

สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากหัวกุ้ง โดยใช้เอนไซม์ปาเปน
ร่วมกับน้ำมันรำข้าว**

Optimum Condition for Extraction of Astaxanthin from Shrimp Head
using Papain Combined with Rice Bran Oil

ธรรมรัตน์ แสงหิรัญ และสุทัศน์ สุระวัง*

สาขาวิชาเทคโนโลยีการพัฒนาลิขสิทธิ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

แอสตาแซนทินเป็นสารให้สีในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีคุณสมบัติละลายได้ในน้ำมัน พบมากบริเวณส่วนหัวกุ้ง โดยอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนกับโปรตีน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด แอสตาแซนทินจากหัวกุ้ง โดยใช้เอนไซม์ปาเปนร่วมกับน้ำมันรำข้าว วางแผนการทดลองแบบ Face-centered central composite design โดยศึกษาถึงอิทธิพลของความเข้มข้นเอนไซม์ (0.25, 0.75 และ 1.25% ของหัวกุ้ง) เวลาในการย่อยสลาย (30, 150 และ 270 นาที) และเวลาในการสกัด (30, 90 และ 150 นาที) ที่มีต่อปริมาณแอสตาแซนทิน ผลการทดลองพบว่าการใช้เอนไซม์ปาเปนย่อยสลายโปรตีนในหัวกุ้งก่อนนำไปสกัดด้วยน้ำมันรำข้าวช่วยเพิ่มผลผลิตของแอสตาแซนทิน โดยสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ปริมาณแอสตาแซนทินมากที่สุด (123.09 µg/g) คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.80% ของหัวกุ้ง เวลาในการย่อยสลาย 270 นาที และเวลาในการสกัด 105 นาที

คำสำคัญ: แอสตาแซนทิน หัวกุ้ง เอนไซม์ปาเปน น้ำมันรำข้าว

* ผู้ประสานงานหลัก (Corresponding Author)

Optimum Condition for Extraction of Astaxanthin from Shrimp Head

**งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

using Papain Combined with Rice Bran Oil

e-mail: suthat.s@cmu.ac.th

Abstract

Astaxanthin is an oil soluble pigment in group of carotenoid and usually found in shrimp head in form of carotenoprotein complex. The aim of this research was to investigate the optimum condition for extraction of astaxanthin from shrimp head using papain combined with rice bran oil. The face-centered central composite design was used to evaluate the effects of enzyme concentration (0.25, 0.75, and 1.25% of shrimp head), hydrolysis time (30, 150, and 270 min), and extraction time (30, 90, and 150 min) on astaxanthin yield. The results showed that enzymatic hydrolysis of shrimp head with papain followed by extraction with rice bran oil significantly enhanced astaxanthin yield. The optimum condition that gave the highest astaxanthin yield (123.09 $\mu\text{g/g}$) was enzyme concentration at 0.80% of shrimp head, hydrolysis time of 270 min, and extraction time of 105 min.

Keywords: astaxanthin, shrimp head, papain, rice bran oil

บทนำ

กุ้งเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย สามารถทำรายได้เข้าประเทศปีละกว่าหลายหมื่นล้านบาท โดยในปี 2555 มีมูลค่าการส่งออกมากถึง 95,637 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556) ซึ่งถือเป็นสินค้าประมงที่มีมูลค่าการส่งออกมากที่สุด โดยผลผลิตส่วนใหญ่มักจะส่งออกในรูปของกุ้งสดแช่เย็น แช่เยือกแข็ง กุ้งแปรรูป และกุ้งกระป๋อง ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งตลาดในเอเชีย ญี่ปุ่น และจีน ทำให้อุตสาหกรรมแปรรูปกุ้งมีการขยายตัวอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้มีความต้องการใช้วัตถุดิบในปริมาณที่เพิ่มขึ้น ขณะเดียวกันก็มีเศษเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก ประมาณ 40-50% ของน้ำหนักกุ้ง (Simpson & Haard, 1985) ซึ่งเศษเหลือทิ้งเหล่านี้เป็นแหล่งที่สำคัญของโปรตีน โคติน เกลือแร่ และแคโรทีนอยด์ (Sachindra, 2003)

แอสตาแซนทิน (3,3'-dihydroxy- β - β' -carotene-4-4'-dione) เป็นสารให้สีที่จัดอยู่ในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ พบมากบริเวณส่วนหัวของสัตว์ที่มีเปลือกแข็ง (Crustacean) เช่น กุ้ง กั้ง และปู (Sachindra et al., 2005a) นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในปลาแซลมอน ยีสต์ สาหร่ายขนาดเล็ก รวมทั้งในอวัยวะของนกบางชนิด (Hussein et al., 2006; Sachindra et al., 2005b; Higuera-Ciapara et al., 2004) แอสตาแซนทินที่พบมักอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนกับโปรตีน (Carotenoprotein) โดยจับอยู่กับโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนบริเวณตำแหน่งที่เป็นไฮโดรโฟบิก ซึ่งช่วยเพิ่มความเสถียรให้กับแอสตาแซนทิน และทำให้แอสตาแซนทินละลายน้ำได้ รวมทั้งเปลี่ยนจากสีส้มแดงเป็นสีน้ำตาลฟ้า (Higuera-Ciapara et al., 2006) ปัจจุบันนี้ได้มีการนำแอสตาแซนทินมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย เช่น ใช้ผสมในอาหารสัตว์น้ำ ใช้เป็นสารให้สีในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้ในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง (ZMC, 2009; Hussein

et al., 2006; Higuera-Ciapara et al., 2006) และจากรายงานการวิจัยพบว่าแอสตาแซนทินมีส่วนช่วยในการบำบัดรักษาโรค เช่น ด้านการอักเสบ ลดความเสี่ยงจากโรคเบาหวาน (Sánchez-Camargo et al., 2011) ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งบางชนิด (Jyonouchi et al., 2000) และลดความเสี่ยงจากโรคหลอดเลือดหัวใจ (Snodderly, 1995) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าสารให้สีในกลุ่มแคโรทีนอยด์ชนิดอื่นๆ เช่น ซีแซนทิน (Zeaxanthin) ลูทีน (Lutein) แคนตาแซนทิน (Canthaxanthin) และบีตา-แคโรทีน (β -carotene) ถึง 10 เท่า (Miki, 1991)

น้ำมันรำข้าวเป็นน้ำมันที่มีคุณภาพดี ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid) 18% กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated fatty acid) 45% และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acid) 37% นอกจากนี้ยังอุดมไปด้วยสารพฤกษเคมี (Phytochemical) ที่สำคัญหลายชนิด เช่น แอลฟา บีตา แกมมา และเดลตา-โทโคเฟอรอล (α , β , γ and δ -tocopherol) หรือเรียกรวมว่าวิตามินอี (Vitamin E) แอลฟา บีตา แกมมา และเดลตา-โทโคไตรอีนอล (α , β , γ and δ -tocotrienol) (Duvernay et al., 2005) รวมทั้งแกมมา-โอไรซานอล (γ -oryzanol) ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพ (Lloyd et al., 2000)

การสกัดแอสตาแซนทินจากเศษเหลือทิ้งที่เกิดจากโรงงานแปรรูปกุ้งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้เอนไซม์ (Holanda & Netto, 2006) การใช้กระบวนการหมัก (Sachindra et al., 2007) การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Sachindra et al., 2006) และเนื่องจากแอสตาแซนทินเป็นสารให้สีที่สามารถละลายได้ในน้ำมันจึงได้มีการศึกษาวิธีการสกัด โดยใช้ไขมันพืชเป็นตัวทำละลาย (Sachindra & Mahendrakar, 2005) ซึ่งวิธีนี้ถือเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากไม่จำเป็นต้องแยกตัวทำละลายออกในภายหลัง จึงช่วยลดขั้นตอนการสกัดและลดการใช้พลังงานในขั้นตอนการกำจัดตัวทำละลาย (Kang & Sim, 2008) ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะมีข้อดีหลายประการ แต่การสกัดด้วยน้ำมันพืชเพียงอย่างเดียวอาจมีประสิทธิภาพที่ไม่ดีพอเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้นจึงได้มีการปรับปรุงกระบวนการสกัด โดยนำเศษเหลือทิ้งมาย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอส (Protease) เช่น ทริปซิน (Trypsin) เปปซิน (Pepsin) ปาเปน (Papain) และอัลคาเลส (Alcalase) แล้วจึงนำไปสกัดด้วยน้ำมันพืช (Sachindra & Mahendrakar, 2011) Chakrabarti (2002) แนะนำว่าควรใช้เอนไซม์ปาเปนในการสกัดแอสตาแซนทินมากกว่าเอนไซม์ทริปซิน เนื่องจากเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการสกัดแอสตาแซนทินไม่แตกต่างกันมากนัก แต่เอนไซม์ทริปซินมีราคาสูงกว่าเอนไซม์ปาเปนถึง 20 เท่า จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นจึงมีแนวคิดที่จะนำหัวกุ้งมาสกัดแอสตาแซนทิน โดยนำไปย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ปาเปนแล้วจึงนำไปสกัดด้วยน้ำมันรำข้าวเพื่อเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับเศษเหลือทิ้งจากโรงงานแปรรูปกุ้ง

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากหัวกุ้ง โดยใช้เอนไซม์ปาเปนร่วมกับน้ำมันรำข้าว

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัตถุดิบและสารเคมี

เศษเหลือทิ้งจากการตัดแต่งกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ซึ่งประกอบด้วยส่วนหัว เปลือก และหางกุ้งได้จากร้านขายอาหารทะเลในตลาดเมืองใหม่ (เชียงใหม่, ประเทศไทย) นำมาแยกเอาเฉพาะส่วนหัว แล้วเก็บรักษาในถุงพลาสติกที่อุณหภูมิ -18°C จนกว่าจะนำมาใช้สกัดแอสตาแซนทิน เอนไซม์ปาเปน (30,000 USP-U/mg) จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany) โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรต (Sodium Dihydrogen Phosphate Monohydrate) จากบริษัท QR&C (New Zealand) ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรต (di-Sodium Hydrogen Phosphate Heptahydrate) จากบริษัท Panreac (Barcelona, Spain) และน้ำมันรำข้าว จากบริษัทน้ำมันบริโกคไทย (สมุทรปราการ, ประเทศไทย)

2. การสกัดแอสตาแซนทินจากหัวกุ้ง

นำหัวกุ้งมาละลายน้ำแข็ง โดยแช่ในอ่างน้ำเป็นเวลา 30 นาที แล้วปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (Moulinex, Model DPA141, France) จากนั้นเติมเอนไซม์ปาเปนความเข้มข้น 0.25, 0.75 และ 1.25% ของน้ำหนักหัวกุ้ง และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 อัตราส่วน 1 : 1 (หัวกุ้ง : บัฟเฟอร์) นำไปย่อยสลายที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 30, 150 และ 270 นาที โดยใช้อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Model WB 10, Germany) แล้วให้ความร้อนต่อที่อุณหภูมิ 90°C อีก 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลาย จากนั้นแยกส่วนที่เป็นของแข็งและของเหลวออกจากกัน โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (HERMLE, Model Z 206 A, Germany) ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ผสมส่วนที่เป็นของแข็งกับน้ำมันรำข้าว อัตราส่วน 1 : 2 (หัวกุ้ง : น้ำมัน) แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 30, 90 และ 150 นาที โดยใช้อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Memmert, Model WB 22, Germany) จากนั้นแยกส่วนที่เป็นน้ำมันกับส่วนที่เป็นของแข็งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เก็บส่วนที่เป็นน้ำมันไว้ในหลอดที่หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยด์เพื่อป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดจากแสง (Photo-oxidation) แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18°C ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแอสตาแซนทินต่อไป

3. การวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทินในน้ำมันพืช

วิเคราะห์ปริมาณของแอสตาแซนทินที่สกัดได้ โดยปิเปตสารสกัด 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำมันรำข้าว จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Thermo Scientific Genesys, Model Genesys 10 UV Scanning, USA) ที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของแอสตาแซนทิน โดยใช้สมการของ Sachindra & Mahendrakar (2005)

$$\text{Astaxanthin } (\mu\text{g/g waste}) = \frac{A \times V \times D \times 10^6}{100 \times W \times E_{1\text{cm}}^{1\%}}$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร V คือ ปริมาตรของน้ำมันพืชที่สามารถนำกลับมาได้ (มิลลิลิตร) D คือ จำนวนเท่าของการเจือจาง W คือ น้ำหนักของหัวกุ้ง (กรัม) และ $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ คือ ค่าคงที่การดูดกลืนแสงของแอสตาแซนทินที่ละลายอยู่ในน้ำมันรำข้าว เท่ากับ 1,800 (Chen and Meyers, 1984)

4. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากหัวกุ้ง

วางแผนการทดลองแบบ Face-centered central composite design และทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง (Center point) 3 ซ้ำ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ Minitab version 16.1.0 (Minitab Inc.) โดยศึกษาถึงอิทธิพลของความเข้มข้นเอนไซม์ (X_1) เวลาในการย่อยสลาย (X_2) และเวลาในการสกัด (X_3) ที่มีต่อปริมาณแอสตาแซนทิน (Y) สำหรับระดับปัจจัยที่ใช้ศึกษาแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ระดับปัจจัยที่ใช้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทิน

รหัสปัจจัย	ปัจจัย	ระดับต่ำ (-1)	ระดับกลาง (0)	ระดับสูง (+1)
X_1	ความเข้มข้นของเอนไซม์ (% ของหัวกุ้ง)	0.25	0.75	1.25
X_2	เวลาในการย่อยสลาย (นาที)	30	150	270
X_3	เวลาในการสกัด (นาที)	30	90	150

5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยหลักและอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ Minitab version 16.1.0 (Minitab Inc.) โดยใช้แบบพหุนกำลังสอง (Second order models) ในการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างค่าสังเกต (Y) และปัจจัยต่างๆ (X_1, X_2, X_3) ซึ่งสมการดังกล่าวมีลักษณะ ดังนี้

$$Y = \beta_0 + \beta_i X_i + \beta_{ii} X_i^2 + \beta_{ij} X_i \cdot X_j$$

เมื่อ Y คือ ค่าสังเกต β_0 คือ ค่าคงที่ β_i คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของปัจจัยหลักกำลังหนึ่ง β_{ii} คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของปัจจัยหลักกำลังสอง และ β_{ij} คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของอิทธิพลร่วม

จากนั้นนำสมการถดถอยที่ได้มาหาสภาวะที่เหมาะสม (Optimization) ในการสกัดแอสตาแซนทิน โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ Minitab version 16.1.0 (Minitab Inc.) และสร้างกราฟผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว 3 มิติ (3D Response surface) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ STATISTICA version 10 (StatSoft Inc.)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยหลักและอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยที่มีต่อปริมาณแอสตาแซนทิน แสดงดังตารางที่ 2 และผลการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของสมการถดถอย แสดงดังตารางที่ 3

จากตารางที่ 2 พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ (X_1) และเวลาในการสกัด (X_3) รวมถึงอิทธิพลของปัจจัยดังกล่าวกำลังสองมีผลต่อปริมาณแอสตาแซนทินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งงานวิจัยของ Sachindra & Mahendrakar (2005) ที่สกัดแอสตาแซนทินจากเศษเหลือทิ้งของกุ้ง (*Penaeus indicus*) โดยใช้น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเป็นตัวทำละลาย พบว่า เวลาในการสกัดมีผลต่อปริมาณแอสตาแซนทินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และ Sachindra & Mahendrakar (2011) ที่สกัดแอสตาแซนทินจากเศษเหลือทิ้งของกุ้งชนิดเดียวกัน โดยใช้เอนไซม์อัลคาเลสในการย่อยสลายโปรตีนก่อนนำไปสกัดด้วยน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาเลสมีผลต่อปริมาณแอสตาแซนทินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้อิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการสกัด ($X_1 \cdot X_3$) อิทธิพลร่วมระหว่างเวลาในการย่อยสลายและเวลาในการสกัด ($X_2 \cdot X_3$) ก็มีผลต่อปริมาณแอสตาแซนทินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เช่นเดียวกัน ขณะที่เวลาในการย่อยสลาย (X_2) เวลาในการย่อยสลายกำลังสอง (X_2^2) รวมทั้งอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อยสลาย ($X_1 \cdot X_2$) ไม่มีผลต่อปริมาณแอสตาแซนทิน ($p > 0.05$)

จากตารางที่ 3 สามารถเขียนเป็นสมการถดถอยได้ ดังนี้

$$Y = 23.235 + 101.289X_1 - 0.010X_2 + 0.833X_3 - 47.360X_1^2 - 0.000X_2^2 - 0.004X_3^2 - 0.016X_1X_2 - 0.205X_1X_3 + 0.001X_2X_3$$

โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9511 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสมการนี้สามารถนำมาใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างค่าสังเกต (Y) และปัจจัยต่างๆ (X_1, X_2, X_3) ได้เป็นอย่างดี

ตารางที่ 2 อิทธิพลของปัจจัยหลักและอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยที่มีต่อปริมาณแอสตาแซนทิน

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	3379.15	3379.15	375.461	15.12	0.001
Linear	3	558.59	1832.56	610.855	24.59	0.000
X_1	1	218.92	651.69	651.687	26.24	0.001
X_2	1	277.20	0.44	0.442	0.02	0.898 ^{NS}
X_3	1	62.47	634.85	634.847	25.56	0.001
Square	3	2273.00	2273.00	757.666	30.50	0.000
X_1^2	1	1585.95	375.60	375.597	15.12	0.006
X_2^2	1	82.46	0.04	0.036	0.00	0.971 ^{NS}
X_3^2	1	604.59	604.59	604.590	24.34	0.002
Interaction	3	547.56	547.56	182.518	7.35	0.014
X_1X_2	1	7.59	7.59	7.593	0.31	0.598 ^{NS}
X_1X_3	1	302.74	302.74	302.742	12.19	0.010
X_2X_3	1	237.22	237.22	237.220	9.55	0.018
Residual Error	7	173.87	173.87	24.839		
Lack-of-Fit	5	172.56	172.56	34.512	52.57	0.019
Pure Error	2	1.31	1.31	0.656		
Total	16	3553.02				

หมายเหตุ : NS = ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 3 ค่าสัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยที่ได้จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากหัวกุ้ง โดยใช้เอนไซม์ปาเปนร่วมกับน้ำมันรำข้าว

Term	Coefficient	T	P
Constant	23.235	2.660	0.032
X_1	101.289	5.122	0.001
X_2	-0.010	-0.133	0.898 ^{NS}
X_3	0.833	5.056	0.001
X_1^2	-47.360	-3.889	0.006
X_2^2	-0.000	-0.038	0.971 ^{NS}
X_3^2	-0.004	-4.934	0.002
$X_1 * X_2$	-0.016	-0.553	0.598 ^{NS}
$X_1 * X_3$	-0.205	-3.491	0.010
$X_2 * X_3$	0.001	3.090	0.018

หมายเหตุ : NS = ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

จากสมการที่ได้สามารถอธิบายได้ว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ (X_1) เวลาในการสกัด (X_3) และอิทธิพลร่วมระหว่างเวลาในการย่อยสลายกับเวลาในการสกัด ($X_2 * X_3$) มีผลในทางบวกต่อปริมาณแอสตาแซนทิน โดยที่ความเข้มข้นของเอนไซม์มีอิทธิพลมากที่สุด ขณะที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ยกกำลังสอง (X_1^2) เวลาในการสกัดยกกำลังสอง (X_3^2) และอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์กับเวลาในการสกัด ($X_1 * X_3$) ก่อให้เกิดผลในทางลบต่อปริมาณแอสตาแซนทิน โดยที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ยกกำลังสองมีอิทธิพลมากที่สุด นอกจากนี้เวลาในการย่อยสลาย (X_2) เวลาในการย่อยสลายยกกำลังสอง (X_2^2) และอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์กับเวลาในการย่อยสลาย ($X_1 * X_2$) ก่อให้เกิดผลในทางลบเช่นเดียวกัน แต่อิทธิพลจากปัจจัยเหล่านี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

เมื่อนำสมการข้างต้นไปตรวจสอบความแม่นยำ โดยนำไปใช้ทำนายปริมาณของแอสตาแซนทินตามสภาวะต่างๆ ที่ได้จากการวางแผนการทดลอง จำนวน 17 สิ่งทดลอง เปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดลอง ได้ผลดังตารางที่ 4

จากนั้นนำสมการถดถอยที่ได้มาสร้างกราฟผลตอบแทนแบบโครงร่างพื้นผิว 3 มิติ (3D Response surface plot) ได้กราฟ ดังภาพที่ 1-3

ตารางที่ 4 ปริมาณแอสตาแซนทินที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนาย

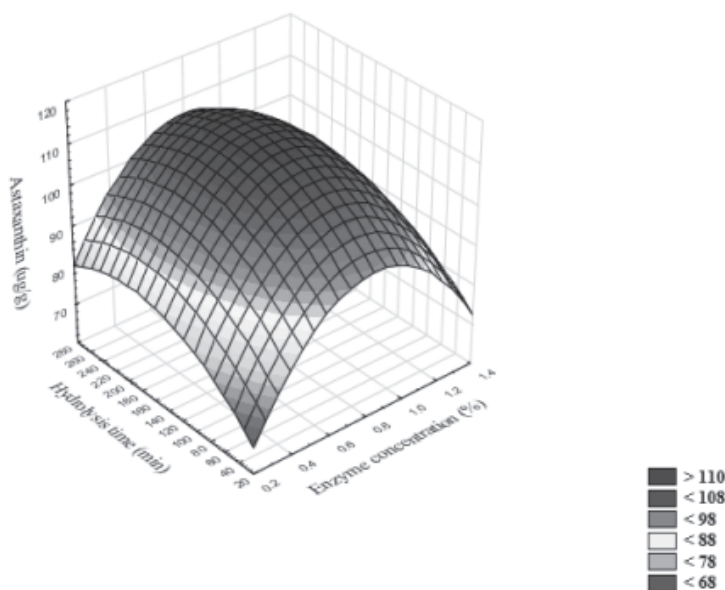
สิ่งทดลอง	ความเข้มข้นของเอนไซม์ (% ของหัวกุ้ง)	เวลาในการย่อยสลาย (นาทีก)	เวลาในการสกัด (นาทีก)	ค่าจากการ ทดลอง	ค่าจากการ ทำนาย
1	0.25	30	30	65.20	65.56
2	0.25	30	150	70.95	71.97
3	0.25	150	90	86.01	90.14
4	0.25	270	30	70.89	67.15
5	0.25	270	150	97.12	95.34
6	0.75	30	90	107.35	101.28
7	0.75	150	30	85.70	89.14
8	0.75	150	150	95.93	94.14
9	0.75	150	90	107.96	106.66
10	0.75	150	90	108.47	106.66
11	0.75	150	90	106.88	106.66
12	0.75	270	90	104.08	111.81
13	1.25	30	30	87.81	89.17
14	1.25	30	150	67.65	70.97
15	1.25	150	90	101.98	99.50
16	1.25	270	30	88.29	86.86
17	1.25	270	150	91.22	90.45

เมื่อหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่า สภาวะที่ทำให้ได้ปริมาณแอสตาแซนทินมากที่สุด คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.80% ของหัวกุ้ง เวลาในการย่อยสลายของเอนไซม์ 270 นาที และเวลาในการสกัด 105 นาที ซึ่งทำให้ได้ปริมาณแอสตาแซนทิน 112.96 $\mu\text{g/g}$ และจากการทวนสอบที่สภาวะดังกล่าว พบว่า แอสตาแซนทินที่สกัดได้มีปริมาณมากถึง 123.09 $\mu\text{g/g}$ ซึ่งคลาดเคลื่อนไปจากค่าที่สมการทำนาย 8.96% อย่างไรก็ตาม ค่าความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นนี้ยังอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ เนื่องจากมีค่าไม่เกิน 10% (Hu, 1999) และเมื่อพิจารณาจากปริมาณแอสตาแซนทินที่สกัดได้ พบว่า มีค่ามากกว่างานวิจัยของ Sachindra & Mahendrakar (2005) ที่สกัดแอสตาแซนทินจากเศษเหลือทิ้งของกุ้ง (*Penaeus indicus*) โดยใช้น้ำมันรำข้าวเพียงอย่างเดียว ซึ่งได้ผลผลิตเพียง $24.3 \pm 1.59 \mu\text{g/g}$ และมีค่ามากกว่างานวิจัยของ Pu et al. (2010) ที่สกัดแอสตาแซนทินจากเศษเหลือทิ้งของกุ้ง (*Litopenaeus setiferus*) ด้วยน้ำมันเมล็ดลินิน โดยได้ผลผลิตเท่ากับ $48.3 \mu\text{g/g}$ รวมทั้งมีค่ามากกว่า Sachindra & Mahendrakar (2011) ที่สกัดแอสตาแซนทินจากเศษเหลือทิ้งของกุ้ง (*Penaeus indicus*) โดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส ความเข้มข้น 0.75%

ของเศษเหลือทิ้ง ย่อยสลายโปรตีนเป็นเวลา 150 นาที แล้วจึงนำไปสกัดด้วยน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน 90 นาที ซึ่งได้ผลผลิต 29.38 $\mu\text{g/g}$

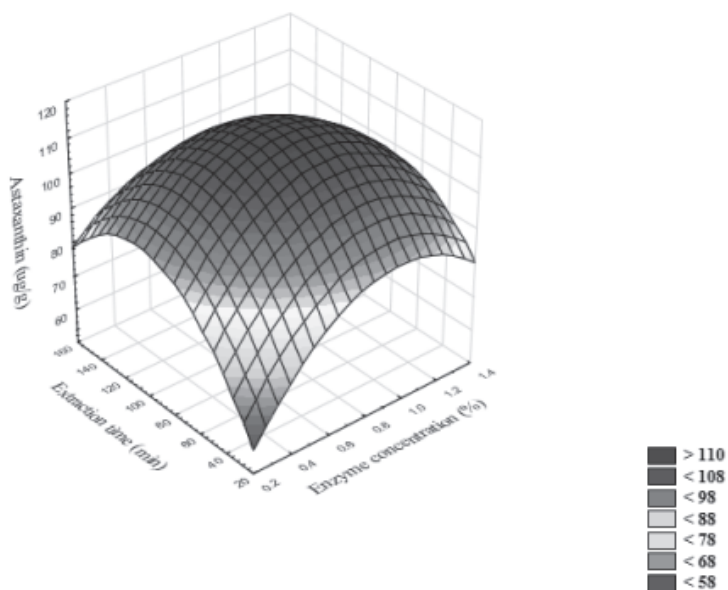
จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการนำหัวกุ้งไปย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ปาเปนก่อนนำไปสกัดด้วยน้ำมันรำข้าวช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดแอสตาแซนทิน เนื่องจากเอนไซม์ปาเปนไปสลายพันธะที่เกิดขึ้นระหว่างแอสตาแซนทินกับโปรตีนทำให้แอสตาแซนทินถูกไฮโดรไลซ์อยู่ในรูปที่เป็นอิสระและเมื่อนำไปสกัดด้วยน้ำมันรำข้าวจึงทำให้แอสตาแซนทินละลายในน้ำมันรำข้าวได้มากขึ้น (Chen & Meyers, 1982; Nelis et al., 1989; Higuera-Ciapara et al., 2006) ปริมาณแอสตาแซนทินที่เพิ่มขึ้นยังเกิดจากวัตถุดิบที่ใช้ในการสกัด โดย Sachindra et al. (2005a) พบว่า ส่วนของหัวกุ้งมีปริมาณแอสตาแซนทินมากที่สุด เท่ากับ 153.1 $\mu\text{g/g}$ ขณะที่ส่วนเปลือกและเนื้อกุ้ง มีปริมาณแอสตาแซนทิน เท่ากับ 104.7 และ 17.4 $\mu\text{g/g}$ ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อนำมาสกัดด้วยน้ำมันรำข้าวจึงทำให้ได้ปริมาณแอสตาแซนทินมากกว่างานวิจัยอื่นๆ ที่ใช้ทั้งส่วนหัวกุ้ง เปลือกกุ้ง และส่วนอื่นๆ ที่เป็นเศษเหลือทิ้งผสมกัน นอกจากนี้ น้ำมันรำข้าวที่ใช้สกัดก็มีส่วนช่วยชะลอการสลายตัวของแอสตาแซนทินในระหว่างกระบวนการสกัดเช่นกัน เนื่องจากน้ำมันรำข้าวมีสารต้านออกซิเดชันหลายชนิด เช่น โทโคเฟอรอล โทโคไตรอีนอล และแกมมา-โอโรซานอล (Moongngarm et al., 2012)

$$\text{Astaxanthin} = 40.6133 + 120.4477 \cdot x + 0.2395 \cdot y - 71.7893 \cdot x^2 - 0.017 \cdot x \cdot y - 0.0006 \cdot y^2$$



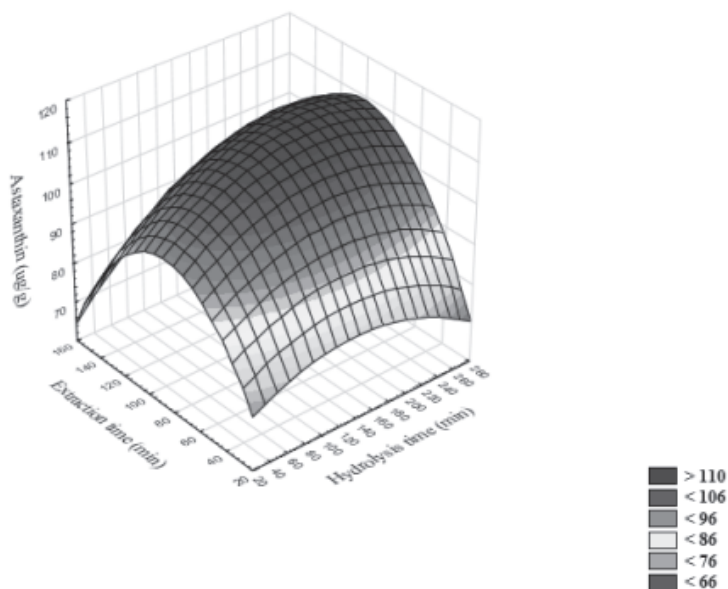
ภาพที่ 1 กราฟผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว 3 มิติ ที่พล็อตระหว่างปริมาณแอสตาแซนทิน (Y) ความเข้มข้นของเอนไซม์ (X_1) และเวลาในการย่อยสลาย (X_2)

$$\text{Astaxanthin} = 18.2288 + 110.759 \cdot x + 1.0614 \cdot y - 54.4308 \cdot x \cdot x - 0.2099 \cdot x \cdot y - 0.0048 \cdot y \cdot y$$



ภาพที่ 2 กราฟผลตอบแทนแบบโครงร่างพื้นผิว 3 มิติ ที่พล็อตระหว่างปริมาณแอสตาแซนทิน (Y) ความเข้มข้นของเอนไซม์ (X_1) และเวลาในการสกัด (X_3)

$$\text{Astaxanthin} = 54.4619 + 0.1291 \cdot x + 0.9392 \cdot y - 0.0005 \cdot x \cdot x + 0.0008 \cdot x \cdot y - 0.0057 \cdot y \cdot y$$



ภาพที่ 3 กราฟผลตอบแทนแบบโครงร่างพื้นผิว 3 มิติ ที่พล็อตระหว่างปริมาณแอสตาแซนทิน (Y) เวลาในการย่อยสลาย (X_2) และเวลาในการสกัด (X_3)

สรุปผลการทดลอง

สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากหัวกุ้งโดยใช้เอนไซม์ปาเปนร่วมกับน้ำมันรำข้าว คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.80% ของน้ำหนักหัวกุ้ง เวลาในการย่อยสลาย 270 นาที และเวลาในการสกัดด้วยน้ำมันรำข้าว 105 นาที โดยมีปริมาณแอสตาแซนทิน เท่ากับ 123.09 $\mu\text{g/g}$

เอกสารอ้างอิง

- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2556). *มูลค่าการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตรรายเดือน*. สืบค้นเมื่อ 21 มีนาคม 2556, สืบค้นจาก http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export.php
- Chakrabarti, R. (2002). Carotenoprotein from tropical brown shrimp shell waste by enzymatic process. *Food Biotechnology*, 16, 81-90.
- Chen, H.M., & Meyers, S.P. (1982). Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. *Journal of Food Science*, 47, 892-900.
- Chen, H.M., & Meyers, S.P. (1984). A rapid quantitative determination of astaxanthin pigment concentrate in oil extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61, 1045-1047.
- Duvernay, W.H., Assad, J.M., Sabliov, C.M., Lima, M., & Xu, Z. (2005). Microwave extraction of antioxidant components from rice bran. *Pharmaceutical Engineering*, 25, 126-130.
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., & Goycoolea, F.M. (2006). Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 185-196.
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., Goycoolea, F.M., & Arguelles-Monal, W. (2004). Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. *Carbohydrate Polymers*, 56, 41-45.
- Holanda, H.D., & Netto, F.M. (2006). Recovery of components from shrimp (*Litopenaeus setiferus*) processing waste by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Science*, 71, 298-303.
- Hu, R. (1999). *Food Product Design: A computer-aided Statistical Approach*. Boca Raton, Florida: CRC Press LLC.

- Hussein, G., Sankawa, U., Goto, H., Matsumoto, K., & Watanabe, H. (2006). Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of Natural Products*, 69, 443-449.
- Jyonouchi, H., Sun, S., Iijima, K., & Gross, M.D. (2000). Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action. *Nutrition and Cancer*, 36, 59-65.
- Kang, C.D., & Sim, S.J. (2008). Direct extraction of astaxanthin from *Haematococcus* culture using vegetable oils. *Biotechnology Letters*, 30, 441-444.
- Lloyd, B.J., Siebenmorgen, T.J., & Beers, K.W. (2000). Effects of commercial processing on antioxidants in rice bran. *Cereal Chemistry*, 77, 551-555.
- Miki, W. (1991). Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 63, 141-146.
- Moongngarma, A., Daomukdaa, N., & Khumpika, S. (2012). Chemical Compositions, Phytochemicals, and Antioxidant Capacity of Rice Bran, Rice Bran Layer, and Rice Germ. *APCBEE Procedia*, 2, 73-79.
- Nelis, H.J., Lavens, P., Moens, L., Sorgeloss, P., & De Leenheer, A.P. (1989). Carotenoids in relation to *Artemia* development. In T.H., MacRae, J.C., Bagslaw, & A.H., Warner (Eds.), *Biochemistry and Cell Biology of Artemia*. (pp. 159-190). Boca Raton, Florida: CRC Press LLC.
- Pu, J., Bechtel, P.J., & Sathivel, S. (2010). Extraction of shrimp astaxanthin with flaxseed oil: Effects on lipid oxidation and astaxanthin degradation rates. *Biosystems Engineering*, 107, 364-371.
- Sachindra, N. M., Bhaskar, N., & Mahendrakar, N. S. (2006). Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. *Waste Management*, 26, 1092-1098.
- Sachindra, N.M. (2003). *Studies on some crustaceans of tropical waters with special reference to pigments*. (Unpublished doctoral dissertation). University of Mysore, India.
- Sachindra, N.M., & Mahendrakar, N.S. (2005). Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. *Bioresource Technology*, 96, 1195-1200.

- Sachindra, N.M., & Mahendrakar, N.S. (2011). Effect of protease treatment on oil extractability of carotenoids from shrimp waste. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 20, 22-31.
- Sachindra, N.M., Bhaskar, N., & Mahendrakar, N.S. (2005a). Carotenoids in different body components of Indian shrimps. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 167-172.
- Sachindra, N.M., Bhaskar, N., & Mahendrakar, N.S. (2005b). Carotenoids in crabs from marine and fresh waters of India. *LWT-Food Science and Technology*, 38, 221-225.
- Sachindra, N.M., Bhaskar, N., Siddegowda, G.S., Sathisha, A.D., & Suresh, P.V. (2007). Recovery of carotenoids from ensilaged shrimp waste. *Bioresource Technology*, 98, 1642-1646.
- Sánchez-Camargo, A.P., Martínez-Correab, H.A., Paviania, L.C., & Cabral, F.A. (2011). Supercritical CO₂ extraction of lipids and astaxanthin from Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*). *Journal of Supercritical Fluids*, 56, 164-173.
- Simpson, B.K., & Haard, N.F. (1985). The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp wastes. *Journal of Applied Biochemistry*, 7, 212-222.
- Snodderly, D.M. (1995). Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62, S1448-S1461.
- ZMC. (2009). *Nutrition products for human use*. Retrieved 28 August, 2011 from http://www.zmc-usa.com/docs/ZMC_Product_Brochure.pdf

คณะผู้เขียน

นางสาวธรรมรัตน์ แสงหิรัญ

นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการพัฒนาลิขภัณฑ์
คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
e-mail: alp_modify@hotmail.com

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทัศน์ สุระวัง

อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการพัฒนาลิขภัณฑ์
คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
e-mail: suthat.s@cmu.ac.th