

ผลของเอนไซม์เพกตินเอสและอุณหภูมิในการสกัดต่อปริมาณแอนโทไซยานิน จากลูกหว้า (*Syzygium cumini* Skeels)

Effect of Pectinase Enzyme and Extraction Temperature on Anthocyanins Content from Black Plum (*Syzygium cumini* Skeels)

รวินิภา ศรีมูล^{1*}, สมยศ สันติมาลัย², ศิริจันทร์ ตาใจ¹ และ พรสินี ดาราพงษ์¹

Rawinipa Srimoon^{1*}, Somyod Santimalai², Sirichan Tachai¹ and Pornsinee Darapong¹

Received: 20 September 2021, Revised: 12 July 2022, Accepted: 25 July 2022

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์เพกตินเอสและอุณหภูมิ ต่อการสกัดแอนโทไซยานินจากลูกหว้า (*Syzygium cumini* Skeels) โดยใช้เอนไซม์เพกตินเอสความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.5 โดยปริมาตร และอุณหภูมิ 3 ระดับ คือ อุณหภูมิห้อง (32-35 องศาเซลเซียส), 50 และ 60 องศาเซลเซียส เทียบกับวิธีสกัดแบบดั้งเดิม (ไม่ใช้เอนไซม์) ผลการศึกษาพบว่า ประสิทธิภาพการสกัดแอนโทไซยานินขึ้นกับความเข้มข้นของเอนไซม์และอุณหภูมิ เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์เพกตินเอสและอุณหภูมิ ปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้ในรูป cyanidin-3-glucoside เพิ่มขึ้น และมีค่าสูงสุดเมื่อใช้เอนไซม์เข้มข้นร้อยละ 0.2 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (11.76 ± 0.012 มิลลิกรัม Cyd-3-glu ต่อกรัม) สูงกว่าการสกัดแบบดั้งเดิมซึ่งไม่ใช้เอนไซม์ที่อุณหภูมิเดียวกัน 39 เท่า ($p < 0.05$) ปริมาณแอนโทไซยานินจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์มากกว่าร้อยละ 0.2 และอุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยสรุป การใช้เอนไซม์เพกตินเอสในสภาวะที่เหมาะสมทำให้ได้ปริมาณแอนโทไซยานินมากขึ้น และสามารถนำไปประยุกต์เพื่อพัฒนาการสกัดน้ำลูกหว้าให้ได้แอนโทไซยานินสูงสุดต่อไป

คำสำคัญ: แอนโทไซยานิน, เอนไซม์เพกตินเอส, ลูกหว้า

¹ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์และเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี ตำบลพลวง อำเภอเขาฉกรรจ์ จันทบุรี 22210

¹ Department of Applied Science and Biotechnology, Faculty of Agro-Industrial Technology, Rajamangala University of Technology Tawan-OK, Chanthaburi Campus, Pluang, Khaokitchakoot, Chanthaburi 22210, Thailand.

² สาขาวิชาวิศวกรรมไฟฟ้า โครงการจัดตั้งคณะวิศวกรรมศาสตร์บูรณาการและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี ตำบลพลวง อำเภอเขาฉกรรจ์ จันทบุรี 22210

² Department of Electrical Engineering, Faculty of Integrated-Engineering and Technology, Rajamangala University of Technology Tawan-OK, Chanthaburi Campus, Pluang, Khaokitchakoot, Chanthaburi 22210, Thailand.

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): rawinipa_sr@rmutto.ac.th

ABSTRACT

The objective of this research was to study the effect of pectinase enzyme and extraction temperature on anthocyanins content from black plum (*Syzygium cumini* Skeels) using the 0.05-0.5% by volume of enzyme concentration and three levels of extraction temperature: room temperature (32-35 °C), 50 and 60 °C, compared with traditional maceration (non-enzymatic). The results showed that the extraction efficiency depended on enzyme concentration and temperature. Total anthocyanin as cyanidin-3-glucoside rose when the enzyme concentration and extraction temperature increased. The extraction using 0.2% of pectinase at 50 °C yielded the highest anthocyanin content (11.76 ± 0.012 mg Cyd-3-glu/g), 39-folds higher than that of non-enzymatic maceration at the same temperature ($p < 0.05$). The extraction efficiency decreased as the temperature increased because of the enzyme inactivation and anthocyanin decomposition at high temperature. When the concentration of pectinase was over 0.2% and temperature was over 50 °C, anthocyanin contents decreased. In addition, at higher temperature total phenolic content increased but DPPH antioxidant capacity decreased significantly ($p < 0.05$). In conclusion, pectinase-assisted extraction at the appropriate conditions provided higher concentration of anthocyanins for black plum extraction. It is possible to be applied in extracted black plum juice with higher anthocyanins.

Key words: anthocyanins, pectinase enzyme, Black plum (*Syzygium cumini* Skeels)

บทนำ

แอนโทไซยานิน (Anthocyanins) เป็นสารต้านออกซิเดชันประเภทสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มฟลาโวนอยด์ พบมากในผักและผลไม้สีม่วงแดง เช่น เบอร์รี่ องุ่น และกะหล่ำม่วง รูปแบบที่พบมากที่สุดคือ cyanidin-3-glucoside (Chia *et al.*, 2008) มีรายงานบ่งชี้ว่าแอนโทไซยานินสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งโรคหลอดเลือดหัวใจ และการติดเชื้อบางชนิดได้ รวมทั้งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (Tiwarei *et al.*, 2010; Oancea and Oprean, 2011) ปริมาณแอนโทไซยานินที่มีผลต่อสุขภาพแตกต่างกันออกไป ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Guo *et al.* (2016) พบว่าเมื่อรับประทานสารสกัดแอนโทไซยานินวันละ 7.5 มิลลิกรัม ติดต่อกันทุกวัน ช่วยลดปริมาณไขมันในเลือดในคนที่เป็

นโรคอ้วนได้ ในขณะที่ Zhang *et al.* (2020) รายงานว่าผู้ป่วยที่มีภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูงถ้าได้รับสารสกัดแอนโทไซยานินปริมาณ 320 มิลลิกรัม วันละ 2 ครั้ง ติดต่อกัน 12 สัปดาห์ สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดลงได้ การดื่มน้ำผลไม้ที่มีแอนโทไซยานินสูง เช่น น้ำลูกพลัม หรือน้ำเชอร์รี่วันละ 200-300 มิลลิลิตร ติดต่อกัน 12 สัปดาห์ ช่วยลดความดันโลหิตลงได้ 1.6-7.7 มิลลิเมตรปรอท (Igwe *et al.*, 2017; Kent *et al.*, 2017)

แอนโทไซยานินสลายตัวได้ง่ายเมื่อได้รับความร้อน ความเสถียรของโมเลกุลขึ้นกับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ โครงสร้างทางเคมี ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ สภาพในการเก็บรักษา รวมไปถึงขั้นตอนต่าง ๆ ในกระบวนการแปรรูป การศึกษาเกี่ยวกับสถานะที่เหมาะสมในการสกัดแอนโทไซยานินจากพืชจึงมีความสำคัญ เนื่องจากจะช่วยรักษาสภาพของแอนโทไซยานินไว้ได้มากที่สุด การสกัดด้วยเอนไซม์ (Enzymatic extraction) เป็นวิธีการที่นิยมใช้

ในการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสารจากตัวอย่างพืช โดยเฉพาะเอนไซม์เพกตินเอส (Pectinase) ที่จะไปย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidic bond) ที่อยู่ระหว่างกรดกาแลกตอโรนิก (Galacturonic acid) ในโมเลกุลของเพกตินซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ปฐมภูมิของพืชให้สั่นลง (Verma *et al.*, 2018) ส่งผลให้สารออกฤทธิ์สำคัญที่อยู่ในพืชถูกสกัดออกมาได้มากตามไปด้วย โดยเฉพาะกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก แอนโทไซยานิน และฟลาโวนอยด์ (Demir *et al.*, 2001; Zuorro *et al.*, 2016) อีกทั้งเป็นวิธีการที่ไม่ใช้ความร้อนทำให้ลดการสลายตัวของสารที่สนใจ Khandare *et al.* (2011) ทดลองใช้เอนไซม์เพกตินเอสจาก *Aspergillus niger* Teigh ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 พบว่า ช่วยเพิ่มปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้ในน้ำเบตลักแครอท (*Daucus carota* ssp. *Sativus*) ได้ 2 เท่า เพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้ร้อยละ 27, 46 และ 30 ตามลำดับ นอกจากนี้เอนไซม์เพกตินเอสแล้วยังมีการใช้เอนไซม์ชนิดอื่นในการสกัดสารต้านออกซิเดชัน ตัวอย่างเช่น เอนไซม์เซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส ไชลานเอส อราบิแนนส เป็นต้น แต่ประสิทธิภาพของเอนไซม์เพกตินเอสจะสูงกว่าเอนไซม์ตัวอื่น Pontillo *et al.* (2021) ใช้เอนไซม์หลายชนิดสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากใบโรสแมรี่ (*Rosmarinus officinalis* L.) พบว่าเอนไซม์เพกตินเอสให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชสูงสุด (15.2 ± 0.3 มิลลิกรัมต่อกรัม และ IC_{50} เท่ากับ 14.3 ± 0.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) เมื่อเทียบกับเอนไซม์แอลคาเลส เซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส เบนตูลานเนส ไชลานเอส โดไชลานเอส และอะราบิแนนส

การวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์เพกตินเอสและอุณหภูมิต่อการสกัดแอนโทไซยานินจากลูกหว้า (*Syzygium cumini* Skeels) เทียบกับการสกัดแบบดั้งเดิมที่ไม่ใช้เอนไซม์

(Traditional maceration) ลูกหว้าเป็นผลไม้ที่พบมากในจังหวัดจันทบุรี มีสีม่วงเข้มเนื่องจากมีแอนโทไซยานินสูง โดยเฉพาะในระยะผลสุก รสชาติหวานอมเปรี้ยว นิยมนำมาทำเครื่องดื่มน้ำผลไม้ และไวน์มีประโยชน์ในการรักษาเบาหวาน หลอดลมอักเสบ และโรคที่เกี่ยวข้องกับทางเดินปัสสาวะ (Neelwame *et al.*, 2007) ซึ่งผลจากการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในพัฒนาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแอนโทไซยานินจากลูกหว้าโดยใช้เอนไซม์เพกตินเอส โดยสามารถคงปริมาณแอนโทไซยานิน รวมไปถึงสารประกอบฟีนอลิกและสมบัติในการต้านออกซิเดชันของลูกหว้าไว้ได้มากที่สุด

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยเป็นเกรดวิเคราะห์ (AR grade): โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) กรดแอซิดิก (CH_3COOH) และ โซเดียมแอซิดेट (CH_3COONa) ของ Univar Ajax Finechem Australia โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ของ Univar Ajax Finechem New Zealand สารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent ของ Loba Chemie India กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เอทานอล (Ethanol) และเมทานอล (Methanol) ของ Merck Germany ดีพีพีเอช (DPPH หรือ 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl) โทรล๊อกซ์ (Trolox) กรดแกลลิก (Gallic acid) และเอนไซม์เพกตินเอส (Pectinase from *Aspergillus aculeatus*) ของ Sigma-Aldrich USA สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ของ Libra S22 Biochrom

2. การเตรียมตัวอย่างลูกหว้าและสารสกัดตัวอย่าง

ตัวอย่างลูกหว้า (*Syzygium cumini* Skeels) จากอำเภอเขาคิชฌกูฏ จังหวัดจันทบุรี เก็บช่วงต้นเดือนมิถุนายนซึ่งเป็นช่วงที่ต้นหว้าให้ผลมาก เลือกเก็บในระยะผลสุก ล้างให้สะอาด แล้วนำมาศึกษาทันที แบ่งตัวอย่างลูกหว้าเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 สกัดด้วย

วิธีดั้งเดิมหรือมาซเชอเรนชัน (Maceration) ใช้ลูกหว้าสด 50 กรัม ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายปริมาตร 1 ลิตร (ใช้น้ำสกัดเนื่องจากผลการศึกษานำไปใช้พัฒนาการสกัดน้ำลูกหว้าสำหรับรับประทาน) คิดเป็นอัตราส่วนลูกหว้า:ตัวทำละลาย=5:100 โดยมวลต่อปริมาตร ทำการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แปรค่าอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง (32-35 องศาเซลเซียส) , 50 และ 60 องศาเซลเซียส ชุดที่ 2 สกัดด้วยเอนไซม์เพคตินเนส จาก *Aspergillus aculeatus* ลูกหว้าสด 50 กรัม ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายปริมาตร 1 ลิตร เช่นเดียวกับชุดที่ 1 ออกแบบการทดลองเป็น 3×4 factorial in RCBD โดยศึกษาปัจจัย 2 ปัจจัยร่วมกัน ปัจจัยที่ 1 คือ อุณหภูมิในการสกัด 3 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง (อยู่ระหว่าง 32-35 องศาเซลเซียส), 50 และ 60 องศาเซลเซียส และปัจจัยที่ 2 คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 4 ระดับ ได้แก่ ร้อยละ 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.5 โดยปริมาตร ตามลำดับ ทำการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น นำสารละลายไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ (โดยปกติเอนไซม์เพคตินเนสจาก *Aspergillus* sp. สามารถทำงานได้ดีที่สุดอยู่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.2 และพบว่ายังสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แต่ประสิทธิภาพการทำงานต่ำลง (Khatri *et al.*, 2015) แต่ในการทดลองนี้ใช้อุณหภูมิในช่วง 30-60 องศาเซลเซียส และไม่ได้ปรับ pH ของตัวอย่าง) ทุกการ

ทดลองนำไปวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินรวมในรูปของ cyanidin-3-glucoside ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH assay)

3. การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินรวม สารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช

วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินรวมใช้วิธี pH difference ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Golmohamadi *et al.* (2013): ปิเปตสารสกัดจากชุดการทดลองที่ 1 (การสกัดแบบดั้งเดิมด้วยวิธีมาซเชอเรนชัน) และชุดการทดลองที่ 2 (การสกัดด้วยการเติมเอนไซม์เพคตินเนสความเข้มข้นต่าง ๆ) มาทริทเมนต์ละ 2 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลอง 2 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร หลอดที่ 1 เติมสารละลาย KCl-HCl pH 1 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร หลอดที่ 2 เติมสารละลาย acetate buffer pH 4.5 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 นาโนเมตร ทั้งนี้ กำหนดปริมาณแอนโทไซยานินรวมในรูป cyanidin-3-glucoside (mg Cyd-3-glu/g) มวลโมเลกุล 449.2 กรัมต่อโมล สภาพการดูดกลืนโมลาร์ เท่ากับ 26,900 ลิตรต่อเซนติเมตรต่อโมล (Golmohamadi *et al.*, 2013) ดังสมการที่ (1)

$$\text{ปริมาณแอนโทไซยานินรวม (mg/g)} = \left[\frac{(A_{520, \text{pH}1} - A_{700, \text{pH}1}) - (A_{520, \text{pH}4.5} - A_{700, \text{pH}4.5})}{\text{molar extinction coefficient}} \right] \times \text{MW.} \times 1000 \quad (1)$$

เมื่อ $A_{520, pH1}$ และ $A_{700, pH1}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 นาโนเมตร ที่ pH 1 ตามลำดับ $A_{520, pH4.5}$ และ $A_{700, pH4.5}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 นาโนเมตร ที่ pH 4.5 ตามลำดับ MW. และ molar extinction coefficient คือ มวลโมเลกุลและสภาพการดูดกลืนโมลาร์ของแอนโทไซยานินในรูป cyanidin-3-glucoside ตามลำดับ วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu phenol reagent ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Wong *et al.* (2006): ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกหรือสารสกัด ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย 10 % v/v Folin-Ciocalteu phenol reagent 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที เติมสารละลาย 7.5 % w/v Na_2CO_3 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในรูป มิลลิกรัมเทียบกับกรดแกลลิกต่อกรัม (mg GAE/g)

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงจาก Shimada *et al.* (1992): ผสมสารละลายมาตรฐาน Trolox เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรหรือสารสกัดปริมาตรต่าง ๆ กับสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 5.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร รายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปของ EC_{50} (Effective concentration) หรือความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้อนุมูล DPPH ลดลงร้อยละ 50 และค่า TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) ในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัม (mg/g)

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

แต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ซ้ำ รายงานผลในรูปของค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ SD.) ทดสอบความแตกต่าง

ของค่าเฉลี่ยโดยใช้สถิติ ANOVA ด้วย Duncan's multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

ผลของเอนไซม์เพคตินเนสและอุณหภูมิที่มีต่อการสกัดแอนโทไซยานินจากลูกหว้าเทียบกับการสกัดด้วยวิธีดั้งเดิมแบบมาเซอร์ชันซึ่งไม่ใช่เอนไซม์แสดงใน Table 1 ผลการศึกษาพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เพคตินเนสระหว่างร้อยละ 0.05-0.2 ปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้ในรูปของ Cyd-3-glu เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่จะลดลงเมื่อใช้เอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 สำหรับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (ในรูปของค่า EC_{50} และ TEAC) จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์จนถึงร้อยละ 0.2 และจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เป็นร้อยละ 0.5 เช่นเดียวกัน สำหรับผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด พบว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้องซึ่งอยู่ระหว่าง 32-35 องศาเซลเซียส จนถึง 50 องศาเซลเซียส ปริมาณแอนโทไซยานินมีค่าเพิ่มขึ้นทุกระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 60 องศาเซลเซียส ปริมาณแอนโทไซยานินกลับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีค่ามากที่สุดที่อุณหภูมิห้อง และมีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

จะเห็นได้ว่า ประสิทธิภาพการสกัดแอนโทไซยานินจากลูกหว้าขึ้นกับปริมาณเอนไซม์เพคตินเนสและอุณหภูมิที่ใช้สกัด (Figure 1) เมื่อใช้เอนไซม์เพคตินเนสที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.2 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้สูงสุด เท่ากับ 11.76 ± 0.012 มิลลิกรัม Cyd-3-glu ต่อกรัม สูงกว่าการสกัดแบบดั้งเดิมซึ่งไม่ใช่เอนไซม์ที่อุณหภูมิเดียวกันถึง 39 เท่า เนื่องจาก

ลูกหว้ามีปริมาณเพกตินสูง เอนไซม์เพกตินเนสจะช่วยสลายพันธะไกลโคซิดิกในโมเลกุลเพกตินทำให้ผนังเซลล์สลายตัวได้ดี จึงสามารถสกัดแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลิกออกมาได้มากขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นเอนไซม์สูงกว่าร้อยละ 0.2 ปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้ลดลงประมาณร้อยละ 32 เนื่องจากเอนไซม์ที่มากเกินไปจะไปสลายพันธะในแอนโทไซยานินไกลโคไซด์ในโครงสร้างของแอนโทไซยานินทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินลดลงเมื่อใช้เอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้นสูง ๆ (Landbo and Meyer, 2004) แต่เอนไซม์ดังกล่าวมีผลน้อยมากต่อการสลายตัวของสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่นเมื่อเทียบกับการสลายตัวของแอนโทไซยานิน ผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับ Khandare *et al.* (2011) ซึ่งพบว่าเมื่อใช้เอนไซม์เพกตินเนสจาก *Aspergillus niger* Teigh เข้มข้นร้อยละ 0.2 เพิ่ม

ปริมาณสารฟอลิฟินอลและฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากเปลือกแครอท ร้อยละ 27 และ 46 ตามลำดับ เพิ่มปริมาณแอนโทไซยานินได้ 2 เท่า และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นร้อยละ 30 ในขณะที่ Sagu *et al.* (2014) ใช้เอนไซม์เพกตินเนสสกัดน้ำกล้วยหอมซึ่งเป็นผลไม้ที่มีเพกตินสูง โดยใช้เอนไซม์เข้มข้นร้อยละ 0.03 อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส สกัดนาน 108 นาที น้ำกล้วยหอมที่ได้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงกว่าไม่ใช้เอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญ Yazdi *et al.* (2018) ทดลองใช้เอนไซม์ผสมระหว่างเพกตินส เซลลูเลส และแทนเนส สกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากถั่วพิสตาชิโอ (*Pistacia vera* L.) พบว่าเพิ่มปริมาณสารสกัดได้ร้อยละ 112 และสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอชสูงกว่าไม่ใช้เอนไซม์ร้อยละ 71

Table 1 Total anthocyanins, total phenolic compounds and DPPH antioxidant activity of black plum extract using enzymatic extraction with pectinase and traditional maceration method (n=3)

Temperature	Traditional maceration	Concentration of pectinase in enzymatic extraction			
		0.05%	0.1%	0.2%	0.5%
Total anthocyanins (mg Cyd-3-glu/g)					
Room temperature	0.35±0.006 ^a	7.26±0.079 ^b	7.17±0.336 ^b	8.75±0.187 ^c	6.62±0.057 ^d
50 °C	0.30±0.001 ^a	11.59±0.013 ^e	9.08±0.017 ^f	11.76±0.012 ^e	8.01±0.010 ^g
60 °C	0.64±0.007 ^h	5.23±0.005 ⁱ	5.33±0.006 ⁱ	5.96±0.010 ^j	5.47±0.007 ^k
Total phenolic compounds (mg GAE/g)					
Room temperature	0.008±0.000 ^a	3.31±0.043 ^b	3.43±0.013 ^c	4.99±0.008 ^d	3.70±0.004 ^e
50 °C	0.007±0.000 ^a	4.62±0.038 ^f	4.71±0.058 ^f	5.08±0.082 ^g	4.91±0.012 ^d
60 °C	0.010±0.000 ^a	7.84±0.077 ^h	7.55±0.011 ⁱ	7.55±0.145 ⁱ	7.59±0.118 ⁱ
DPPH radical scavenging activity; EC ₅₀ (mg/mL)					
Room temperature	335.88±2.134 ^a	40.07±0.091 ^b	45.60±3.495 ^c	38.55±0.341 ^d	40.73±0.110 ^b
50 °C	364.38±1.695 ^e	74.93±2.796 ^f	55.91±0.258 ^g	51.21±0.331 ^h	53.15±0.714 ⁱ
60 °C	192.70±0.465 ^j	81.74±1.323 ^k	64.67±0.825 ^l	59.55±0.422 ^m	62.91±0.642 ⁿ

Table 1 (continued)

Temperature	Traditional maceration	Concentration of pectinase in enzymatic extraction			
		0.05%	0.1%	0.2%	0.5%
DPPH radical scavenging activity; TEAC (mg/g)					
Room temperature	1.42±0.009 ^a	5.96 ±0.014 ^b	5.26±0.386 ^c	6.19±0.055 ^d	5.86±0.016 ^b
50 °C	1.31±0.006 ^c	3.19±0.118 ^f	4.27±0.019 ^g	4.66±0.030 ^h	4.49±0.061 ⁱ
60 °C	2.48±0.006 ^j	2.92±0.048 ^k	3.69±0.047 ^l	4.01±0.029 ^m	3.79±0.039 ^l

Treatments with the superscript ^(a,b,c,...) in each row or column were significantly different ($p<0.05$).

Room temperature in this study was between 32-35 °C.

ปริมาณเอนไซม์และอุณหภูมิที่ใช้สกัดมีความสัมพันธ์กันเนื่องจากเอนไซม์เป็นสารประเภทโปรตีน เมื่อได้รับความร้อนสูงเกินไปเอนไซม์จะเสียสภาพ ทำให้การทำงานของเอนไซม์ต่ำลง จากผลการทดลองในครั้งนี้เห็นได้ว่า อุณหภูมิส่งผลต่อประสิทธิภาพการสกัดโดยใช้เอนไซม์เพกตินเอส เมื่อใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ประสิทธิภาพการสกัดลดลงทุกความเข้มข้นของเอนไซม์ (ลดลงร้อยละ 31-54) ความร้อนทำให้เอนไซม์เพกตินเอส ซึ่งเป็นสารประเภทโปรตีนทำงานได้น้อยลง การศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับ Khatri *et al.* (2015) ซึ่งรายงานว่า เอนไซม์เพกตินเอสจะทำงานได้ดีที่สุดอยู่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แต่จะลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 70 และ 100 องศาเซลเซียส ตามลำดับ Ngadze *et al.* (2018) ใช้เอนไซม์เพกตินเอสสกัดสารประกอบฟีนอลิกจาก *Strychnos cocculoides* ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นอกจากนี้แอนโทไซยานินยังเป็นสารสลายตัวได้ง่ายเมื่อได้รับความร้อน ปริมาณที่สกัดได้จึงต่ำลง อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเนื่องจากเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenoloxidase) จะทำงานได้น้อยลงที่อุณหภูมิสูง ทำให้การสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกลดลง (Srimoon, 2020) แต่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกับปริมาณแอนโทไซยานิน

นั่นคือ ลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเนื่องจากลูกหว้ามีปริมาณแอนโทไซยานินสูงและเป็นสารสำคัญที่ทำให้ลูกหว้ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อแอนโทไซยานินลดลง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงลดลงด้วย

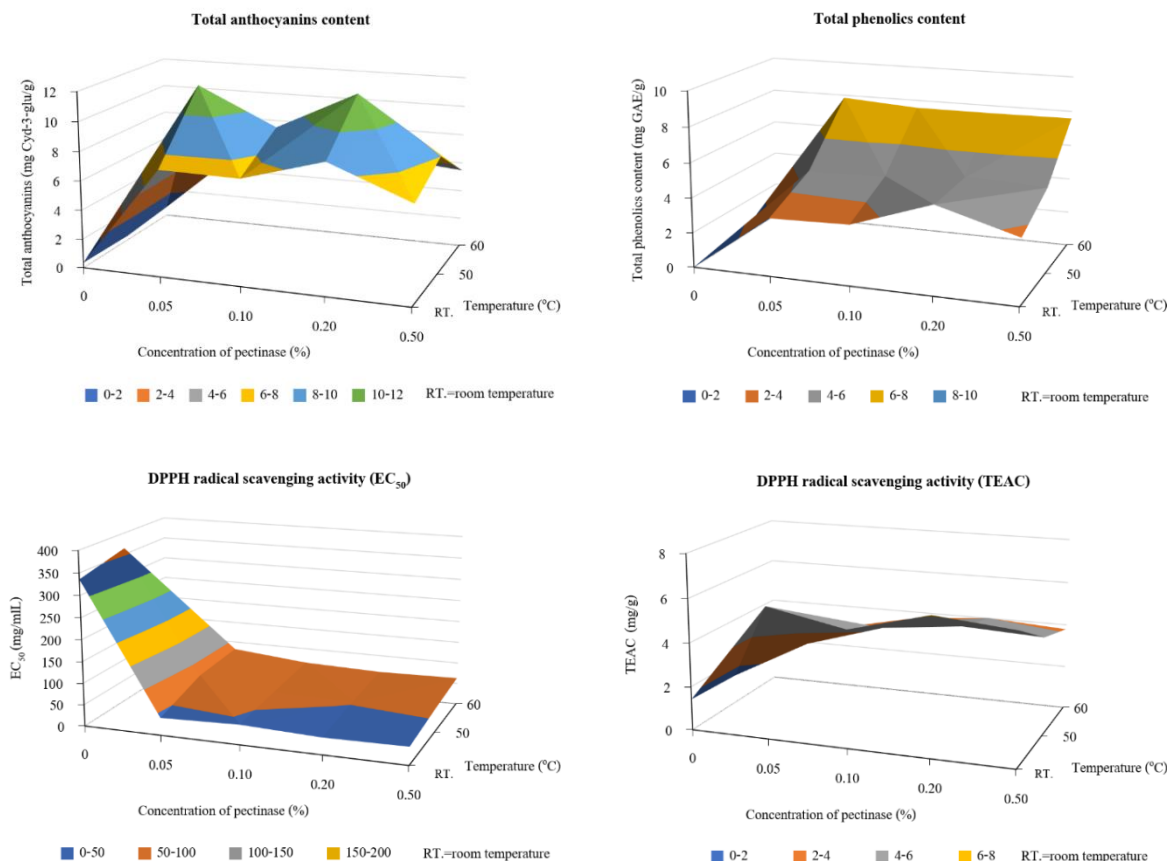


Figure 1 The effect of pectinase concentration and extraction temperature on total anthocyanins, total phenolic contents and DPPH radical scavenging activity (EC₅₀ and TEAC) of black plum extract

การใช้เอนไซม์ในการสกัดร่วมกับตัวทำละลายอาจนำไปประยุกต์ใช้กับเทคนิคการสกัดรูปแบบใหม่ๆ ที่ไม่ใช้ความร้อนได้ เช่น การสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ หรือการใช้คลื่นไมโครเวฟ เนื่องจากลดโอกาสการสลายตัวของสารต้านอนุมูลอิสระลงได้ ซึ่งเป็นแนวทางการวิจัยที่น่าสนใจในอนาคต

สรุป

วิธีการสกัดด้วยเอนไซม์ (Enzymatic-assisted extraction) โดยใช้เอนไซม์เพกตินเนสความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยปริมาตร อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้เป็นตัวทำละลายในอัตราส่วนลูกหว่า:ตัวทำละลาย=5:100 โดยมีผลต่อปริมาณ ระยะเวลาในการสกัด 60 นาที ให้ปริมาณแอนโทไซยานินในรูปของ

cyanidin-3-glucoside สูงกว่าการสกัดด้วยวิธีดั้งเดิม ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อปริมาณแอนโทไซยานินเมื่อใช้การสกัดด้วยเอนไซม์เพกตินเนส ได้แก่ อุณหภูมิ และความเข้มข้นของเอนไซม์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิทั้งแอนโทไซยานินและเอนไซม์เพกตินเนสอาจสลายตัวได้ แต่เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์มากเกินไป ปริมาณแอนโทไซยานินจะลดลงเนื่องจากเอนไซม์จะไปสลายพันธะในแอนโทไซยานินไกลโคไซด์ หรือเมื่อใช้อุณหภูมิสูงเกินไปเอนไซม์จะเสียสภาพทำให้ทำงานได้น้อยลง อย่างไรก็ตาม การสกัดด้วยเอนไซม์ข้อดี คือ ได้ปริมาณแอนโทไซยานินออกมามากและไม่ทำให้แอนโทไซยานินสลายตัว หากใช้อุณหภูมิและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ผู้วิจัย ขอขอบคุณสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์และเทคโนโลยีชีวภาพ สำหรับสถานที่ทำการวิจัย และ เกษตรกรในตำบลคลองพลู อำเภอเขาฉกรรจ์ จังหวัด จันทบุรี สำหรับการอำนวยความสะดวกในการเก็บ ตัวอย่างลูกหว้าในงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- Chia, L. S., Kong, J.M., Goh, N.K., Chia, T.F. and Brouillard, R. 2008. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry** 64: 923-933.
- Demir, N., Acar, J., Sarioğlu, K. and Mutlu, M. 2001. The use of commercial pectinase in fruit juice industry part 3: immobilized pectinase for mash treatment. **Journal of Food Engineering** 47(4): 275-280.
- Golmohamadi, A., Möller, G., Powers, J. and Nindo, C. 2013. Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of red raspberry puree. **Ultrasonic Sonochemistry** 20: 1316-1323.
- Guo., X., Yang, B., Tan, J., Jiang, J. and Li, D. 2016. Associations of dietary intakes of anthocyanins and berry fruit with risk of type-2 diabetes mellitus: a systematic review and meta- analysis of prospective cohort studies. **European Journal of Clinical Nutrition** 70(12): 1360-1367.
- Igwe, E.O., Charlton, K.E., Roodenrys, S., Kent, K., Fanning, K. and Netzel, M.E. 2017. Anthocyanin-rich plum juice reduces ambulatory blood pressure but not acute cognitive function in younger and older adults: a pilot crossover dose- timing study. **Nutrition Research** 47: 28-43.
- Kent, K., Charlton, K., Roodenrys, S., Batterham, M., Potter, J., Traynor, V., Gilbert, H., Morgan, O. and Richards, R. 2017. Consumption of anthocyanin- rich cherry juice for 12- week improves memory and cognition in older adults with mild- to- moderate dementia. **European Journal of Nutrition** 56(1): 333-341.
- Khandare, V., Walia, S., Singh, M. and Kaur, C. 2011. Black carrot (*Daucus carota* ssp. Sativus) juice: processing effects on antioxidant composition and color. **Food and Bioproducts Processing** 89: 482-486.
- Khatri, B.P., Bhattarai, T., Shrestha, S. and Maharjan, J. 2015. Alkaline thermostable pectinase enzyme from *Aspergillus niger* strain MCAS2 isolated from Manaslu Conservation Area, Gorkha, Nepal. **SpringerPlus** 4(488): 1-8.
- Landbo, A. and Meyer, S.A. 2004. Effects of different enzymatic maceration treatments on enhancement of anthocyanins and other phenolics in black currant juice. **Innovative Food Science and Emerging Technology** 5: 503-513.
- Neelwame, B., Veigas, J.M., Narayan, M.S. and Laxman, P. M. 2007. Chemical nature, stability and bioefficiencies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini* Skeels. **Food Chemistry** 105: 619-627.

- Ngadze, R. T., Verkerk, R., Nyanga, L. K., Fogliano, V., Ferracane, R., Troise, A. D. and Linnemann, A. R. 2018. Effect of heat and pectinase maceration on phenolic compounds and physicochemical quality of *Strychnos cocculoides* juice. **PLoS ONE** 13(8): e0202415.
- Oancea, S. and Oprean, L. 2011. Anthocyanins, from biosynthesis in plants to human health benefits- a review. **Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology** 15(1): 3-16.
- Pontillo, O. R. N., Papakosta-Tsigkri, L., Lymperopoulou, T., Mamma, D., Kekos, D. and Detsi, A. 2021. Conventional and enzyme-assisted extraction of rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis* L.): toward a greener approach to high added-value extracts. **Applied Science** 11: 3724.
- Sagu, S. T., Nso, E. J., Karmakar, S. and De, S. 2014. Optimization of low temperature extraction of banana juice using commercial pectinase. **Food Chemistry** 151: 182-190.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthans on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 40(6): 945-948.
- Srimoon, R. 2020. **Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Plants**. Odeonstore Publishing, Bangkok. (in Thai).
- Tiwari, B. K., Patras, A., Brunton, N., Cullen, P. J. and O'Donnell, C. P. 2010. Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. **Ultrasonics Sonochemistry** 17: 598-604.
- Verma, H., Namoliya, L. K. and Jadaun, J. S. 2018. Pectinase: a useful tool in fruit processing industries. **Nutrition and Food Science International Journal** 5(5): 1-4.
- Wong, S. P., Leong, L. P. and Koh, J. H. W. 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. **Food Chemistry** 99: 775-783.
- Yazdi, A. P. G., Barzegar, M., Sahari, M. A. and Gavlighi, H. A. 2018. Optimization of the enzyme-assisted aqueous extraction of phenolic compounds from pistachio green hull. **Food Science and Nutrition** 7(1): 356-366.
- Zhang, H., Xu, Z. L., Zhao, H. W., Wang, X., Pang, J., Li, Q., Yang, Y. and Ling, W. H. 2020. Anthocyanin supplementation improve anti-oxidative and anti-inflammatory capacity in a dose-response manner in subject with dyslipidemia. **Redox neology** 32(101474): 1-11.
- Zuorro, A., Maffei, G. and Lavecchia, R. 2016. Optimization of enzyme-assisted lipid extraction from *Nannochloropsis* microalgae. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers** 67: 106-114.