ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 28:578-586(2537)

การสกัดแทนนินจากเปลือกกล้วย

Extraction of Tannin from Banana Peel

วิภา สุโรจนะเมธากุล[1] และ ชิดชม ฮิรางะ[1]

Vipa Surojanamethakul and Chidchom Hiraga

ABSTRACT

Tannin was extracted from banana peels of Kluai Hom Tong, Kluai Nam-wa and Kluai Khai at different stages of ripeness. The result indicated that varieties and ripening stages affected the amount of tannin content. Kluai Hom Tong contained more tannin than Kluai Nam-wa (stages 1 and 3) and Kluai Khai (stages 1, 3 and 6). Green banana peels provided high level of tannin content and then decreased during the ripening process. Decreasing rate of tannin in Kluai Khai was quite high compared to the other ones. Tannin extraction from banana peels were carried out to determine the optimum condition such as type of solvents, extraction time, extraction temperature and ratio of banana peels to solvent. The recovery yield of tannin from one-time extraction was 81-85% of total tannin with 2 hrs soaking in 50% ethanol at 50°C and ratio of banana peels to solvent 1:30 or 1:40 w/v. Tannin was isolated and purified from the crude extracted of Kluai Nam-wa peel by adsorption chromatography on Sephadex LH-20. The brownish purified condensed tannin showed differences in their reactivity toward chemical reagents compared to hydrolyzable tannin as tannic acid. Condensed tannin also exhibited the ability to precipitate protein and metal ion.

Key words : condensed tannin, banana tannin, tannic acid

บทคัดย่อ

ได้สกัดแทนนินจากเปลือกกล้วยพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ กล้วยหอมทอง กล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ที่มีระยะเวลาในการสุกแตกต่างกันคือ ดิบ ห่าม และสุก พบว่าพันธุ์กล้วยและระยะเวลาในการสุกมีผลต่อปริมาณแทนนิน กล้วยหอมทองจะมีปริมาณแทนนินสูงกว่ากล้วยน้ำว้า เมื่อระยะในการสุกเท่ากับ 1 แลอะ 3 และสูงกว่ากล้วยไข่ เมื่อระยะเวลาในการสุกเท่ากับ 1, 3 และ 6 กล้วยดิบมีปริมาณแทนนินสูงสุดและจะลดต่ำเมื่อกล้วยสุกมากขึ้น อัตราการลดลงของปริมาณแทนนินในเปลือกกล้วยไข่สูงกว่าในกล้วยพันธุ์อื่น การทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดแทนนินจากเปลือกกล้วยโดยศึกษาชนิดของสารละลายสกัด อุณหภูมิ เวลา และอัตราส่วนระหว่างเปลือกกล้วยต่อสารแยกสกัด พบว่าเมื่อใช้สารละลายผสมของน้ำและเอธานอล (1 : 1) โดยปริมาตร อุณหภูมิการสกัด 50 องศาเซลเซียส เวลาในการสกัด 2 ชั่วโมง และอัตราส่วนของน้ำหนักเปลือก

1 สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Institute of food Research and Product Development, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

กล้วยต่อปริมาตรสารละลาย 1 : 30 หรือ 1 : 40 แช่เพียงครั้งเดียวจะให้ผลการสกัดสูงสุดคิดเป็นร้อยละ 81-85 ของปริมาณแทนนินเริ่มต้น แทนนินจากเปลือกกล้วยนี้สามารถแยกและทำให้บริสุทธิ์ได้โดยอาศัยขบวนการดูดซับ (adsorption) บนคอลัมน์ Sephadex LH-20 เมื่อนำผงแทนนินบริสุทธิ์ที่มีสีน้ำตาลอ่อน มาทดสอบปฏิกิริยาทางเคมีเปรียบเทียบกับกรดแทนนิค สรุปได้ว่าแทนนินจากเปลือกกล้วยเป็นชนิด Condensed tannin ซึ่งมีคุณสมบัติในการตกตะกอนโปรตีนและจับกับอิออนของโลหะได้ดี

คำนำ

แทนนินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนพวกฟีนอลิก แบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ ไฮโดรไลซ์เซเบิลแทนนิน (hydrolyzable tannins) ซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็ก สลายตัวและละลายได้ในกรดหรือน้ำย่อย กับคอนเดนซ์แทนนิน (condensed tannins) ซึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่ จัดอยู่ในประเภทโพลีเมอริกโพลีฟีนอล (Polymeric Polyphenols) มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 1,000 ขึ้นไปไม่สามารถไฮโดรไลซ์ด้วยกรดหรือด่างได้ แต่ละลายได้ดีในน้ำร้อน สารละลายของแอลกอฮอล์และสารละลายของอะซีโตน เมื่อต้มกับกรดจะรวมตัวกันเป็นโพลิเมอร์ เกิดเป็นสารประกอบที่ไม่ละลาย มีรูปร่างไม่แน่นอนและมีสีแดงเรียกว่า tannin-red หรือ phlobaphene แทนนินทั้งสองประเภทจะกระจายอยู่ตามส่วนต่างๆ ของผักและผลไม้ทั้งเปลือก เมล็ดและใบ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง การทำหมึกพิมพ์ การย้อมสีผ้าและด้าย การทำกาว เครื่องสำอางค์และยารักษาโรค นอกจากนี้ยังนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอย่างกว้างขวาง โดยใช้เป็นสารเสริมรสชาติของอาหาร เช่นทำให้ไวน์แดงมีบอดี้ (body) และมีกลิ่นรสเฉพาะตัวของผลิตภัณฑ์ (Meyer, 1961) ปัจจุบันได้มีการนำแทนนินมาเคลือบบนแท่งอะมิโนเฮกซาเซลลูโลส (aminohexacellulose) เพื่อใช้ในการตกตะกอนโปรตีนและจับกับอิออนของโลหะในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ ไวน์ และสาเก ซึ่งมีประสิทธิภาพค่อนข้างดีและไม่มีผลต่อกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ (Chibata *et. al.*, 1986) แทนนินยังใช้เป็นสารเคลือบอาหารเช่นเนื้อสัตว์ โดยผสมกับเจลาตินหรือโปรตีนจากนม ทำให้เก็บรักษาอาหารได้นานขึ้น (Payne, 1980)

แทนนินที่สกัดจากธรรมชาติส่วนใหญ่จะสกัดจากส่วนของเปลือกไม้ เช่น เปลือกของไม้สกุลก่อ ไม้โอ๊ค ไม้ยูคาลิปตัส และไม้โกงกาง ไม้เหล่านี้ปัจจุบันมีปริมาณลดลงอย่างมาก ในขณะที่ความต้องการของปริมาณแทนนินในอุตสาหกรรมต่างๆ สูงขึ้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องหาแหล่งวัตถุดิบอื่นที่มีศักยภาพและปริมาณแทนนินเพียงพอมาทดแทน วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเช่น เปลือกกล้วย ซึ่งมีปริมาณมากและมีแทนนินเป็นส่วนประกอบ น่าที่จะนำมาศึกษา Forsyth (1981) พบว่าแทนนินในกล้วยจะเกิดในเซลล์เฉพาะซึ่งแตกต่างจากพาเรนไคมา (Parenchyma) กระจายอยู่รอบๆ ระหว่างเนื้อและเปลือกกล้วยด้านใน จัดเป็นพวก highly polymeric B Type prodelphinidin เมื่อทำปฏิกริยากับกรด Prodelphinidin นี้สามารถสกัดได้โดยใช้สารละลายเอเควียส หรือแอลกอฮอล์และเนื่องจากการศึกษาวิจัยในด้านการสกัดแทนนินที่ผ่านมา พบว่าส่วนมากเป็นการสกัดและแยกแทนนินให้บริสุทธิ์จากผักผลไม้ชนิดต่างๆ (Mutsuo and Itoo, 1981; Hagerman and Butler, 1980; Strumeyer and Malin, 1975) โดยส่วนของแทนนินในเปลือกกล้วยยังไม่มีการศึกษามากนัก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาหาปริมาณแทนนินจากเปลือกกล้วยพันธุ์ต่างๆ ที่ระยะเวลาในการสุกต่างกันพร้อมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด การแยกและการทำแทนนินให้บริสุทธิ์ ตลอดจนศึกษาคุณสมบัติบางประการของแทนนินที่ได้ สามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาเพื่อการผลิตและการใช้แทนนินสำหรับอุตสาหกรรมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การวิเคราะห์หาปริมาณแทนนินจากเปลือกกล้วยพันธุ์ต่างๆ

กล้วยที่ใช้ในการศึกษานี้ได้สุ่มซื้อผลกล้วยสดมาจากตลาดสี่มุมเมืองและตลาดจังหวัดนนทบุรีได้แก่ กล้วยน้ำว้า กล้วยไข่ และกล้วยหอมทอง ซึ่งมีระยะเวลาในการสุกแตกต่างกันคือ ดิบ ห่ามและสุก โดยกล้วยดิบมีความสุกระยะที่ 1 กล้วยห่ามมีความสุกระยะที่ 3 และกล้วยสุก มีความสุกระยะที่ 6 (เบญจมาศ, 2534) นำส่วนของเปลือกกล้วยแต่ละชนิดมาบดให้ละเอียด สกัดแทนนินในรูปสารประกอบเชิงซ้อนฟีนอลิก และวิเคราะห์โดยวิธี Folin–Denies Reagents (AOAC, 1990) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Hitachi Model 100–60 Japan) คำนวณหาปริมาณแทนนินจากกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแทนนิค (tannic acid : $C_{76}H_{52}O_{46}$)

2. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแทนนิน

นำเปลือกกล้วยน้ำว้าดิบมาอบแห้งในตู้อบที่มีลมพัดหมุนเวียน อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง บดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบด (Blender) แล้วร่อนผ่านตะแกรง (Sieve) ขนาด 30 เมช วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน เถ้า เส้นใย ไขมัน (AOAC, 1990) และปริมาณแทนนินทั้งหมด เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแทนนินโดยวิธีการสกัดแบบแช่ครั้งเดียว และมีตัวแปรที่ทำการศึกษาดังนี้

ชนิดของสารละลายที่ใช้สกัด	น้ำ เอธานอล : น้ำ (1:1), เอธานอล
อัตราส่วนระหว่างเปลือกกล้วย : สารละลายสกัด (น้ำหนัก/ปริมาตร)	1:20, 1:30, 1:40
เวลาในการสกัด (ชั่วโมง)	2, 4, 6
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	30, 50

ปรับสภาวะการทดลองตามที่กำหนดข้างต้น โดยถือระดับอุณหภูมิหนึ่งๆ เป็นค่าคงตัวจากนั้นเปลี่ยนค่าตัวแปรเช่น ชนิดของสารละลาย อัตราส่วนระหว่างเปลือกกล้วยต่อสารละลายสกัด และเวลาในการสกัด นำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณแทนนินคำนวณเป็นร้อยละของการสกัดจากปริมาณแทนนินทั้งหมด เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแทนนินที่สกัดได้กับสภาวะต่างๆ ที่ทำการทดลอง

3. การแยกและการทำแทนนินให้บริสุทธิ์

เลือกสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแทนนินจากข้อ 2 มาสกัดเปลือกกล้วยน้ำว้าอบแห้งโดยใช้ตัวอย่างครั้งละประมาณ 30 กรัม ด้วยสารละลายผสมของเอธานอลและน้ำ (1 : 1) โดยปริมาตร 3 ครั้ง กรองแยกกากออกด้วยผ้าไนลอนนำสารละลายที่สกัดได้เข้าเครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge) ความเร็ว 3500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที แยกตะกอนทิ้งไป นำส่วนใสมาระเหยจนเกือบแห้งโดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศหรือ Rotaevaporator (Biichi EL 130, Switzerland) อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วจึงละลายด้วยสารละลาย Acetate Buffer 1 mM pH 4.0 ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต (Ethyl Acetate) อีก 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิห้องซึ่งแต่ละครั้งจะใช้เอธิลอะซีเตตเท่ากับปริมาตรของสารละลายแทนนินในบัฟเฟอร์ ทิ้งส่วน เอธิลอะซีเตตออกไปส่วนที่เหลือนำมาระเหยภายใต้สุญญากาศจนแห้ง

Bathwish Gel Filtration

นำสารที่ได้มาละลายในสารละลายผสมเอธานอล : น้ำ 80 : 20 ปริมาตรน้อยที่สุด นำไปเทลงใน Sephadex LH–20 ซึ่งได้ทำให้อิ่มตัวด้วยเอธานอล คนให้เข้ากัน ล้างเจล (Gel) ด้วยเอธานอลบริสุทธิ์จนได้ค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ต่ำสุดและคงที่ หลังจากนั้นจึงล้างเจลด้วยสารละลายผสมของน้ำและอะซีโตน 1 : 1 โดยปริมาตร จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร เป็นค่าต่ำสุดและคงที่ นำส่วน (Fraction) ที่ได้จากการล้างเจลด้วยสารละลายผสมของน้ำและอะซีโตนมารวมกัน ระเหยอะซีโตนออก

ภายใต้สุญญากาศ ส่วนที่เหลือนำมาสกัดด้วยฟีนอลเหลว (liquid phenol) แล้วสกัดซ้ำด้วยเอธิลอีเธอร์ (Ethy ether) เพื่อล้างฟีนอลส่วนเกินออกไปแยกส่วนเอเควียสมาระเหยจนแห้งด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ

ละลายสารประกอบแทนนินที่ได้จากการทำ Bathwish Gel Filtration ด้วยเอธานอลบริสุทธิ์ใน ปริมาตรที่น้อยที่สุด แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ของ Sephadex LH-20 เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ยาว 25 เซนติเมตร ซึ่งได้ทำให้เกิดสภาวะสมดุลย์ (equilibrate) ด้วยเอธานอลบริสุทธิ์ก่อนนำมาใช้งาน ผ่านคอลัมน์ ด้วยสารละลายเอธานอลบริสุทธิ์จนได้ค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรต่ำสุดและคงที่ แล้วจึงเปลี่ยนเป็นสารละลายผสมของน้ำและอะซีโตน 1 : 1 โดยปริมาตร จนสามารถอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรต่ำสุดและคงที่ นำแทนนินในสารละลายผสมของน้ำและอะซีโตนมารวมกันทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ ละลายน้ำแล้วทำให้แห้งอีกครั้งโดยใช้เครื่อง Freeze Dry จะได้ผลิตภัณฑ์แทนนินบริสุทธิ์

4. การตรวจสอบคุณสมบัติบางประการของแทนนินที่ได้จากข้อ 3 (Strumeyer and Malin ; 1975)

4.1 ตรวจสอบคุณสมบัติการละลายในน้ำและสารละลายอินทรีย์บางชนิด

4.2 ตรวจสอบคุณสมบัติทางด้านเคมีเมื่อทำปฏิกิริยากับ

สารละลายเฟอร์ริคคลอไรด์ (Ferric chloride)

สารละลายเลดอะซีเตต (Lead Acetate)

สารละลายเจลาติน (Gelatin)

สารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ในกรดไฮโดรคลอริค (Formaldehyde - HCl)

สารละลายวานิลินในกรดไฮโดรคลอริค (Vanillin HCl)

กรดซัลฟุริคเข้มข้น (Conc. H_2SO_4)

ผลและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาหาปริมาณแทนนินในเปลือกของผลกล้วยสดได้แสดงใน Table 1 พบว่าระยะเวลาในการสุกของกล้วยระดับเดียวกัน เปลือกกล้วยหอมทองจะมีปริมาณแทนนินสูงกว่าเปลือกกล้วยน้ำว้า และเปลือกกล้วยไข่ตามลำดับ ยกเว้นเมื่อกล้วยสุกเต็มที่ปริมาณแทนนินในกล้วยหอมทองจะน้อยกว่ากล้วยน้ำว้า เปลือกกล้วยหอมทองดิบจะมีปริมาณแทนนินสูงสุด และเปลือกกล้วยไข่จะมีปริมาณแทนนินต่ำที่สุด เมื่อระยะเวลาในการสุกเปลี่ยนจากระยะที่ 1 เป็นระยะที่ 3 และระยะที่ 6 ปริมาณแทนนินจะลดลงโดยอัตราการลดลงของปริมาณแทนนินในเปลือกกล้วยไข่มีแนวโน้มสูงกว่าเปลือกกล้วยชนิดอื่น Goldstein and Swain (1963) พบว่าสารประกอบฟีนอลิกในกล้วย (*Musa sapientum* L.) พันธุ์ Gros Michel ซึ่งปลูกในทวีปอัฟริกาใต้ มีปริมาณแทนนินในเปลือกกล้วยดิบ 9.3 มิลลิกรัมต่อกรัม นน. แห้ง และ 3.2 มิลลิกรัมต่อกรัม นน.แห้ง ในเปลือกกล้วยสุก เมื่อทำการสกัดด้วยเมธานอลและวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน

Table 1. Tannin content in various banana peel varieties with different stage of ripeness.

Stage of Ripeness	Tannin content (mg/g dry wt.)		
	Kluai Hom Tong	Kluai Namwa	Kluai Khai
1	58.0	49.0	35.6
3	54.0	40.0	13.0
6	26.4	37.9	11.3

โดยวิธี Folin Denies Matsuo และ Itoo (1981) ได้สกัดแทนนินจากผลกล้วยอ่อนพบว่ามีปริมาณแทนนินสูงถึง 0.6 กรัมใน 100 กรัมน้ำหนักสด ในงานวิจัยนี้พบปริมาณแทนนินค่อนข้างสูง ซึ่งค่าที่แตกต่างกันนั้นอาจเนื่องมาจากพันธุ์ ฤดูกาล แหล่งปลูก วิธีสกัดแทนนิน วิธีวิเคราะห์ และระดับความสุกของกล้วย กล่าวคือ ปริมาณแทนนินจะสูงสุดเมื่อกล้วยดิบและปริมาณจะลดลงเมื่อกล้วยสุกมากขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากแทนนินรวมตัวกับโปรตีนหรือคาร์โบไฮ-เดรท หรือโดยการรวมตัวของแทนนินเอง เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งในกล้วยจะมีลักษณะเกาะกันเป็นก้อนเหมือนเค้ก (caked) (Forsyth, 1981) ปกติแทนนินในผลไม้ดิบจะมีลักษณะเป็นโมเลกุลที่สามารถละลายและเคลื่อนตัวไปมาได้ในช่องว่างระหว่างเซลล์ ในขณะที่ผลไม้แก่ขึ้นแทนนินจะมีลักษณะคล้ายของแข็ง (Solidified material) และการที่สกัดแทนนินได้น้อยลงในกล้วยสุกเนื่องจากโมเลกุลของแทนนินไป absorp ที่ผนังเซลล์เกิดเป็นโพลิเมอร์ขนาดใหญ่ ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมี (Chemical reactivity) ในโมเลกุลของแทนนิน (Goldstein and Swain, 1963)

2. การศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแทนนินได้เลือกเปลือกกล้วยน้ำว้า เนื่องจากหาง่ายมีปริมาณมาก และใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมกล้วยแปรรูปมากว่าพันธุ์อื่น เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ในเปลือกกล้วยอบแห้ง พบว่ามีปริมาณแทนนิน 3.62% ปริมาณเส้นใย 16.20% เถ้า 11.63% โปรตีน 11.94% และไขมันน้อยมาก สำหรับผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแทนนิน แสดงใน Table 2

การวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าตัวแปรที่ทำการศึกษาได้แก่ ชนิดของสารละลายสกัด (S) อุณหภูมิการสกัด ระยะเวลาในการสกัด (t) และอัตราส่วนของเปลือกกล้วย : สารละลายสกัด (r) มีผลต่อปริมาณแทนนินที่สกัดได้ โดยชนิดของสารละลายสกัดและอุณหภูมิมีผลต่ออัตราการสกัดค่อนข้างสูง กล่าวคือเมื่อใช้สารละลายผสมเอธานอล : น้ำ (1 : 1) โดยปริมาตร จะให้ร้อยละของการสกัดแทนนินสูงที่สุด ซึ่งดีกว่าน้ำและเอธานอลบริสุทธิ์ตามลำดับ เอธานอลให้ผลการสกัดต่ำสุดทั้งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 50 องศาเซลเซียสเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นทำให้ประสิทธิภาพการสกัดเพิ่มขึ้นด้วย ระยะเวลาในการสกัดนานขึ้นไม่ทำให้การสกัดแทนนินจากเปลือกกล้วยสูงขึ้นแต่มีแนวโน้มลดต่ำลง ในขณะที่เอธานอลให้ค่าใกล้เคียงกันในทุกช่วงเวลาของการสกัด ถ้าปริมาณสารละลายสกัดมากขึ้นจะทำให้แทนนินถูกสกัดออกมาได้มากขึ้นเช่นกัน ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแทนนินจากเปลือกกล้วยน้ำว้าอบแห้ง ขนาดอนุภาค 30 เมช คือการสกัดด้วยสารละลายผสมของน้ำและเอธานอล (1 : 1) อัตราส่วนของน้ำหนักเปลือกกล้วย : ปริมาตรสารละลายสกัด 1 : 30 หรือ 1 : 40 แช่เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะให้ร้อยละการสกัดสูงถึง 81-85 ของปริมาณแทนนินเริ่มต้น

3. การแยกและการทำแทนนินให้บริสุทธิ์

ในการสกัดสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกจากเปลือกกล้วยน้ำว้าอบแห้งได้เลือกสภาวะจากข้อ 2 ซึ่งให้ผลการสกัดสูงที่สุด การสกัดซ้ำด้วย เอธิลอะซีเตต ก็เพื่อกำจัดสารปนเปื้อนพวกโพลีฟีนอลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ สารเริ่มต้นของพืนอลิก รวมทั้งเม็ดสีต่างๆ (Hagerman and Butler, 1980) โปรตีนที่ละลายได้ในแอลกอฮอล์จะถูกกำจัดออกในขั้นตอน Gel Filtration เมื่อล้างด้วยเอธานอลบริสุทธิ์จะได้สารละลายสีเหลืองซึ่งจะจางลงเรื่อยๆ และเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร คงที่และต่ำสุด ส่วนนี้ทั้งหมดจะถูกทิ้งไป สำหรับการล้างเจลด้วยสารละลายผสมของน้ำและอะซีโตน จะได้สารละลายสีน้ำตาลปนเหลืองโดยในช่วงแรกจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ค่อนข้างสูงและลดลงเรื่อยๆ จนได้ค่าต่ำสุดและคงที่ เมื่อนำมารวมกันแล้วสกัดซ้ำโดยใช้ฟีนอล ซึ่งมีคุณสมบัติในการรวมตัวกับโปรตีนได้ดี ทำให้สามารถแยกโปรตีนออกจากสารอื่นที่มีคุณสมบัติในการละลายน้ำโดยไม่มีผลกระทบต่อสาร

Table 2. Percent of tannin extracted from dry Kluai Namwa Peel with various solvent, time, ratio and temperature.

Types and ratio of solvents	Extraction time (hrs)	Temperature	
		30°C	50°C
S1r1	2	*25.65^{a,n}	42.51^{a,g}
	4	22.99^{a,o}	34.36^{b,h}
	6	12.14^{b,p}	37.08^{b,h}
S1r2	2	37.92^{a,k}	52.10^{a,e}
	4	33.29^{b,m}	47.21^{b,f}
	6	25.00^{c,n}	51.13^{a,e}
S1r3	2	45.78^{a,i}	54.07^{a,e}
	4	40.50^{b,j}	53.06^{a,e}
	6	35.33^{c,l}	54.71^{a,e}
S2r1	2	74.18^{a,c}	66.64^{b,c}
	4	67.48^{b,f}	72.43^{a,b}
	6	57.73^{c,h}	69.39^{b,bc}
S2r2	2	79.40^{a,c}	82.67^{a,a}
	4	76.45^{b,d}	81.87^{a,a}
	6	64.66^{c,g}	60.54^{b,d}
S2r3	2	82.40^{a,a}	84.87^{a,a}
	4	80.54^{b,b}	85.03^{a,a}
	6	68.61^{c,f}	84.89^{a,a}
S3r1	2	6.11^{a,r}	13.25^{a,i}
	4	8.64^{a,q}	12.02^{a,i}
	6	8.26^{a,q}	12.31^{a,i}
S3r2	2	7.15^{a,qr}	13.02^{a,i}
	4	9.17^{a,q}	13.75^{a,i}
	6	8.61^{a,q}	12.61^{a,i}
S3r3	2	7.46^{a,qr}	12.58^{a,i}
	4	8.59^{a,q}	13.35^{a,i}
	6	8.83^{a,q}	14.61^{a,i}

- Means the same column under each s*r followed by the same letter are not significantly different (p>0.01) by DMRT.
- Means the same column follow by the same letter after comma (,) are not significantly different (p>0.05) by DMRT.

* Average of triplication

S : Solvent type where water (S1), alcohol : water (S2), and alcohol (S3)

r : ratio of banana peel to solvent (w/v) where 1 : 20(r1),1 : 30(r2) and 1 : 40(r3).

Table 3. Properties of tannin from banana peel compared to tannic acid (hydrolyzable tannin).

Property or test	Result	
	Tannin from banana peel	Tannic acid
solubility	soluble in aqueous alcohol, aqueous acetone	soluble in water, acetone, alchol
	insoluble in acetone, ether	insoluble in ether
color of aqueous solution	yellow in acid solution	pale yellow in acid solution
at 25°C	red in basic solution	red in basic solution
	color change was reversible	color change was reversible
ferric chloride	greenish black color and precipitate	dark blue
basic lead acetate	precipitate	precipitate
gelatin	precipitate	precipitate
formalin-HCL	red color and precipitate	no precipitate
vanillin-HCL	crimson color and precipitate	no precipitate
conc. H_2SO_4	red color	yellowish brown

ประกอบพวก Flavonols ส่วนของฟีนอลที่มากเกินไปจะถูกกำจัดออกด้วย เอธิลอีเธอร์ ในการทดลองสกัดเพียง 2 ครั้งเท่านั้น เพราะเริ่มเกิดอิมัลชั่นทำให้การแยกระหว่างชั้นของสารละลายไม่ชัดเจน ส่วนของ อีเธอร์จะถูกทิ้งไป ส่วนของเอเควียสนำมาระเหยภายใต้สุญญากาศจนแห้ง ละลายด้วยเอธานอลปริมาตรน้อยที่สุดเพื่อนำไปผ่านคอลัมน์ Sephadex LH-20 ซึ่งมีคุณสมบัติในการดูดซับแทนนินได้ดีในเจลของแอลกอฮอล์ (Asquith *et al.*, 1983) ดังนั้นส่วนของ Non-tannins จะถูกกำจัดออกจากคอลัมน์ได้โดยอาศัยขบวนการดูดซับ (adsorption mechanism) เพื่อให้การแยกเป็นไปด้วยดีไม่ควรใส่สารละลายตัวอย่างบนคอลัมน์มากเกินไป และ flow rate ที่ใช้ไม่ควรเกิน 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าแทนนินจะถูกดูดซับที่ส่วนบนของคอลัมน์เป็นแถบสีน้ำตาลขณะที่ผ่านคอลัมน์ด้วยเอธานอลบริสุทธิ์ และแถบดังกล่าวจะเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ได้อย่างเร็วเมื่อล้างด้วยสารละลายผสมของน้ำและอะซีโตน สารละลายแทนนินที่แยกได้เมื่อมาผ่านเข้าเครื่อง Freeze-Dry จะได้ผลิตภัณฑ์แทนนินเป็นผงสีน้ำตาลอ่อน ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 28 ของปริมาณสารฟีนอลิกเริ่มต้น

4. ผลการทดสอบคุณสมบัติบางประการของแทนนินบริสุทธิ์ที่แยกได้ แสดงใน Table 3.

จากการทดสอบ แทนนินที่แยกได้จากเปลือกกล้วยสามารถละลายได้ดีในสารละลายแบบมีขั้ว (polar solvent) ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลของแทนนินมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) จึงสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ดีกับสารละลายที่มีขั้ว นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการตกตะกอนโปรตีน และจับกับอิออนของโลหะได้ดีอีกด้วย จากคุณสมบัติต่างๆ ที่ทดสอบเปรียบเทียบกับกรดแทนนิคซึ่งเป็นแทนนินชนิด hydrolyzable tannin พบว่าแทนนินที่แยกได้จากเปลือกกล้วยน้ำว้าเป็นกลุ่มของ condensed tannin ผลที่ได้สอดคล้องกับ Forsyth

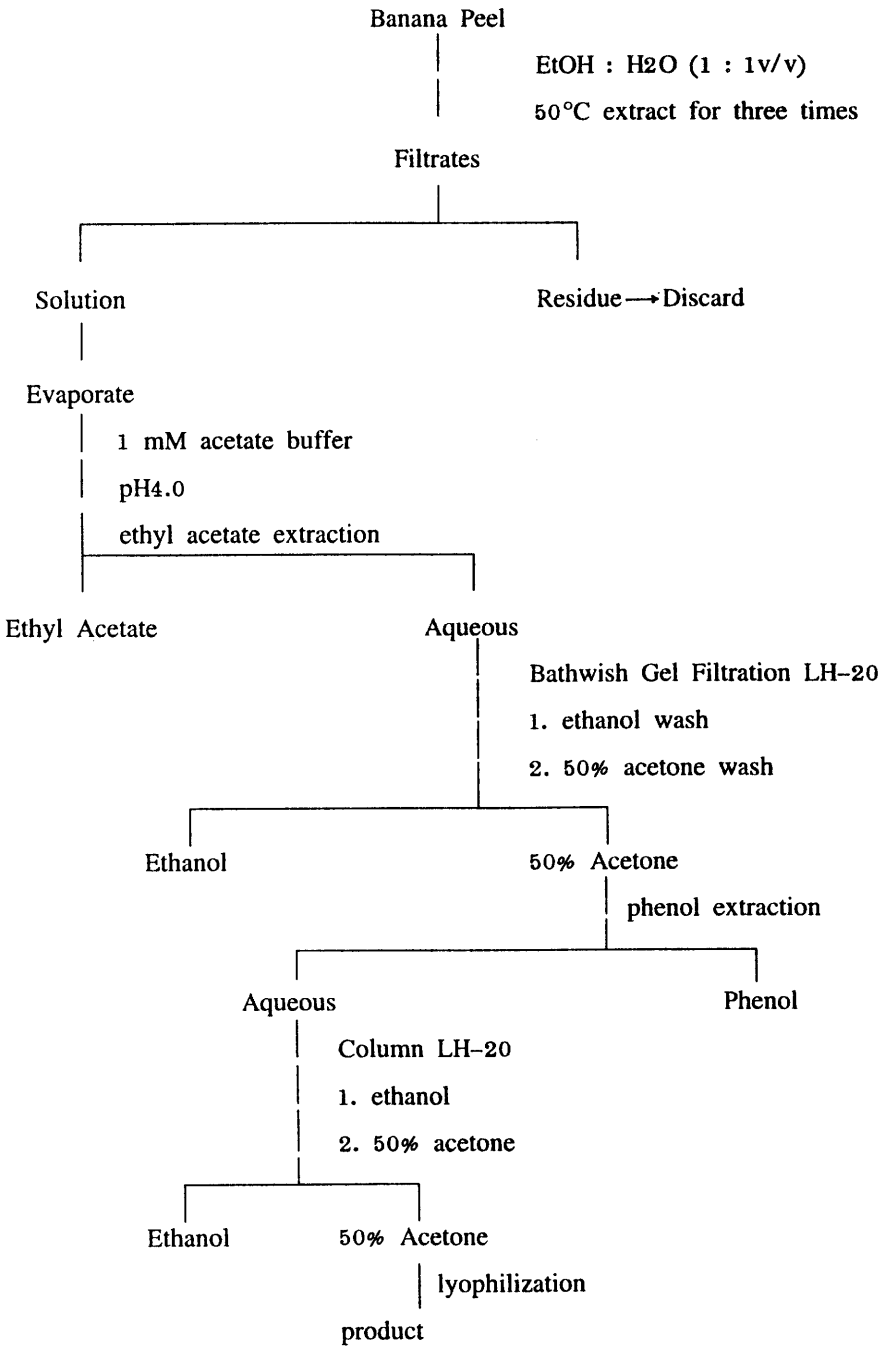

Figure 1. Scheme for the purification of tannin from banana peel.

(1981) กล่าวคือเป็นแทนนินที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และมีโครงสร้างเป็นโพลิเมอร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

ปริมาณแทนนินในเปลือกกล้วยขึ้นกับพันธุ์และระยะเวลาในการสุก โดยกล้วยดิบมีปริมาณแทนนินสูงกว่ากล้วยสุก ประสิทธิภาพในการสกัดแทนนินขึ้นกับสภาวะต่างๆ ได้แก่ชนิดของสารละลายสกัด และอุณหภูมิ ซึ่งมีผลค่อนข้างสูงต่อปริมาณแทนนินที่สกัดได้ เมื่อเทียบกับระยะเวลาในการสกัดและอัตราส่วนของเปลือกกล้วยต่อสารละลายสกัด ในการแยกและทำแทนนินให้บริสุทธิ์ อาศัยเทคนิคของขบวนการดูดซับ (adsorption) บนคอลัมน์ Sephadex LH-20 พบว่าแทนนินที่ได้มีคุณสมบัติเป็น condensed tannin สามารถตกตะกอนโปรตีนและจับกับอิออนของโลหะได้ดี ซึ่งนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มบางชนิดได้ อย่างไรก็ตามเทคนิคในการแยกและทำแทนนินให้บริสุทธิ์ค่อนข้างซับซ้อนและใช้สารเคมีหลายชนิดที่ราคาค่อนข้างแพง เนื่องจากแทนนินในเปลือกกล้วยมีปริมาณค่อนข้างน้อย ดังนั้นการผลิตในเชิงอุตสาหกรรมจึงไม่คุ้มค่า

เอกสารอ้างอิง

เบญจมาศ ศิลาย้อย. 2534. กล้วย. ภาควิชาพืชสวน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. พิมพ์ที่บริษัทประชาชื่น จำกัด. 290 น.

Asquith, N.T., C.C. Iznuno and L.G. Butler. 1983. Characterization of the condensed tannin (Proanthocyanidin) from group II. J. Agric. Food Chem. 31 : 1299-1303.

A.O.A.C. 1990. Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of Analysis 15th. ed. Arlington, VA. USA.

Chibata, I., T. Tosa, T. Mori, T. Watanabe and N. Sakata. 1986. Immobilized tannin a novel) absorbent for Protein and metal ion. Enzyme and Microbial Technology 8(3) : 130-136.

Forsyth, W.G.C. 1981. Tannin in Solid Foods in Quality of Foods and Beverages. vol.1 Academic Press, New York. 729 p.

Goldstein, J.L. and T. Swain. 1963. Changes in tannins in ripening fruits. Phytochem. 2 : 371.

Hagerman A.E. and L. G. Butler. 1980. Condensed tannin Purification and Characterization of Tannin-Associated Proteins. Agric. Food Chem., 28(5) : 947-952.

Matsuo, T., and S. Itoo. 1981. A simple and rapid purification method of condensed tannins from several young fruits. Agricultural and Biochemistry 45(8) : 1885-1887.

Meyer L.H. 1961. Food Chemistry. Reinhold Publishing Corporation, New york. 385 p.

Payne, M. 1980. Foodstuff preservation comprising tannin. UK patent Application 2036535A.

Strumeyer, D.H. and M.J. Malin. 1975. Condensed tannins in grain sorghum : Isolation, Fractionation and Characterization. J. Agric. Food chem. 23(5) 909-914.