

ชุดโครงการวิจัยย่อยที่ 1
ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดและตรึงรูปสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
และกลิ่นของใบเตยหอม *Pandanus amaryllifolius*
 โดย นางสาวปรรัตน์ เข็นกลาง และ รศ.ดร. ปราณีย์ อำนเป็รื่อง

ตอนที่ 4

การหาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดอนุพันธ์ซิงค์คลอโรฟิลล์ด้วยเอนไซม์

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาภาวะที่เหมาะสม ในการสกัดอนุพันธ์ของซิงค์คลอโรฟิลล์จากใบเตยหอมด้วยเอนไซม์ Pectinex® Ultra SP-L เพื่อใช้เป็นสารแต่งสีเขียวในอาหาร โดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) และหาภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธี Response Surface Methodology (RSM) โดยแปรความเข้มข้นเอนไซม์ที่ 1-3% (v/w) เวลาในการสกัด 90-270 นาที และทำการสกัดซ้ำ 1-3 ครั้ง ควบคุมอุณหภูมิ 35 °C พบว่า ภาวะที่เหมาะสมอยู่ที่การใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 2.3-2.5% (v/w) เวลาในการสกัด 240-260 นาที และสกัดซ้ำ 2 ครั้ง ซึ่งภาวะดังกล่าวสามารถสกัดอนุพันธ์คลอโรฟิลล์ที่มีสีเขียวที่ความเสถียร มีค่าสีเขียว (-10.36) ปริมาณคลอโรฟิลล์ (17.82 mg/g fw) และค่า antioxidant activity (612.89 μMTEAC/g fw) สูงขึ้น เป็น 3.0, 17.3 และ 1.9 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับภาวะที่ไม่เติมเอนไซม์

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ห้องสมุดงานวิจัย

วันที่... 2.6... 2555

เลขทะเบียน... 209243

เลขเรียกหนังสือ.....

2. บทนำ

โดยทั่วไปการสกัดคลอโรฟิลล์จากเนื้อเยื่อพืชจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) เช่น อะซิโตน เมทานอล เอทานอล ไดคลอโรมีเทน และ Dioxane/water (Humphrey, 2004) แต่มีผลให้สีที่สกัดได้เปลี่ยนไปจากเดิม (Smith and Pickels, 1941) และอาจพบการตกค้างของตัวทำละลายที่เป็นพิษ จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

การใช้เอนไซม์ในการสกัดรงควัตถุจากพืชเป็นทางเลือกหนึ่งวิธีที่มีความปลอดภัย อีกทั้งรงควัตถุยังคงอยู่ในภาวะตามธรรมชาติที่เชื่อมติดอยู่กับโปรตีน พันธะที่มีอยู่ช่วยในการรักษาเสถียรภาพของรงควัตถุจากการออกซิเดชัน จึงทำให้เกิดความคงตัวของสี (Fenema, 1985) การย่อยสลายผนังเซลล์ของพืช (cell wall lysis) จะใช้เอนไซม์ในกลุ่ม hydrolytic enzyme โดยเฉพาะเอนไซม์เพกตินเนสและเซลลูเลส เพราะผนังเซลล์ของพืชประกอบด้วยเพกติน (pectin) และเซลลูโลส (cellulose) เป็นส่วนใหญ่ (Choudhari and Ananthanarayan, 2007) เมื่อผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทำให้เนื้อเยื่อพืชปลดปล่อยรงควัตถุที่ถูกตรึงอยู่ออกมา

มีรายงานวิจัยที่ใช้เอนไซม์ในกลุ่มเพกตินเนสและเซลลูเลสในการสกัดรงควัตถุและสารให้กลิ่นรสในพืช เช่น การสกัดวานิลลาจาก vanilla bean (Waliszewski และคณะ, 2007) การสกัดสาร gingerol และ shogaols ที่ให้กลิ่นขิง (ginger) (Schweiggert และคณะ, 2008) การสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกองุ่น (Muñoz และคณะ, 2004) การสกัดไลโคพีนจากมะเขือเทศ (Choudhari and Ananthanarayan, 2007) การสกัดแคโรทีนอยด์ จาก sweet potato (Ciñar, 2005 a,b) และการสกัด lutein และคลอโรฟิลล์จากหน่อไม้ฝรั่ง แต่กรณีของคลอโรฟิลล์พบว่าสารสกัดมีสีน้ำตาลเมื่อเวลาการสกัดนานขึ้น (Sun และคณะ, 2007)

การวิจัยด้านเอนไซม์เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมที่ปฏิบัติกันมักจะศึกษาตัวแปรหนึ่งและควบคุมตัวแปรที่เกี่ยวข้องอื่นให้คงที่ ซึ่งจะเป็นการหาภาวะที่เหมาะสมของตัวแปรเดียว (single-variable optimization) ทำให้ไม่สามารถอธิบาย interaction effect ระหว่างตัวแปรได้ (Rai และคณะ, 2004) แต่เมื่อมีการวางแผนการทดลองแบบ Response ตัวแปรต่างๆ รวมถึง interaction จะสามารถอธิบายความสัมพันธ์ได้ อาจกล่าวได้ว่าการใช้ RSM เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการหาภาวะที่เหมาะสม โดย RSM จะใช้หลักการทางสถิติในการวิเคราะห์และสร้างสมการเพื่อหาความสัมพันธ์หลายตัวแปร (solving multivariable equation) ไปพร้อมกัน (Roy และคณะ, 2002) และใช้ contour plot เพื่อหาพื้นที่ผิวตอบสนอง (response surface) และ Locate optimal parameter จะช่วยประเมิน optimizing condition ได้อย่างชัดเจน ดังนั้น RSM จึงนิยมนำมาใช้เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมของงานวิจัยทางชีวเคมีรวมทั้งงานด้านเอนไซม์ (Rai, 2004; Sin, 2006; Sun, 2006; Schweiggerr และคณะ, 2006; Landbo และคณะ, 2007; Fan และคณะ, 2007)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดอนุพันธ์คลอโรฟิลล์เพื่อนำมาใช้เป็นสารแต่งสีเขียวในอาหาร จากการทดลองเบื้องต้น พบว่า ต้องเปลี่ยนรูปคลอโรฟิลล์ให้เป็นอนุพันธ์ซิงค์คลอโรฟิลล์ที่มีความเสถียรก่อน จากนั้นจึงใช้เอนไซม์เพื่อสกัดอนุพันธ์ที่ได้ โดยวางแผนการทดลองแบบ CCD และหาภาวะที่เหมาะสมด้วย RSM

3. วัสดุและวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

ไบเตยสด ชื้อจากตลาดในเขตกรุงเทพมหานคร และเอนไซม์เพคตินเนส (Pectinex® Ultra SP-L) จากเชื้อ *Aspergillus aculeatus* จากบริษัท Novozyme (Denmark)

3.2 การสร้างอนุพันธ์ Metallochlorophyll complex

จากการทดลองภาวะที่เหมาะสมในการสร้างอนุพันธ์ซิงค์คลอโรฟิลล์คือ ไบเตยสด 500 กรัม ปั่นกับน้ำในอัตราส่วน 1:4 โดยใช้ Blender ปรับค่า pH 5 โดยใช้กรดซิตริก ปรับความเข้มข้นของซิงค์คลอไรด์ที่ 400 ppm และแปรระดับอุณหภูมิการเกิดปฏิกิริยาที่ 110 °C เป็นเวลา 15 นาที

3.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสาร bioactive compound ในไบเตยที่ผ่านการ metallochlorophyll complex โดยวิธี Response Surface Methodology (RSM)

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าปัจจัยที่สำคัญในการสกัดด้วยเอนไซม์ ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ เวลาในการทำปฏิกิริยา และจำนวนรอบของการสกัด ซึ่งวางแผนการทดลองแบบ CCD และ RSM ภาวะที่ศึกษาแสดงในตารางที่ 1.1

3.4 การวัดค่าสี วัดด้วยเครื่อง Minolta colorimeter (Minolta Spectrophotometer CR300 และ CT310)

3.5 การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ ด้วยวิธี Vernon method (1960)

3.6 การวัดค่า antioxidant activity ด้วยวิธี Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) ตามวิธี Thaipong และคณะ (2006)

ตารางที่ 1.1 แผนการทดลองเพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสม (optimization) ในการสกัดด้วยเอนไซม์

Treatment No.	Level		
	Enzyme code, (%)	Time code, (min)	Extract code, (times)
1	-1 (1)	0 (180)	0 (2)
2	+1 (3)	0 (180)	0 (2)
3	0 (2)	-1 (90)	0 (2)
4	0 (2)	+1 (270)	0 (2)
5	0 (2)	0 (180)	-1 (1)
6	0 (2)	0 (180)	+1 (3)
7	+1 (3)	+1 (270)	+1 (3)
8	-1 (1)	+1 (270)	+1 (3)
9	+1 (3)	-1 (90)	+1 (3)
10	-1 (1)	-1 (90)	+1 (3)
11	+1 (3)	+1 (270)	-1 (1)
12	-1 (1)	+1 (270)	-1 (1)
13	+1 (3)	-1 (90)	-1 (1)
14	-1 (1)	-1 (90)	-1 (1)
15	0 (2)	0 (180)	0 (2)
16	0 (2)	0 (180)	0 (2)
17	0 (2)	0 (180)	0 (2)
18	0 (2)	0 (180)	0 (2)
19	0 (2)	0 (180)	0 (2)

ผลการทดลองที่ได้นำมาสร้างสมการ Quadratic เพื่อสร้างความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูล โดยใช้โปรแกรม SPSS version 10 และสร้างกราฟพื้นผิวสามมิติ (response surface) และ contour plot โดยใช้โปรแกรม STATISTICA version 5

พิจารณาภาวะที่เหมาะสม (optimization) จากภาวะที่ได้ bioactive compound ได้แก่สารสี คลอโรฟิลล์และสารต้านอนุมูลอิสระในภาวะที่เหมาะสมที่สุด

4. ผลการทดลอง

1) เปรียบเทียบผลการสกัดกับชุดควบคุม

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดสารสี คลอโรฟิลล์และสาร แอนติออกซิแดนซ์ กับชุดควบคุมที่ 1 (ไม่ผ่านปฏิกิริยา zinc-chlorophyll complex และไม่ใช้เอนไซม์สกัด) พบว่า ค่า Hue เท่ากับ 96.57 ที่แสดงถึงโทนสีน้ำตาล เพราะสารสกัดใบเตยมีสีน้ำตาลเข้ม ดังนั้นเมื่อผ่านกระบวนการสกัดจึงได้ค่าสีเขียว (Greenness; -2.38) คลอโรฟิลล์ (1.23 mg/gfw) และ แอนติออกซิแดนซ์ (300.85 μM TEAC) ต่ำมาก และชุดควบคุมที่ 2 (ผ่านปฏิกิริยา zinc-chlorophyll complex แต่ไม่เติมเอนไซม์) พบว่าค่า Hue เท่ากับ 105.67 คืออยู่ในโทนสีเขียว แต่ค่าสีเขียว (Greenness; -3.46) คลอโรฟิลล์ (mg/gfw) และ แอนติออกซิแดนซ์ (314.88 μM TEAC) ที่สกัดออกมาได้ต่ำ

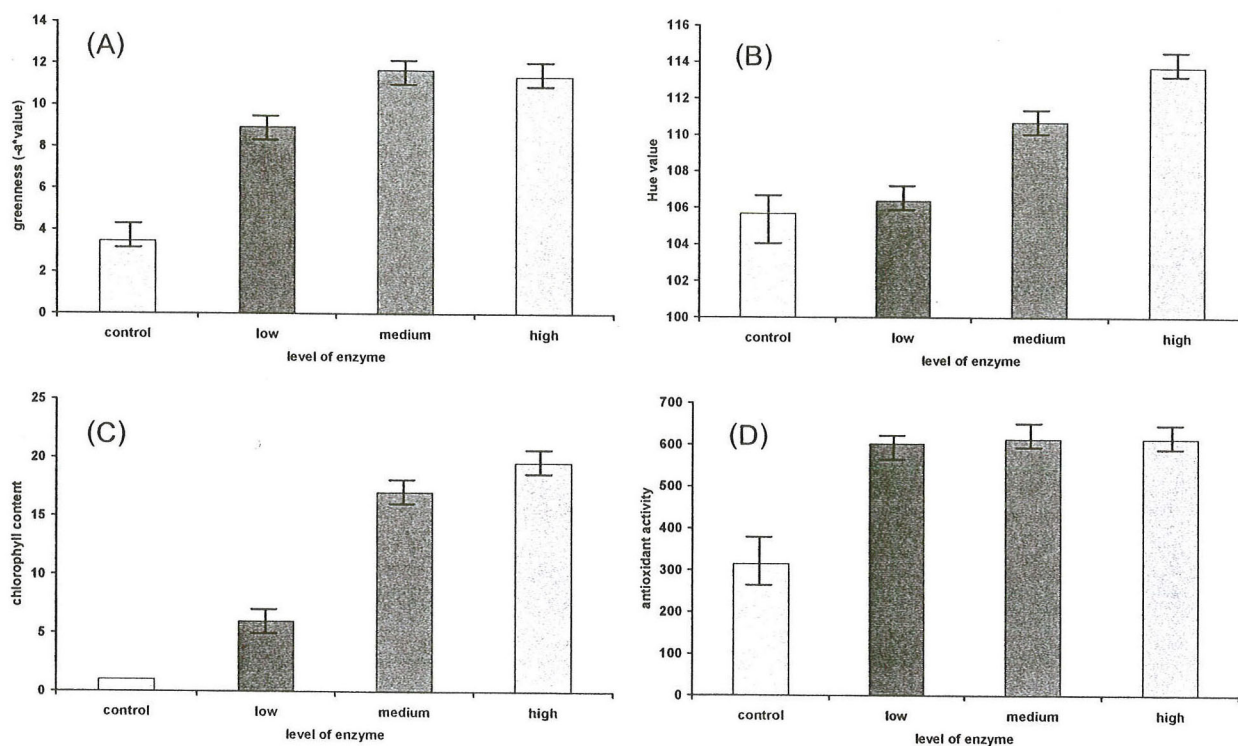
เมื่อเปรียบเทียบปริมาณคลอโรฟิลล์ระหว่างชุดควบคุมที่ 2 กับการสกัดโดยใช้เอนไซม์ที่ระดับต่ำสุด (Treatment 14; 1% Pectinex Ultra SP[®]-L เวลาทำปฏิกิริยา 90 นาที และสกัด 1 รอบ) พบว่าการใช้เอนไซม์เพิ่มปริมาณการสกัดคลอโรฟิลล์ได้ 5.84 เท่า นอกจากนี้ยังเพิ่มปริมาณ แอนติออกซิแดนซ์ ขึ้น 1.91 เท่า เมื่อเทียบกับสกัดโดยใช้เอนไซม์ที่ระดับกลาง (Treatment 15-19; 2% Pectinex Ultra SP[®]-L เวลาทำปฏิกิริยา 180 นาที และสกัด 2 รอบ) พบว่า การใช้เอนไซม์ช่วยเพิ่มปริมาณการสกัดคลอโรฟิลล์ 16.58 เท่า และเพิ่มปริมาณ แอนติออกซิแดนซ์ ขึ้น 1.95 เท่า เมื่อเทียบกับสกัดโดยใช้เอนไซม์ที่ระดับสูง (treatment 7; pectinex 3% เวลาทำปฏิกิริยา 270 นาที และสกัด 3 รอบ) พบว่า การใช้เอนไซม์เพิ่มปริมาณการสกัดคลอโรฟิลล์ได้ 19.07 เท่า นอกจากนี้ยังเพิ่มปริมาณแอนติออกซิแดนซ์ ขึ้น 1.95 เท่า สรุปได้ว่าการใช้เอนไซม์ในทุกระดับสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดปริมาณคลอโรฟิลล์และ แอนติออกซิแดนซ์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยภาวะที่เติมใช้เอนไซม์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสารสี คลอโรฟิลล์ และสารแอนติออกซิแดนซ์ จากชุดควบคุมเป็น 2.58 - 3.43 เท่า 5.82-19.00 เท่า และ 1.91-1.95 เท่า ตามลำดับ (รูปที่ 1.1)

ตารางที่ 1.2 ผลค่าสี ปริมาณคลอโรฟิลล์และสารแอนติออกซิเจนส์เมื่อผ่านการสกัดด้วยเอนไซม์

No	Level			Response variable						
	Enzyme	Time	Re-extract	L* value	a*value	b*value	Chroma	Hue	Chlorophyll	Antioxidant
	(%)	(min)	(round)						(mg/g fw)	(µM TEAC)
1	1	180	2	23.05 ± 0.02 ^m	-11.58 ± 0.08 ^{la}	33.07 ± 0.03 ^b	35.04 ± 0.03 ^b	109.23 ± 0.06 ^l	18.39 ± 0.22 ^l	607.44 ± 3.53 ^{ab}
2	3	180	2	21.66 ± 0.01 ^o	-11.56 ± 0.03 ^o	31.59 ± 0.03 ^l	33.61 ± 0.06 ^l	109.93 ± 0.12 ^p	15.11 ± 0.02	615.63 ± 1.46 ^z
3	2	90	2	31.20 ± 0.01 ^h	-11.45 ± 0.05 ^q	36.41 ± 0.02 ^p	38.28 ± 0.05 ^b	107.37 ± 0.06 ^m	14.24 ± 0.01 ^k	606.04 ± 7.83 ^{ab}
4	2	270	2	28.94 ± 0.01 ^l	-11.59 ± 0.04 ^{lm}	36.59 ± 0.03 ^a	38.43 ± 0.01 ^a	107.43 ± 0.06 ^{lm}	17.76 ± 0.03 ^c	612.82 ± 3.17 ^{ab}
5	2	180	1	34.32 ± 0.02 ^e	-11.21 ± 0.01 ⁿ	35.74 ± 0.01 ^d	37.49 ± 0.02 ^d	107.40 ± 0.00 ^{lm}	11.08 ± 0.11 ⁿ	612.59 ± 1.86 ^{ab}
6	2	180	3	18.19 ± 0.01 ⁱ	-11.65 ± 0.05 ^q	27.71 ± 0.02 ^o	30.03 ± 0.03 ⁿ	112.60 ± 0.10 ^b	18.40 ± 0.08 ^m	613.99 ± 0.70 ^a
7	3	270	3	16.68 ± 0.01 ^u	-11.36 ± 0.05 ^l	25.79 ± 0.05 ^o	28.23 ± 0.04 ^o	113.70 ± 0.10 ^a	19.58 ± 0.20 ⁿ	612.82 ± 1.72 ^{ab}
8	1	270	3	20.26 ± 0.01 ^s	-11.75 ± 0.03 ^k	30.32 ± 0.01 ^l	32.53 ± 0.09 ^l	111.07 ± 0.06 ^c	16.36 ± 0.09 ^{op}	614.69 ± 11.86 ^a
9	3	90	3	21.03 ± 0.02 ^r	-11.77 ± 0.09 ^k	31.17 ± 0.03 ^k	33.39 ± 0.06 ^k	110.53 ± 0.15 ^d	16.26 ± 0.03 ^h	615.86 ± 1.46 ^a
10	1	90	3	24.07 ± 0.01 ^k	-11.57 ± 0.05 ^h	33.81 ± 0.05 ^l	35.79 ± 0.07 ^l	108.87 ± 0.06 ^l	14.61 ± 0.12 ^l	608.61 ± 7.88 ^{ab}
11	3	270	1	31.23 ± 0.01 ^g	-11.35 ± 0.04 ^l	36.46 ± 0.02 ^p	38.24 ± 0.02 ^b	107.40 ± 0.00 ^{lm}	12.37 ± 0.23 ^m	613.05 ± 5.84 ^{ab}
12	1	270	1	32.38 ± 0.01 ^f	-11.42 ± 0.04 ^{lm}	36.12 ± 0.03 ^c	37.94 ± 0.02 ^c	107.53 ± 0.06 ^l	12.97 ± 0.11 ^l	609.78 ± 2.53 ^{ab}
13	3	90	1	42.11 ± 0.01 ^d	-10.43 ± 0.01 ⁿ	34.74 ± 0.03 ^o	36.37 ± 0.02 ^o	106.60 ± 0.00 ⁿ	9.06 ± 0.10 ^o	613.99 ± 0.70 ^a
14	1	90	1	54.24 ± 0.02 ^c	-8.95 ± 0.02 ^c	30.22 ± 0.08 ^m	31.80 ± 0.03 ^m	106.37 ± 0.06 ^o	6.00 ± 0.08 ^o	602.76 ± 1.86 ^b
15	2	180	2	23.53 ± 0.01 ^l	-11.76 ± 0.02 ^k	33.53 ± 0.04 ^q	35.51 ± 0.06 ^q	109.17 ± 0.12 ^l	17.81 ± 0.08 ^c	613.99 ± 0.78 ^a
16	2	180	2	21.58 ± 0.01 ^p	-11.68 ± 0.04 ^l	31.63 ± 0.03 ^l	33.76 ± 0.05	110.17 ± 0.06 ^l	17.03 ± 0.10 ^e	613.52 ± 1.07 ^a
17	2	180	2	22.88 ± 0.01 ⁿ	-11.87 ± 0.04 ^l	33.04 ± 0.05 ^h	35.10 ± 0.04 ⁿ	109.60 ± 0.00 ⁿ	16.61 ± 0.02 ^f	611.42 ± 5.08 ^{ab}
18	2	180	2	21.36 ± 0.01 ^q	-11.80 ± 0.03 ^k	31.51 ± 0.01 ^l	33.73 ± 0.05 ^l	110.40 ± 0.10 ^c	17.47 ± 0.12 ^d	613.75 ± 2.26 ^a
19	2	180	2	24.31 ± 0.01 ^l	-11.45 ± 0.02 ^q	33.82 ± 0.04 ^l	35.75 ± 0.01 ^l	108.67 ± 0.06 ^k	16.51 ± 0.21 ^{op}	615.16 ± 1.07 ^a
Control (no pretreatment, no enzyme)				73.24 ± 0.01 ^b	-2.38 ± 0.02 ^o	20.37 ± 0.02 ^p	20.58 ± 0.02 ^p	96.57 ± 0.06 ⁿ	1.23 ± 0.03 ^q	300.85 ± 16.16 ^d
Control (no enzyme)				85.36 ± 0.03 ^a	-3.46 ± 0.02 ^b	12.12 ± 0.04 ^q	12.79 ± 0.07 ⁿ	105.67 ± 0.12 ^p	1.03 ± 0.11 ^l	314.88 ± 9.86 ^c

Note; *Control1 ; not zinc-chlorophyll formation and not added enzyme;

**Control2; not added enzyme.



รูปที่ 1.1 การสกัดอนุพันธ์คลอโรฟิลล์จากใบเตยด้วยเอนไซม์ที่ระดับต่ำ (-1, -1, -1) กลาง (0, 0, 0) และสูง (+1, +1, +1) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเอนไซม์ ต่อค่า (A) ค่าสีเขียว (B) ค่า Hue (C) ปริมาณคลอโรฟิลล์ (D) ค่า antioxidant activity

การเพิ่มขึ้นของค่าสีและปริมาณคลอโรฟิลล์เมื่อใช้เอนไซม์ Pectinex® Ultra SPL สกัดเพราะเอนไซม์ Pectinex® Ultra SPL มี Activity ของทั้ง Pectinolytic และ Cellulolytic enzyme ได้แก่ Polygalacturonase, Pectinlyase, Pectin esterase, β -galactosidase, chitinase, และ transgalactosidase (Abdullah และคณะ, 2007) จึงสามารถย่อยสลายผนังเซลล์ (Cell wall degrading) ของคลอโรฟิลล์ที่อยู่ภายในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) ทำให้รงควัตถุหลุดออกมาได้ (Essa, 2002; Ciñar, 2005; Choudhari and Anathanarayan, 2007) และปริมาณคลอโรฟิลล์ที่เพิ่มขึ้นทำให้สมบัติการเป็นแอนติออกซิแดนท์ สูงขึ้นกว่าในชุดควบคุมเพราะอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์มีฤทธิ์ในการสลายพันธะของอนุมูลอิสระ (chain-breaking antioxidants) เพราะสามารถให้อิเลคตรอนได้ (electron donors) (Endo และคณะ, 1985 a, b) นอกจากนี้ Cahyana และคณะ (1993) และ Hoshina และคณะ (1998) รายงานว่าโครงสร้าง porphyrins ในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์สามารถยับยั้งการสร้าง lipid hydroperoxide (inhibition of lipid hydroperoxide formation) จาก ferric thiocyanate และ ferric nitrotriacetate ได้ ดังนั้นขั้นตอน Zinc-chlorophyll complex ที่เปลี่ยนรูปคลอโรฟิลล์เป็น zinc chlorophyll นอกจากช่วยให้สีของคลอโรฟิลล์คงตัวเพราะ

porphyrin มีความคงตัว แล้วส่งผลให้มีสมบัติการเป็น แอนติออกซิแดนท์ สูงกว่าคลอโรฟิลล์ที่พบอยู่ในรูปธรรมชาติด้วย (Ferruzzi และคณะ, 2002)

2) Model fitting and response surface plotting

สมการรีเกรสชัน (Regression coefficient) ของค่าสี (L^* , $-a^*$, b^* , $chroma$, H^i) ปริมาณคลอโรฟิลล์ และสารแอนติออกซิแดนท์แสดงในตารางที่ 1.3 ซึ่งพบว่าค่า coefficient of determination (R^2) สูงกว่า 0.9 ($p \leq 0.05$) ในทุกตัวแปรยกเว้น แอนติออกซิแดนท์ แสดงว่าสมการที่สร้างได้มีความสอดคล้อง (model fit) กับข้อมูลที่ได้จากการทดลอง (experiment data) (Rastogi and Rashmi, 1999)

ตารางที่ 1.3 แสดงค่า Regression coefficient, R^2 สำหรับค่าสี ปริมาณคลอโรฟิลล์

และสารแอนติออกซิแดนท์

coefficient	L^* value	a^* value	b^* value	Chroma	Hue	Chlorophyll	Antioxidant
β_0	23.223**	-11.717**	33.170**	35.202**	109.398**	16.814**	612.855**
β_1	-2.128**	-0.120**	-0.378**	-0.328*	0.510**	0.720**	2.807**
β_2	-4.317**	-0.332**	-0.106	-0.026	0.740**	1.887**	1.591**
β_3	-9.406**	-0.473**	-2.447**	-2.187**	2.147**	3.373**	1.380**
$\beta_1\beta_2$	1.305**	0.268**	-0.759**	-0.771**	0.075**	-0.262	-2.135
$\beta_1\beta_3$	0.834*	0.200**	-1.505**	-1.447**	0.525**	0.300**	-1.140**
$\beta_2\beta_3$	3.073**	0.454**	-2.061**	-2.055**	0.425**	-0.652**	-0.380**
β_1^2	-1.479**	0.149*	-1.425**	-1.414**	0.438**	-1.294**	-0.427**
β_2^2	6.238**	0.199**	2.750**	2.612**	-1.745**	-0.471**	-2.531**
β_3^2	2.421**	0.293**	-2.023**	-1.979**	0.855**	-1.731**	1.326**
R^2	0.959	0.924	0.907	0.906	0.933	0.963	0.509

Note: Subscripts; β_0 =(Constant), β_1 = enzyme concentration (x_1), β_2 = Incubation time (x_2) β_3 re-extract (x_3). ; *Significant at 0.05 level, **Significant at 0.01 level

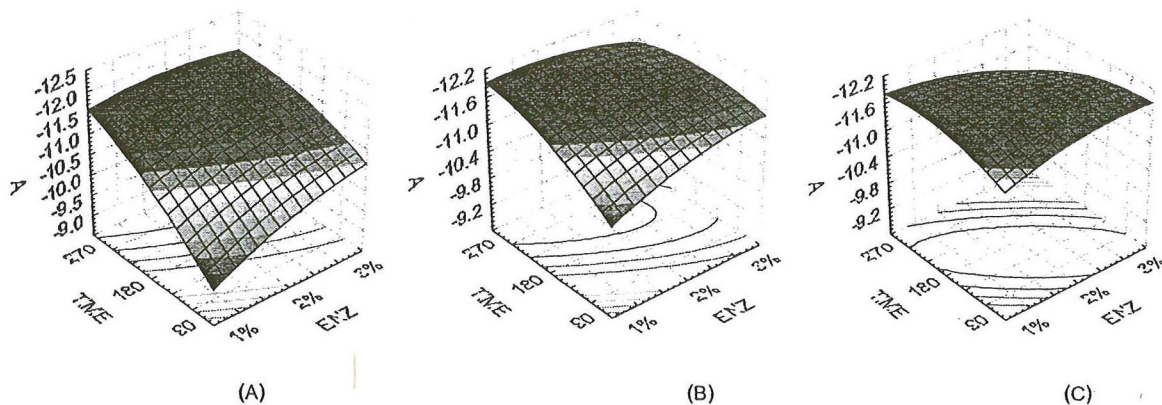
จากตารางที่ 1.3 สามารถทำนายสีเขียวและปริมาณคลอโรฟิลล์เมื่อแปรความเข้มข้นของ เอนไซม์(x_1) เวลาในการบ่ม(x_2) และจำนวนรอบการสกัด (x_3) ได้ตามสมการที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

$$\begin{aligned} \text{Equation 1: Greenness } (-a^* \text{ values}) &= -11.717 - 0.120 x_1 - 0.332 x_2 - 0.473 x_3 + 0.268 x_1 x_2 + 0.200 x_1 x_3 \\ &+ 0.454 x_2 x_3 + 0.149 x_1^2 + 0.199 x_2^2 + 0.293 x_3^2 \\ &(R^2=0.924, p \leq 0.01) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Equation 2: Chlorophylls content} &= 16.814 + 0.720 x_1 + 1.887 x_2 + 3.373 x_3 + 0.3 x_1 x_3 - 0.652 x_2 x_3 - \\ &1.294 x_1^2 - 0.471 x_2^2 - 1.731 x_3^2 \\ &(R^2=0.963, p \leq 0.01) \end{aligned}$$

จากสมการพบว่ามีความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของเอนไซม์ เวลาในการบ่มและจำนวนรอบการสกัดทั้งในทอม linear, quadratic และ interaction แสดงว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ ระยะเวลาการบ่ม และจำนวนรอบการสกัดจะทำให้สีเขียวและปริมาณคลอโรฟิลล์สูงขึ้นแบบ linear แต่เมื่อถึงจุดหนึ่งแล้วจะเริ่มลดลงตามรูปแบบ quadratic สามารถอธิบายได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ทำให้ความสามารถในการย่อย (enzyme hydrolysis) สูงขึ้น แต่การใช้ความเข้มข้นในปริมาณสูงเกินไปมีผลให้อัตราการ hydrolysis เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจนอาจเกิด end-product inhibition เกิดขึ้นได้ (Çinar, 2005) เมื่อเพิ่มเวลาและจำนวนรอบการสกัดจะทำให้สกัดคลอโรฟิลล์ออกมาได้มากขึ้นจนถึงระดับหนึ่งที่คลอโรฟิลล์ถูกสกัดออกมาหมดทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่สกัดได้ไม่เพิ่มขึ้นอีก

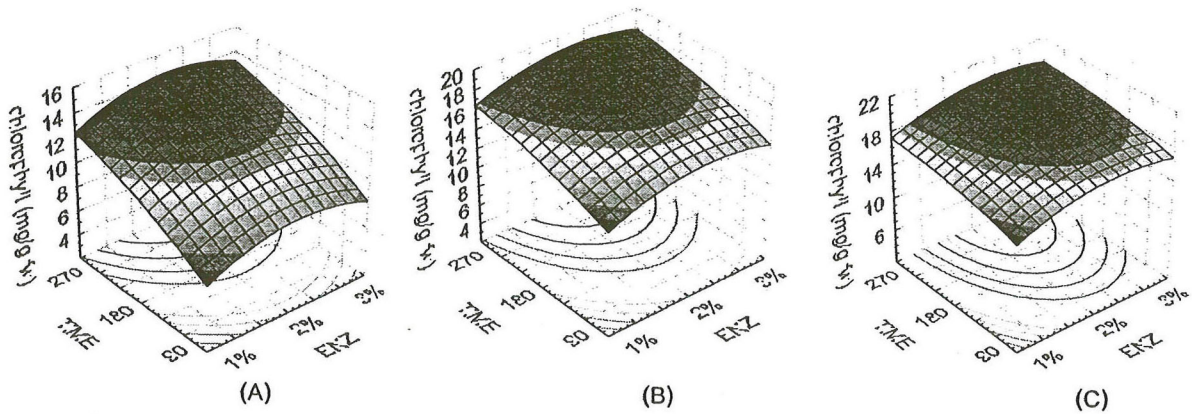
จากสมการแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นเอนไซม์ เวลาในการบ่มและจำนวนรอบการสกัดมี interaction ซึ่งกันและกันแสดงว่าเมื่อมีการเพิ่มหรือลดค่าใดค่าหนึ่งจะส่งผลกระทบต่ออีก และเมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ (coefficient) พบว่า การเพิ่มจำนวนครั้งของสกัดมีผลต่อการเพิ่มขึ้นสารสกัดสีเขียวและปริมาณคลอโรฟิลล์มากที่สุด ตามด้วยระยะเวลาในการบ่ม และความเข้มข้นของเอนไซม์ ตามลำดับ



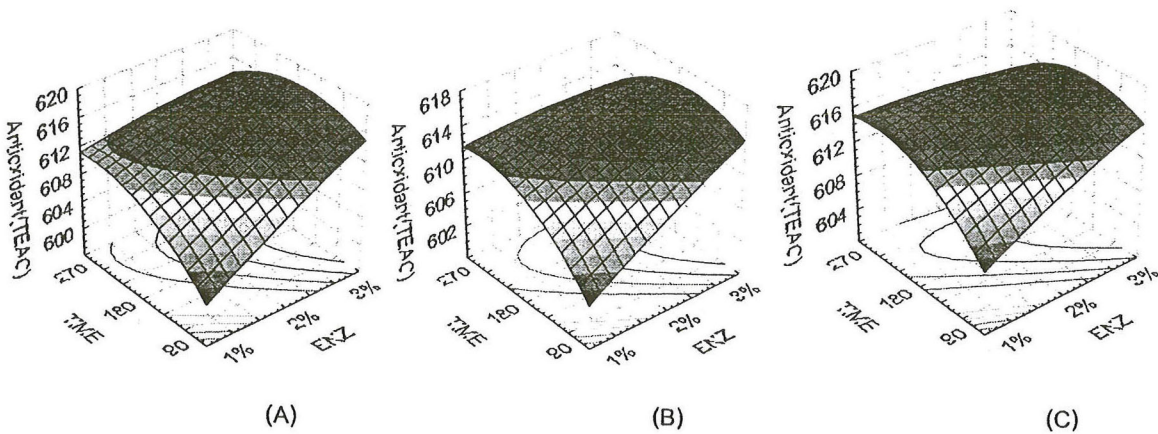
รูปที่ 1.2 Response surfaces แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการสกัดต่อค่าสีเขียวเมื่อ (A) สกัด 1 รอบ (B) สกัด 2 รอบ และ (C) สกัด 3 รอบ

รูปที่ 1.2 แสดงกราฟ response surface ของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ (1-3%) กับเวลาบ่ม (90-270 นาที) ต่อสารสีเขียวที่สกัดได้ พบว่า เมื่อสกัด 1 รอบ (A) ภาวะที่ได้สีเขียวสูงสุด คือใช้เอนไซม์เพคตินเนส 3 % เวลาทำปฏิกิริยา 270 นาที และเมื่อนำการกากใบเตยมาเติมเอนไซม์ที่ความเข้มข้นเดิมเพื่อสกัดซ้ำเป็นครั้งที่ 2 ภาวะที่ให้สีเขียวสูงสุดคือใช้เอนไซม์เพคตินเนส 2% เวลาในการสกัดที่ 180-270 นาที หรือสามารถลดปริมาณเอนไซม์เพคตินเนสโดยใช้ที่ 1% แต่เพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็น 270 นาที แต่หากสกัดซ้ำเป็น 3 ครั้ง (C) สามารถเลือกการ

ลดเวลาหรือลดความเข้มข้นของเอนไซม์ เช่น ภาวะปริมาณเอนไซม์เพคตินเอส 1% เวลาการสกัด 180-250 นาที หรือ เพคตินเอส 2% เวลาการสกัด 90-200 นาที หรือ เพคตินเอส 3% ที่เวลาการสกัด 90 นาที จะทำให้ได้สารสีเขียวสูงสุด



รูปที่ 1.3 Response surfaces แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการสกัดต่อปริมาณคลอโรฟิลล์เมื่อ (A) สกัด 1 รอบ (B) สกัด 2 รอบ และ (C) สกัด 3 รอบ

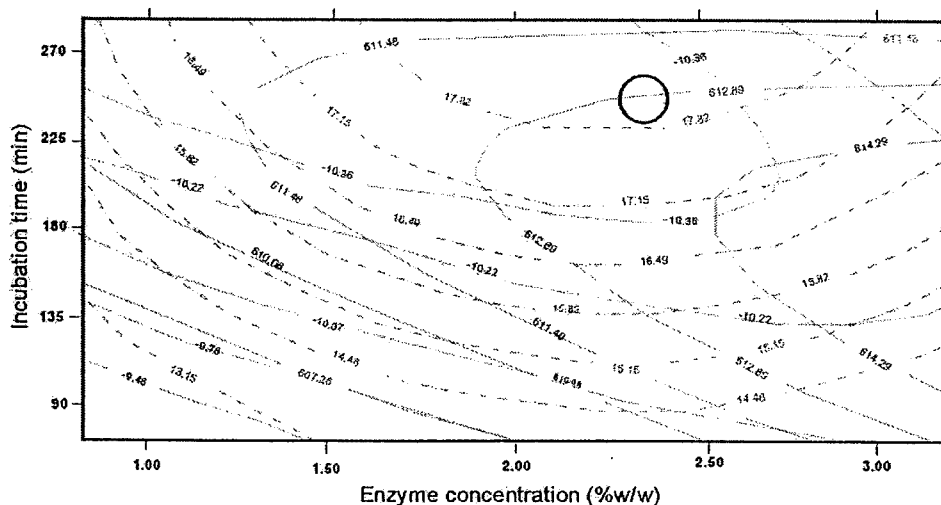


รูปที่ 1.4 Response surfaces แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการสกัดต่อค่าแอนติออกซิเดนท์ เมื่อ (A) สกัด 1 รอบ (B) สกัด 2 รอบ และ (C) สกัด 3 รอบ

จากรูปที่ 1.3 อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ (1-3%) กับเวลาบ่ม (90-270 นาที) ต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ที่สกัดได้ พบว่าเมื่อสกัดเป็นจำนวน 1, 2 และ 3 ครั้ง จะได้ปริมาณคลอโรฟิลล์ได้เป็น 14.23, 19.54 และ 20.12 mg/g fw ตามลำดับ โดยการสกัดครั้งที่ 2 ปริมาณคลอโรฟิลล์มีความแตกต่างจากครั้งที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญแต่ไม่แตกต่างกับการสกัดครั้งที่ 3 แสดงว่าสกัดคลอโรฟิลล์ออกมาได้เกือบหมดแล้วในครั้งที่สอง ดังนั้นจึงทำให้การสกัดครั้งที่สามแทบ

จะไม่เพิ่มผลการสกัด และรูปที่ 1.4 แสดง response surface ของค่า antioxidant activity พบว่ายิ่งเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการสกัดยิ่งทำให้ปริมาณ antioxidant activity สูงขึ้น

3) ภาวะที่เหมาะสม (Optimization)



รูปที่ 1.5 Superimposed contour plots สำหรับภาวะที่เหมาะสมของสีเขี้ยว ปริมาณคลอโรฟิลล์ และสารแอนตี้ออกซิเดนท์ภายใต้สภาวะการซ้ำ 2 ครั้ง

เมื่อนำ Response surface plot ของการสกัดสีเขี้ยว ปริมาณคลอโรฟิลล์และ antioxidant activity ที่จุดกลาง (central point) เพื่อสร้าง superimpose contour plot ดังรูปที่ 1.5 จะได้ภาวะที่เหมาะสมที่สุดของเอนไซม์ pectinex Ultra SPL ในการสกัดอนุพันธ์คลอโรฟิลล์ ซึ่งแสดงในตำแหน่งที่วงกลม พบว่าที่ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ 2.3-2.5% เวลาในการสกัด 240-260 นาที จำนวนรอบการสกัด 2 รอบ ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 °C ที่ภาวะที่เหมาะสมนี้ทำให้สารสกัดที่ได้มีค่าสีเขี้ยว (-10.36) ปริมาณคลอโรฟิลล์ (17.82 mg/g fw) และ antioxidant activity (612.89 μ MTEAC) เมื่อเปรียบเทียบกับภาวะที่ไม่เติมเอนไซม์ ที่สารสกัดมีค่าสีเขี้ยว (-3.46) ปริมาณคลอโรฟิลล์ (1.03 mg/g fw) และ antioxidant activity (314.88 μ MTEAC) พบว่า การใช้เอนไซม์ทำให้ค่าสีเขี้ยว ปริมาณคลอโรฟิลล์และสาร antioxidant สูงกว่าชุดที่ไม่ได้เติมเอนไซม์เป็น 3.00, 17.31 และ 1.916 เท่า ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

- Cahyana, H., Shuto, Y. and Kinoshita, Y. 1993. Antioxidative activity of porphyrin derivatives. Bioscience Biotechnology Biochemistry 57: 680-681.
- Choudhari, S. M. and Ananthanarayan, L. 2007. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissue. Food Chemistry 102(1): 77-81.
- Çinar, I. 2005 a. Stability studies on the enzyme extracted sweet potato carotenoproteins. Food Chemistry 89(3): 397-401.
- Çinar, I. 2005 b. Effects of cellulase and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids. Process Biochemistry 40: 945-949.
- Endo, Y., Usuki, R. and Kaneda, T. 1985 Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autooxidation of oils in the dark. I. Comparison of the inhibitory effects. Journal of the American Oil Chemists Society 62: 1375-1378.
- Essa, H.A. and Salama, M.F. 2002. Effect of macerate enzymes on the yield, quality, volatile compounds and rheological property of prickly pear juice. Nahrung 46:245-250.
- Fan, G., Han, Y., Gu, Z. and Chen, D. 2008. Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). Lebensm.-Wiss.U.-Technol 41(1): 155-160.
- Fenema, O.W. 1985. Food Chemistry. Marcel Dekker. New York.
- Ferruzzi, M. G., Böhm, V., Courtney, P. D. and Schwartz, S. J. 2002. Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. Journal of Food Science 67(7): 2589–2595.
- Hoshina, C., Tomita, K. and Shioi, Y. 1998. Antioxidant activity of chlorophylls: its structure–activity relationship. Photosynthesis: Mechanisms Effects 4: 3281–3284.
- Humphrey, A.M. 2004. Chlorophyll as a color and functional ingredient. Journal of Food Science 69(5): C422-C425.
- Landbo, A.K., Kaack, K., and Meyer, A.S. 2007. Statistically designed two step response surface optimization of enzymatic prepress treatment to increase juice yield and

- Muñoz, O., Sepulveda, M. and Schwartz, M. 2004. Effects of enzymatic treatment on anthocyanic pigments from grapes skin from Chilean wine. Food Chemistry 87: 487-490.
- Rai, P., Majumdar, G.C., Dasgupta, S. and De, S. 2004. Optimizing pectinase usage in pretreatment of mosambi juice for clarification by response surface methodology. Journal of Food Engineering 64: 397-403.
- Roy, D., Daoudi, L. and Azaola, A., 2002. Optimization of galacto-oligosaccharide production by *Bifidobacterium infantis* RW-8120 using response surface methodology. Journal of Industry Microbiology&Biotechnology 29: 281-285.
- Schweiggert, U., Hofmann, S., Reichel, M., Schieber, A. and Carle, R. 2008. Enzyme-assisted liquefaction of ginger rhizomes (*Zingiber officinale* Rosc.) for the production of spray-dried and paste like ginger condiments. Journal of Food Engineering 84. 28-38.
- Sin, H.N., Yosof, S., Sheikh Abdul Hamid, N. and Abdul Rahman, R. 2006. Optimization of hot water extraction for saponin juice using response surface methodology. Journal of Food Engineering 74: 352-358.
- Smith, L. and Pickel, G. 1941. The effect of detergents on the chlorophyll-protein compound of spinach as studied in the ultracentrifuge. The Journal of General Physiology 753-764.
- Sun, T. Power, J.R. and Tang, J. 2007. Effect of enzymatic macerate treatment on rutin content, antioxidant activity, yield, and physical properties of asparagus juice. Journal of Food Science 72(4): S267-270.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. and Byrne, D.H. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from grava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis. 19:669-675.
- Vernon, L.P. 1960. Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytin in plant extracts. Analytical Chemistry 32: 1144-1150.
- Waliszewski, N.K., Ovndo, S.L. and Pardio, V.T. 2007. Effect of hydration and enzymatic pretreatment of vanilla beans on the kinetics of vanillin extraction. Journal of Food Engineering 78: 1267- 1273.