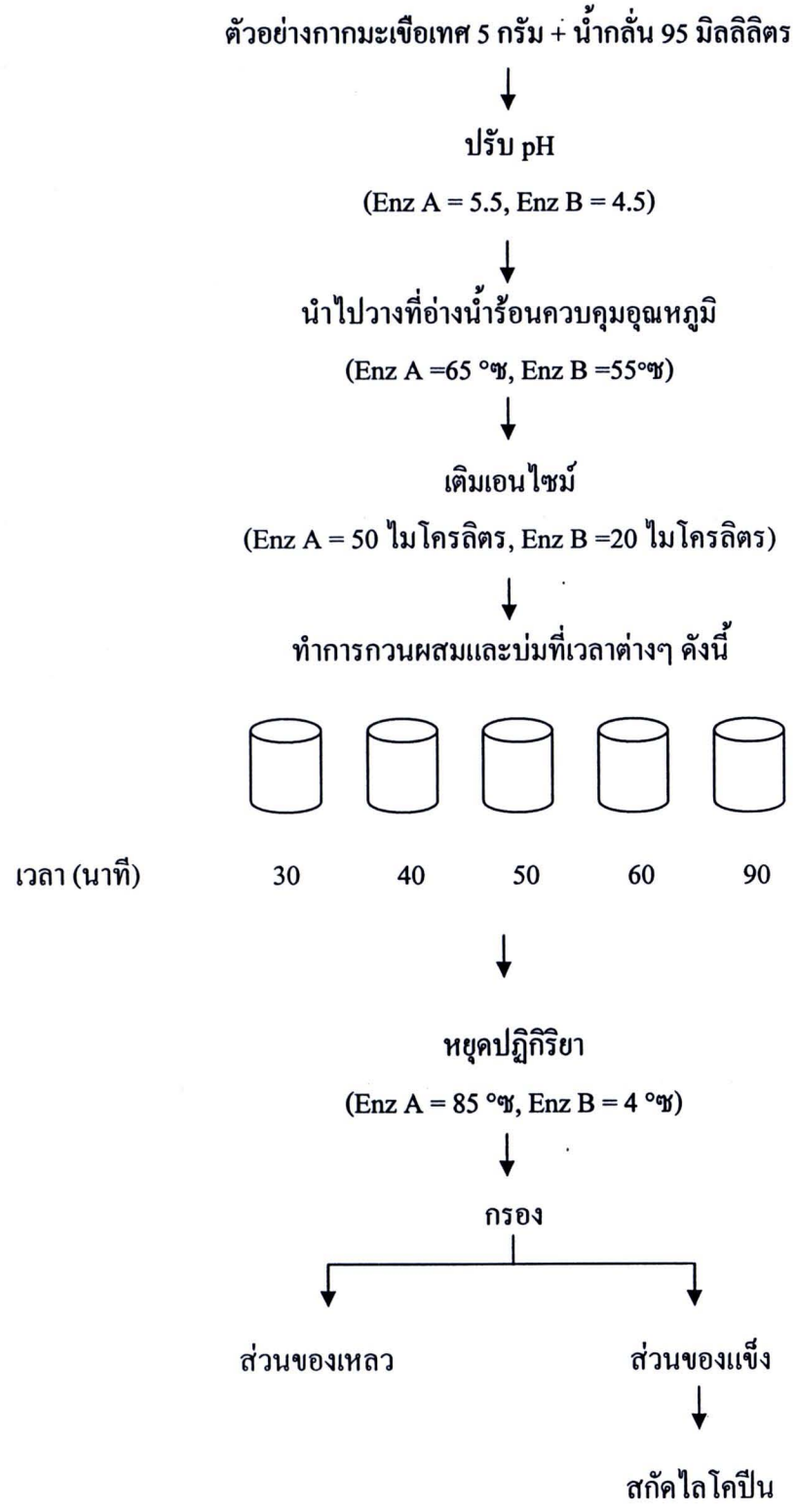
ภาพที่ 8 การสกัดไลโคปีนจากกากมะเขือเทศ (ดัดแปลงจาก Taungbodhitham and others 1998)

2.2 การศึกษาสภาวะการสกัดโดยใช้สารทำละลายอินทรีย์ร่วมกับเอนไซม์ต่อปริมาณไลโคปีน

2.2.1 การคัดเลือกเอนไซม์และระยะเวลาในการย่อยของเอนไซม์

จัดการทดลองแบบ 2x5 Factorial in Completely Randomized Design (CRD) โดยปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ การใช้เอนไซม์ทางการค้าที่ประกอบด้วยกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เพคติเนส เซลลูเลส และเฮมิเซลลูเลส 2 ชนิด (Enz A และ Enz B) และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยของเอนไซม์ 5 ระดับ (30, 40, 50, 60 และ 90 นาที) การทดลองในส่วนนี้ได้ใช้ตัวอย่างกากมะเขือเทศจากโรงงานที่ทำเป็นผงแห้งเป็นวัตถุดิบเพื่อใช้ในการคัดเลือกเอนไซม์ ดังภาพที่ 9 โดยนำตัวอย่างกากมะเขือเทศ 5 กรัม ผสมน้ำกลั่น 95 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 5.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.2 N สำหรับ Enz A และปรับ pH เป็น 4.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 0.2 N สำหรับ Enz B ทำการสกัดในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ 65 และ 55 °ซ สำหรับ Enz A และ Enz B ตามลำดับ เติมเอนไซม์ (Enz A = 50 ไมโครลิตร, Enz B =20 ไมโครลิตร) แล้วนำไปกวนผสมและย่อยเพื่อศึกษาระยะเวลาของการทำงานของเอนไซม์ 5 ระดับ ดังนี้ 30, 40, 50, 60 และ 90 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดให้หยุดปฏิกิริยา โดยเพิ่มอุณหภูมิให้เป็น 85°ซ เป็นเวลา 10 นาที สำหรับ Enz A และลดอุณหภูมิลงเหลือ 4 °ซ เป็นเวลา 10 นาที สำหรับ Enz B จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางและกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 แยกได้ส่วนของเหลวใส (ที่มีใยอาหารละลายน้ำ) และส่วนของแข็ง (กากมะเขือเทศ) จากนั้นนำส่วนของแข็งที่ไม่ผ่านการกรองมาวิเคราะห์หาปริมาณไลโคปีน ตามวิธีการสกัดในภาพที่ 8 และวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 503 นาโนเมตร (ดัดแปลงตามวิธีของ Taungbodhitham and others 1998)

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Windows version 17.0 ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนและทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทรีทเมนต์โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ในการทดลองขั้นนี้จะทำการทดลอง 2 ซ้ำ



ภาพที่ 9 กระบวนการคัดเลือกเอนไซม์และระยะเวลาในการย่อยของเอนไซม์

2.2.2 การคัดเลือกชนิดของสารทำละลายอินทรีย์ในการสกัดไลโคปีนจากกากมะเขือเทศ

เมื่อคัดเลือกเอนไซม์และเวลาย่อยที่เหมาะสมได้แล้วจากข้อ 2.2.1 จากนั้นใช้สภาวะดังกล่าวย่อยตัวอย่างกากมะเขือเทศ แล้วนำส่วนของแข็งที่ไม่ผ่านการกรอง (กากมะเขือเทศ) มาสกัดไลโคปีนตามวิธีในภาพที่ 8 โดยเปลี่ยนเป็นใช้สารทำละลายอินทรีย์ชนิด 3 ชนิด ได้แก่ เอทิลอะซีเตต เอทานอล และไดเอทิลอีเทอร์ (Calvo and others 2007; Ishida and Chapman 2009) ซึ่งเป็นสารที่ไม่เป็นพิษ ได้รับอนุญาตให้ใช้ในอาหารได้ (FDA 2009) และวิเคราะห์ปริมาณสารไลโคปีนด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 503 นาโนเมตร (ดัดแปลงตามวิธีของ Taungbodhitham and others 1998)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มโดยสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Windows version 17.0 ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนและทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทรีทเมนต์โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ในการทดลองขั้นนี้จะทำการทดลอง 2 ซ้ำ

2.2.3 การศึกษาการสกัดไลโคปีนโดยใช้เอนไซม์ร่วมกับสารทำละลายอินทรีย์ในกากมะเขือเทศสดจากโรงงาน ผงมะเขือเทศอบแห้งจากกากโรงงาน และผงมะเขือเทศอบแห้งจากกากเตรียมในห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มโดยสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ปัจจัยที่ต้องการศึกษา คือ ตัวอย่างกากมะเขือเทศ 3 ชนิด ได้แก่ กากมะเขือเทศสดจากโรงงาน ผงมะเขือเทศอบแห้งจากกากของโรงงาน และผงมะเขือเทศอบแห้งจากกากที่เตรียมในห้องปฏิบัติการ ทำการสกัดไลโคปีนตามสภาวะการใช้เอนไซม์และสารทำละลายอินทรีย์ที่ได้คัดเลือกไว้จากข้างต้น จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณสารไลโคปีนด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (ดัดแปลงตามวิธีของ Taungbodhitham and others 1998) และโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ดัดแปลงตามวิธี Gama and others (2006)

สภาวะการวิเคราะห์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ดัดแปลงตามวิธี Gama and others (2006) : ใช้คอลัมน์ C_{18} วิเคราะห์โดยใช้ระบบ Gradient Elution อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตร/นาที โดยมีอะซิโตไนไตรล์ เมทานอล และเอทิลอะซีเตตผสมกับไตรเอทิลเอมีน (ร้อยละ 0.05) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งเริ่มต้นที่อัตราส่วน อะซิโตไนไตรล์ : เมทานอล : เอทิลอะซีเตตผสมกับไตรเอทิลเอมีน (ร้อยละ 0.05) เท่ากับ 88 : 8 : 4 แล้วเปลี่ยนเป็น 48 : 26 : 26 ภายใน 25 นาที และเปลี่ยนกลับมาเป็นอัตราส่วนเริ่มต้น 88 : 8 : 4 ภายใน 30 นาที (นาทีที่ 55) โดยใช้เครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลต-วิสิเบิล (UV-Vis detector) ที่ความยาวคลื่น 475

นาโนเมตร ก่อนฉีดตัวอย่างเข้าเครื่องต้องกรองตัวอย่างสารสกัดไลโคปีนด้วยเมมเบรนที่มีขนาดรูเปิดของการกรอง 0.22 ไมโครเมตร แล้วฉีดสารตัวอย่างเข้าเครื่องด้วยปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำการบันทึกค่าพื้นที่ใต้กราฟ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของสารไลโคปีนที่สกัดได้ โดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้นสารมาตรฐานไลโคปีน

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมกราฟสารละลายมาตรฐานไลโคปีนความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 5-30 ppm สำเร็จรูป SPSS for Windows version 17.0 ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนและทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทรีทเมนต์โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ในการทดลองขั้นนี้จะทำการทดลอง 2 ซ้ำ

2.3 การศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compounds) ของสารสกัดไลโคปีน (lycopene extract)

นำสารสกัดไลโคปีน ที่ได้จากข้อ 2.2.3 วิเคราะห์ดังนี้

2.3.1 ABTS free radical decolorization assay (Re and others 1999)

เตรียมสารละลาย $ABTS^{\cdot+}$ (working solution) โดยปิเปตสารละลาย 2,2-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-sulphonic acid) (ABTS) ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ (Stock solution) ปริมาตร 2 มิลลิลิตรและสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate) ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ทำการเจือจางสารละลาย $ABTS^{\cdot+}$ (working solution) ให้สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.70 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ปิเปตสารละลาย $ABTS^{\cdot+}$ ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและตัวอย่างสารสกัดไลโคปีนหรือสารละลายมาตรฐานที่ต้องการทดสอบปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็นสารละลายอ้างอิง (blank) นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโทรล็อก (Trolox) ความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.1-0.6 ไมโครโมลาร์

2.3.2 Reducing power (Chang and others 2006)

ปิเปตตัวอย่างสารสกัดไลโคปีนเจือจางหรือสารละลายมาตรฐานที่ต้องการทดสอบปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 M, pH 6.6) และโพแทสเซียมเฟอร์ริคไซยาไนด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร อย่างละ 2.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 50 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ลดอุณหภูมิให้ต่ำกว่า 25 °ซ ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว เติมไตรคลอโรอะซีติคแอซิดความเข้มข้น

ร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 3,000 × g เป็นเวลา 10 นาที นำเอาส่วนใส ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเฟอร์ริคคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยมวลต่อปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร และใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็นสารละลายอ้างอิง (blank) นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโทรล็อก (Trolox) ความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 1-100 ไมโครโมลาร์

2.3.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Ramandeep and Geoffrey 2005)

ปิเปตตัวอย่างสารสกัดไลโคปีนหรือสารละลายมาตรฐาน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 โดยมวลต่อปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer และบ่มที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 15 นาที และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็นสารละลายอ้างอิง (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกซึ่งมีค่าความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 5-80 ppm แสดงค่าเป็น Gallic acid equivalent (GAE)

การทดลองขั้นนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มโดยสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Windows version 17.0 ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนและทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทรีทเมนต์โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ในการทดลองขั้นนี้จะทำการทดลอง 2 ซ้ำ

2.4 การศึกษาผลของกระบวนการทำแห้งต่อปริมาณไลโคปีน

ศึกษากระบวนการทำแห้งสารสกัดที่ได้ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของกระบวนการทำแห้ง 2 วิธี คือ การทำแห้งแบบพ่นฝอย และแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง ดังนี้

2.4.1 การทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray drying) (ดัดแปลงตามวิธีของ Wang and Chen 2006, Chen and Yani 1998)

ทำการย่อยผงมะเขือเทศอบแห้งจากกากโรงงานด้วยเอนไซม์ Enz A เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นชั่งตัวอย่างกากมะเขือเทศ 100 กรัม เติมสารทำละลายอินทรีย์เอทิลอะซีเตต 400 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ทำการระเหยสุญญากาศด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 °ซ ปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร นำมาเข้าเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย โดยใช้อุณหภูมิอากาศร้อนขาเข้า 150 °ซ และควบคุมให้ได้อุณหภูมิอากาศร้อนขาออกเท่ากับ 90-100 °ซ

2.4.2 การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง (Freeze drying) (ดัดแปลงตามวิธีของ Wang and Chen 2006)

ทำการย่อยผงมะเขือเทศอบแห้งจากกากโรงงานด้วยเอนไซม์ Enz A เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นชั่งตัวอย่างกากมะเขือเทศ 100 กรัม เติมสารทำละลายอินทรีย์เอทิลอะซีเตต 400 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ทำการระเหยสุญญากาศด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 °ซ ปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร นำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -30 °ซ เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง และเข้าเครื่องทำแห้งแบบระเหิด

2.4.3 วิเคราะห์คุณลักษณะของไลโคปีนสกัดชนิดผง

วัดปริมาณค่ากิจกรรมของน้ำ (A_w) ปริมาณสารไลโคปีนโดยใช้วิธีโครมาโทกราฟี-ของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) วัดคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด การทดลองขั้นนี้วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Windows version 17.0 ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนและทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทรีทเมนต์โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ในการทดลองขั้นนี้จะทำการทดลอง 2 ซ้ำ

2.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงไลโคปีนสกัดชนิดผงและไลโคปีนสกัดชนิดของเหลวขณะเก็บรักษา

2.5.1 ไลโคปีนสกัดชนิดผง

จัดการทดลองแบบ 2x4 Factorial in Completely Randomized Design (CRD) โดยเก็บรักษาไลโคปีนสกัดชนิดผงที่เตรียมจากการทำแห้งแบบแช่แข็งระเหิดแห้ง บรรจุแบบสุญญากาศในถุงพลาสติกเคลือบด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ ที่อุณหภูมิ 5 °ซ และอุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 0, 1, 2 และ 3 เดือน วัดการเปลี่ยนแปลงของสี ปริมาณค่ากิจกรรมของน้ำ (A_w) ปริมาณสารไลโคปีนโดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) วัดคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แล้วคำนวณร้อยละคงเหลือของไลโคปีน คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Windows version 17.0 ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนและทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทรีทเมนต์โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ในการทดลองขั้นนี้จะทำการทดลอง 2 ซ้ำ

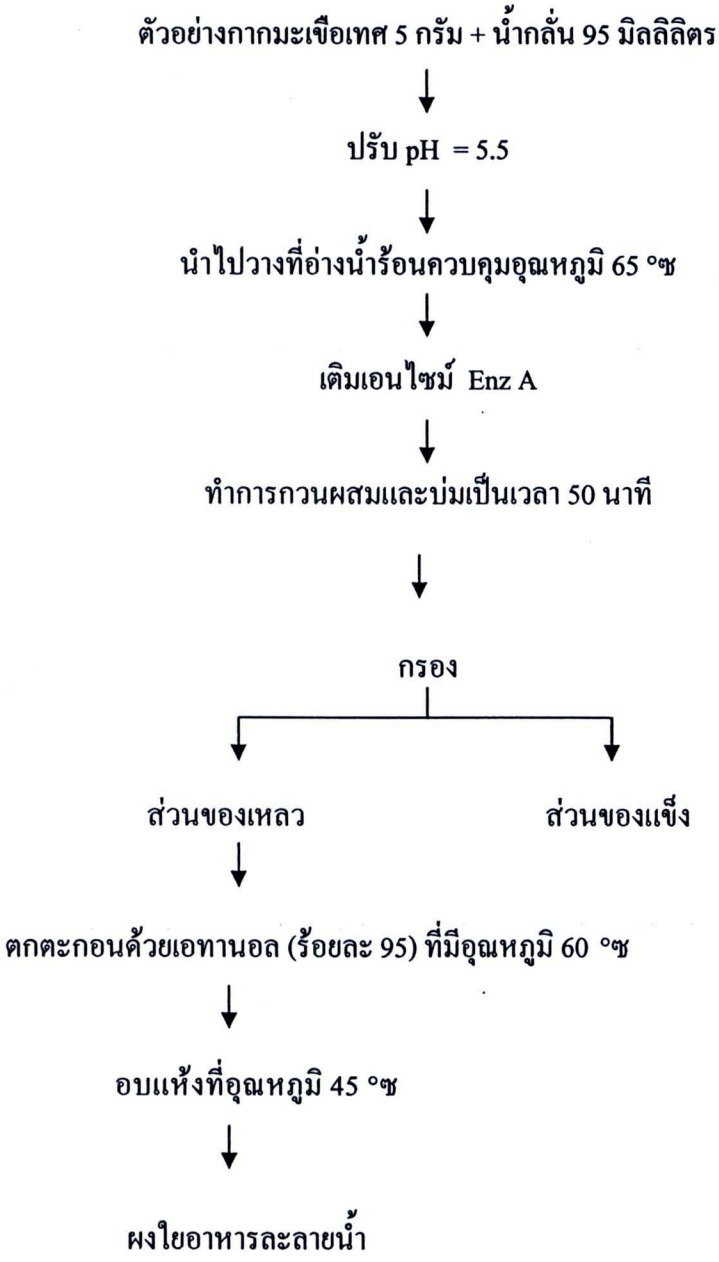
2.5.2 ไลโคปีนสกัดชนิดของเหลว

วางแผนการทดลองแบบสุ่มโดยสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) โดยเก็บรักษาไลโคปีนสกัดชนิดของเหลวในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิ -18 °ซ ระยะเวลา 0, 1, 2 และ 3 เดือน วัดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารไลโคปีนโดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) วัดคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด คำนวณร้อยละคงเหลือของไลโคปีน คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

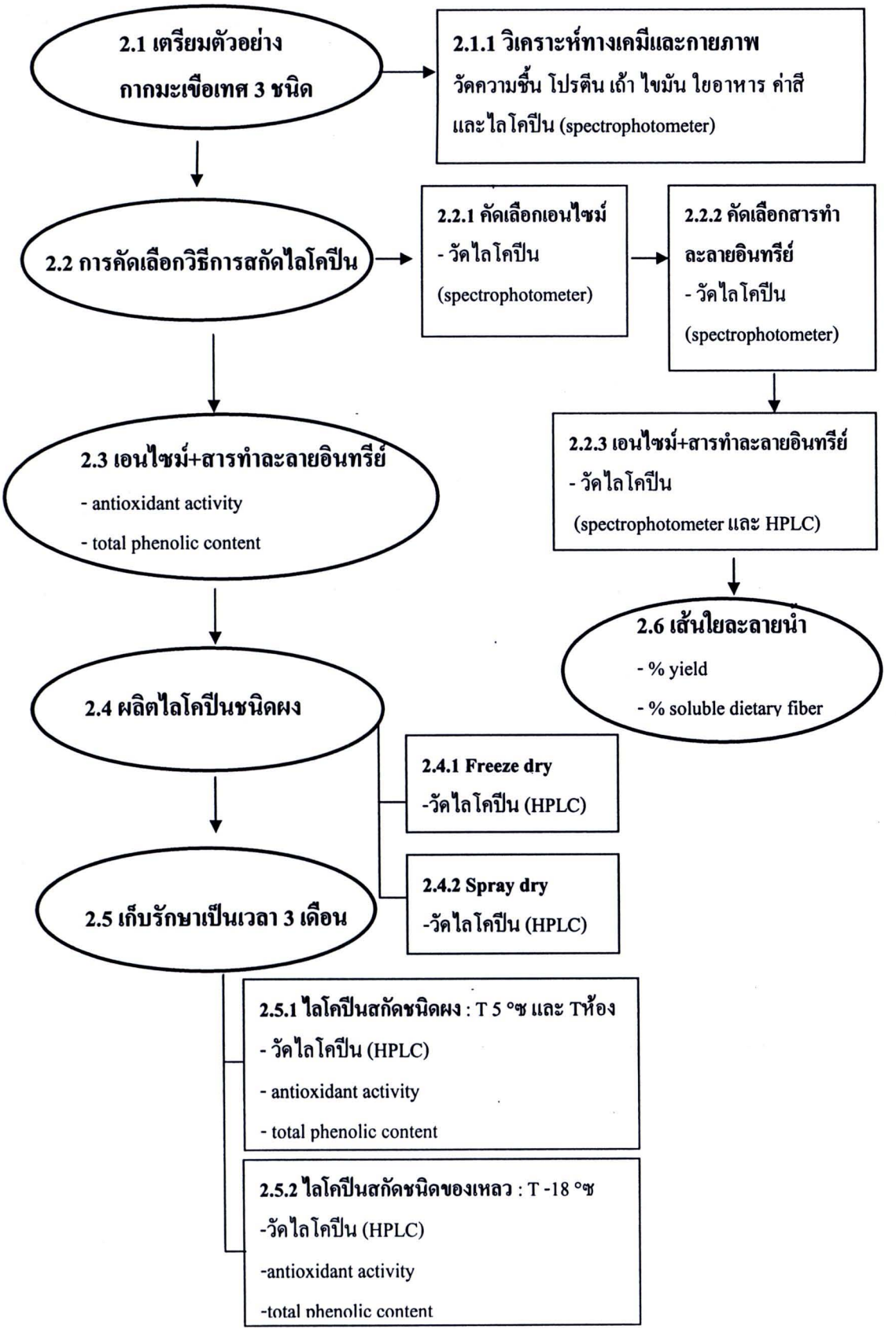
2.6 การศึกษาการสกัดใยอาหารชนิดละลายน้ำ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มโดยสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ปัจจัยที่ต้องการศึกษา คือ ตัวอย่างกากมะเขือเทศ 3 ชนิด ได้แก่ กากมะเขือเทศสดจากโรงงาน ผงมะเขือเทศอบแห้งจากกากโรงงาน และผงมะเขือเทศอบแห้งจากกากเตรียมในห้องปฏิบัติการ ทำการผลิตผงใยอาหารละลายน้ำตามภาพที่ 10 โดยย่อยกากมะเขือเทศทั้ง 3 ชนิด ด้วยเอนไซม์ Enz A เป็นเวลา 50 นาที นำส่วนของเหลวใสที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบางและกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 มาตกตะกอนด้วย เอทานอล (ร้อยละ 95) ที่มีอุณหภูมิ 60 °ซ ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Ihglett 1992) แล้วนำส่วนตะกอนที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 °ซ จนกระทั่งได้ความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 10 คำนวณหาปริมาณร้อยละผลผลิตผงใยอาหารละลายน้ำและวิเคราะห์ปริมาณใยอาหารละลายน้ำ โดยใช้ kit จาก Megazyme International, Ireland ซึ่งอ้างอิงวิธีการวิเคราะห์จาก AOAC 991.43 และคำนวณปริมาณผลผลิตของผงใยอาหารละลายน้ำ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Windows version 17.0 ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนและทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทรีทเมนต์โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ในการทดลองขั้นนี้จะทำการทดลอง 2 ซ้ำ



ภาพที่ 10 กระบวนการผลิตผงใยอาหารละลายน้ำ



ภาพที่ 11 แผนผังสรุปวิธีการทดลองโดยภาพรวม