Published Online: 9 AUG 2022

การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากใบหมี่ด้วยการใช้เอนไซม์ช่วยสกัด
Enzyme Assisted Extraction of Polysaccharides from *Litsea glutinosa* Leaves

ศิริภัทร์ พลอยทับทิม
อีเมล: 6251701289@lamduan.mfu.ac.th
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ดร.ปัญญวัฒณ์ ปินตาทอง
อีเมล: punyawatt.pin@mfu.ac.th
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

หมี่ (*Litsea glutinosa* (Lour.) C. B. Rob. เป็นไม้ยืนต้นที่สามารถพบได้ทั่วภูมิภาคของไทย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพการสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์จากใบหมี่ด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ช่วยสกัดและประเมินคุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อประโยชน์ทางเครื่องสำอาง งานวิจัยนี้ได้ศึกษาประสิทธิภาพการสกัดของเอนไซม์และความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการสกัดภายใต้สภาวะเดียวกัน (พีเอช อุณหภูมิและระยะเวลาการสกัด) จากนั้นวิเคราะห์ร้อยละผลผลิต ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม ลักษณะทางกายภาพและเคมี ผลการศึกษาพบว่าการสกัดแบบวิธีการใช้เอนไซม์ช่วยสกัดให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงกว่าการสกัดแบบวิธีดั้งเดิม (การสกัดด้วยวิธีต้ม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มีลักษณะคล้ายคลึงกับสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยวิธีต้มทั้งทางกายภาพและเคมี ร้อยละผลผลิตสูงสุดมีค่าเท่ากับ ร้อยละ 9.25±0.51 เมื่อสกัดด้วยเอนไซม์ผสมทั้งสามชนิด (เซลลูเลส : เพกติเนส : ปาเปน) ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 60 ยูนิตเอนไซม์ต่อกรัม นอกจากนี้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมสูงสุดมีค่าเท่ากับ 452.26±0.13 มิลลิกรัมสมมูลกลูโคส/กรัมสารตัวอย่าง เมื่อสกัดด้วยเอนไซม์ผสมทั้งสามชนิด (เซลลูเลส : เพกติเนส : ปาเปน) ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 20 ยูนิตเอนไซม์ต่อกรัม ดังนั้นสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากใบหมี่สามารถประยุกต์ใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อปรับปรุงเนื้อของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ในอนาคต

คำสำคัญ: เซลลูเลส, เพกติเนส, ปาเปน, สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์, หมี่

Abstract

Litsea glutinosa (Lour.) C. B. Rob. is an evergreen or deciduous trees found throughout Thailand. This research was aimed to improve the efficiency of polysaccharides extraction from *L. glutinosa* leaves using enzyme-assisted extraction (EAE) method and to study physio-chemical characteristics of polysaccharides extract for application as cosmetic ingredients. The experiment was carried out under the same conditions (pH, extraction time and liquid-solid ratio), whereas type of enzymes and enzyme unit were varied. Extraction yield, total carbohydrates content, and physio-chemical properties were determined. In comparison to the conventional extraction method (hot water extraction; HWE), the EAE method showed greater efficiency and significant difference ($p<0.05$) in yield and polysaccharide content. Furthermore, the physio-chemical properties of both methods were similar. The maximum yield (9.25±0.51%) was obtained by extracting with enzyme cocktail at 60 U/g, while the highest total carbohydrates content (452.26±0.13 mg GE/g extract) was obtained by extracting with enzyme cocktail at 20 U/g. In conclusion, the *L. glutinosa* polysaccharides could be interesting for being used as a sensory modifying ingredient in cosmetic products.

Keywords: Cellulase, *Litsea glutinosa*, Papain, Pectinase, Polysaccharides

บทนำ/หลักการและเหตุผล

หมี่ หรือ *Litsea glutinosa* (Lour.) C. B. Rob. เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางที่พบได้ทั่วไปบริเวณทวีปเอเชียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Ramana & Raju, 2017) และทั่วภูมิภาคของไทย โดยนิยมนำใบหมี่มารับประทานลดอาการปวดท้อง หรือนำมาต้มร้อนเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์ชำระล้างเส้นผม เนื่องจากมีฤทธิ์เป็นสารชำระล้างตามธรรมชาติ สามารถเกิดฟองได้ดี (ณฐพัชร์ เหล่าอาภาสุวงศ์, 2557) นอกจากนี้มีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับคุณสมบัติของสารเมือกในใบหมี่พบว่ามีประสิทธิภาพในการทำความสะอาดและกระตุ้นการเจริญของเส้นผม (Sitthithaworn et al., 2018) และสามารถลดการหลุดร่วงของเส้นผมได้อย่างมีนัยสำคัญ (ณฐพัชร์ เหล่าอาภาสุวงศ์, 2557) จากคุณสมบัติดังกล่าวส่งผลให้มีการนำสารเมือกของใบหมี่ไปประยุกต์ใช้ในกลุ่มผลิตภัณฑ์ดูแลและทำความสะอาดเส้นผมอย่างแพร่หลาย (Das et al., 2013; Herath et al., 1990)

กระบวนการสกัดเป็นขั้นตอนสำคัญต่อการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ออกจากวัตถุดิบ (Salomon et al., 2014) ซึ่งปัจจุบันมีการศึกษาและพัฒนาวิธีการสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่หลากหลาย เช่น การสกัดโดยใช้เอนไซม์ช่วยสกัด ซึ่งเป็นวิธีการนำเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยองค์ประกอบและสารสำคัญออกจากพืชที่ศึกษา เพื่อให้ได้ปริมาณสารสำคัญและผลผลิตสูงขึ้น โดยวิธีการสกัดด้วยเอนไซม์เป็นกระบวนการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม สามารถนำมาใช้ซ้ำ ลดปริมาณตัวทำละลายเคมีที่ใช้ในการสกัด ดำเนินการโดยใช้พลังงานและอุณหภูมิต่ำใช้ระยะเวลาการสกัดที่สั้น ส่งผลให้การสกัดมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น (Zhao et al., 2016)

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิธีการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากวิธีการสกัดด้วยเอนไซม์ต่างชนิด เพื่อเปรียบเทียบสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากใบหมี่ที่ได้จากการสกัดแบบดั้งเดิม คือ การสกัดด้วยวิธีต้ม (hot water extraction method) พร้อมศึกษาประเมินคุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในผลิตภัณฑ์สำหรับดูแลผิวกาย

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากใบหมี่ด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัด
2. เพื่อประเมินคุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากใบหมี่เพื่อประโยชน์ทางเครื่องสำอาง

ขอบเขตการวิจัย

1. สกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์จากใบหมี่ด้วยวิธีการสกัดต่าง ๆ คือ สกัดด้วยวิธีการต้มร้อนและสกัดด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัด
2. ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการต่าง ๆ
3. วิเคราะห์ปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการต่าง ๆ
4. วิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี phenol-sulfuric method

ทบทวนวรรณกรรม

หมี่ มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ คือ *Litsea glutinosa* (Lour.) C. B. Rob. จัดอยู่ในวงศ์ LAURACEAE มีลักษณะเป็นไม้ยืนต้น สูง 5-15 เมตร (วรางคณา จินตพัฒนากิจ และสาวิตรี อัมภา, 2551) ใบหมี่ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหย β-ocimene และ caryophyllene เป็นองค์ประกอบหลัก (Hien et al., 2010) มีองค์ประกอบของสารกลุ่มอัลคาลอยด์และฟลาโวนอยด์หลายชนิด เช่น

boldine, laurolitsine (Yang et al., 2005), kaempferol 7-glucoside, kaempferol-O-β-D-glucopyranoside (Mohan & Pathak, 1975) เป็นต้น สารเมือกในใบหมี่มีประสิทธิภาพในการทำความสะอาดและกระตุ้นการเจริญของเส้นผม (Sitthithaworn et al., 2018) และสามารถลดการหลุดร่วงของเส้นผมได้อย่างมีนัยสำคัญ (ณฐพัชร์ เหล่าอาภาสุวงศ์, 2557)

การสกัดด้วยการใช้เอนไซม์ช่วยสกัด (enzyme-assisted extraction) คือ การสกัดสารโดยใช้เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยองค์ประกอบและสารสำคัญออกจากพืชที่ศึกษาเพื่อให้ได้ปริมาณสารสำคัญและผลผลิตสูงขึ้น โดยเอนไซม์ที่นิยมนำมาสกัด ได้แก่ เซลลูเลส (cellulase) เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) และเพกติเนส (pectinase) เป็นต้น การสกัดด้วยเอนไซม์นิยมใช้ร่วมกับการสกัดด้วยวิธีทางเคมี เนื่องจากสามารถช่วยย่อยส่วนประกอบของพืชได้เบื้องต้นก่อนจะนำมาสกัดด้วยวิธีทั่วไป ซึ่งแหล่งที่มาของเอนไซม์สามารถมาจากแบคทีเรีย เชื้อรา อวัยวะจากสัตว์ และสารสกัดจากผักหรือผลไม้ เป็นต้น (Puri et al., 2012) โดยทั่วไปสภาวะพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์เซลลูเลส คือ 4.0-6.0 และ 40-50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Song et al., 2020) สำหรับเอนไซม์เพกติเนส สภาวะพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 3.0-5.0 และ 10-55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Song et al., 2020) และสภาวะพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมของของเอนไซม์ปาเปนอยู่ในช่วง 5.0-8.0 และ 50-57 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Singh et al., 2019)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างใบหมี่

เตรียมตัวอย่างใบหมี่ โดยทำความสะอาดใบหมี่ด้วยน้ำสะอาด ซับให้แห้ง หั่นเป็นชิ้นเล็กขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร นำไปอบที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ บดละเอียดเพื่อเตรียมนำไปสกัดในขั้นตอนต่อไป

2. การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากใบหมี่

1) การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากใบหมี่ด้วยวิธีการต้ม

นำตัวอย่างใบหมี่ที่เตรียมไว้มาสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1 : 50 (น้ำหนัก/ปริมาตร) สกัดด้วยวิธีต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองตัวอย่างด้วยผ้าขาวบาง นำสาระลายไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนใสที่ได้ไปตกตะกอนด้วยเอทานอล 95% ที่อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1 : 5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) นำตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนที่ได้

ไปอบแห้งที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ บดเป็นผงละเอียด ชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาปริมาณร้อยละของผลผลิตและนำไปวิเคราะห์ขั้นตอนต่อไป

2) การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากใบหมี่ด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ช่วยสกัด

นำตัวอย่างใบหมี่ที่เตรียมไว้มาสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1 : 50 (น้ำหนัก/ปริมาตร) สกัดด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ คือ เซลลูเลส, เพกติเนส, ปาเปน และเอนไซม์ผสมทั้งสามชนิด (เซลลูเลส : เพกติเนส : ปาเปน ที่อัตราส่วนยูนิตเอนไซม์เป็น 1 : 1 : 1) กำหนดให้พีเอช อุณหภูมิและระยะเวลาของการสกัดมีค่าคงที่ คือ 5, 50 องศาเซลเซียส และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำไปศึกษาที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ ได้แก่ 20, 40, และ 60 ยูนิตเอนไซม์/กรัม ตามลำดับเมื่อครบระยะเวลาสกัดจึงนำสารละลายตัวอย่างไปต้มร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ กรองตัวอย่างด้วยผ้าขาวบาง นำสาระลายไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนใสที่ได้ไปตกตะกอนด้วยเอทานอล 95% ที่อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1 : 5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) นำตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนที่ได้ไปอบแห้งที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ บดเป็นผงละเอียด ชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาปริมาณร้อยละของผลผลิต และนำไปวิเคราะห์ขั้นตอนต่อไป

3. ทดสอบคุณสมบัติทางเคมีกายของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากใบหมี่

นำตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์จากใบหมี่มาทดสอบลักษณะทางกายภาพด้วยตาเปล่า ทดสอบกลิ่นผ่านการดม วัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH meter

4. ศึกษาปริมาณรวมพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี phenol-sulfuric method

นำสารละลายไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟสารมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.001–0.01 มิลลิกรัม/ และรายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลกลูโคส/กรัมสารตัวอย่าง

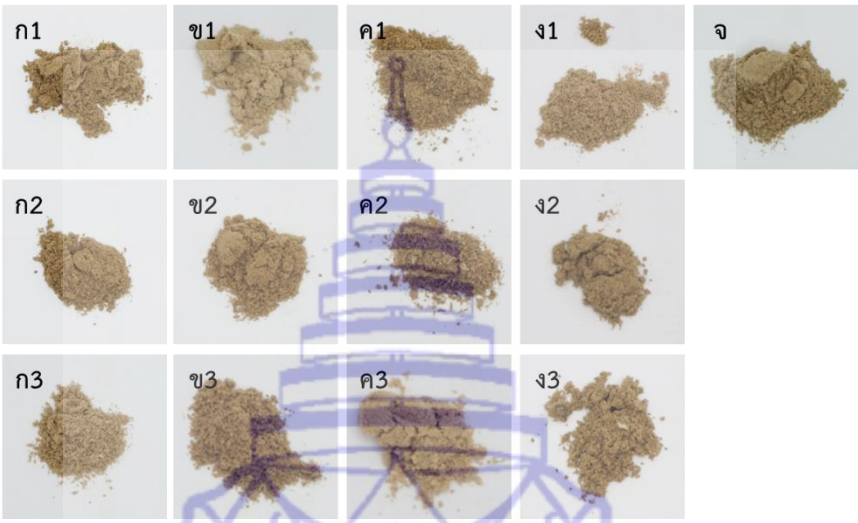
5. การวิเคราะห์ด้วยสถิติ

วิเคราะห์ผ่านโปรแกรม SPSS เวอร์ชั่นที่ 21 โปรแกรมคำนวณทางสถิติจากบริษัท IBM วิเคราะห์โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one way ANOVA) และทดสอบความแตกต่างระหว่างคู่โดยวิธี Turkey’s test ซึ่งกำหนดค่า p-values น้อยกว่า 0.05 ($p<0.05$) ถือว่าการศึกษามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลวิจัยและอภิปราย

1. ลักษณะทางเคมีกายภาพของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากใบหมี่

สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มีลักษณะปรากฏคล้ายคลึงกัน คือ มีลักษณะเป็นผงละเอียด สีน้ำตาลอ่อนจนถึงเข้ม มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว (ภาพที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบค่าพีเอชของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีต้มพบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน ค่าพีเอชของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากการสกัดด้วยวิธีต้ม มีค่าเท่ากับ 6.79±0.01 ขณะที่ค่าพีเอชของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ มีค่าอยู่ในช่วง 6.78±0.01, 6.79±0.01, 6.79±0.02 และ 6.80±0.03 ตามลำดับ



หมายเหตุ (ภาพ ก1–ก3) สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากการสกัดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส
(ภาพ ข1-ข3) สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากการสกัดด้วยเอนไซม์เพกติเนส
(ภาพ ค1-ค3) สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากการสกัดด้วยเอนไซม์ปาเปน
(ภาพ ง1-ง3) สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากการสกัดด้วยเอนไซม์ผสม
(ภาพ จ) สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากวิธีต้ม

ภาพที่ 1 ลักษณะสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากใบหมี่จากการสกัดด้วยวิธีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นยูนิตเอนไซม์ 20 ยูนิต/กรัม, 40 ยูนิต/กรัม และ 60 ยูนิต/กรัม ตามลำดับ

2. ร้อยละผลผลิตของการสกัด

ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 1 พบว่าปริมาณร้อยละผลผลิตสูงสุดเมื่อสกัดด้วยเอนไซม์ผสมที่ความเข้มข้น 60 ยูนิตเอนไซม์/กรัม มีค่าเท่ากับ ร้อยละ 9.25±0.51 ขณะที่ปริมาณร้อยละผลผลิตต่ำสุด มีค่าเท่ากับ ร้อยละ 2.69±0.93 เมื่อสกัดด้วยเอนไซม์เพกติเนสที่ความเข้มข้น 20 ยูนิตเอนไซม์/กรัม

1) ศึกษาการสกัดด้วยเอนไซม์ต่างความเข้มข้น

เมื่อสกัดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าปริมาณร้อยละผลผลิตสูงกว่าการสกัดด้วยวิธีต้มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากการศึกษาเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ปริมาณร้อยละผลผลิตกลับมีค่าลดลงตามลำดับ เอนไซม์เซลลูเลสมีคุณสมบัติในการย่อยเส้นใยและผนังเซลล์พืช โดยตัดพันธะ β-1,4-D-glycosidic ในเซลลูโลส เอนไซม์เซลลูเลสนิยมนำมาสกัดสารสำคัญบริเวณใบหรือเหง้าของพืช (วีรภัทร วิโนทพรรษ์, 2557)

เมื่อสกัดด้วยเอนไซม์เพกติเนส พบว่าร้อยละผลผลิตที่ได้ให้ผลไม่ต่างจากการสกัดด้วยวิธีต้ม นอกจากนี้เมื่อความเข้มข้นของการศึกษาเพิ่มสูงกว่า 40 ยูนิตเอนไซม์/กรัม ปริมาณร้อยละผลผลิตกลับมีค่าลดลง เอนไซม์เพกติเนสมีคุณสมบัติในการย่อยเพกตินที่อยู่ใน middle lamella ผ่านการตัดพันธะ α-1,4-D-galacturonic acid ของเพกติน เอนไซม์เพกติเนสนิยมนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ช่วยสกัดสารสำคัญในผลของพืชเป็นส่วนใหญ่ และสามารถพบเพกตินได้มากในบริเวณส่วนใบของผักตระกูล *Brassica* (Hasnain & Nayak, 2019)

ผลการสกัดด้วยเอนไซม์ปาเปน พบว่าการสกัดด้วยเอนไซม์ปาเปนให้ปริมาณร้อยละผลผลิตสูงกว่าการสกัดด้วยวิธีต้มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นปริมาณร้อยละผลผลิตมีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับ เอนไซม์ปาเปนมีคุณสมบัติในการย่อยโมเลกุลโปรตีนให้เล็กลง ประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่หลากหลาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยาและอุตสาหกรรมฟอก เป็นต้น (Fernández-Lucas et al., 2017)

ผลการศึกษาการสกัดด้วยเอนไซม์ผสมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าให้ผลเช่นเดียวกับการสกัดด้วยเอนไซม์ปาเปน การใช้เอนไซม์ผสมในการช่วยสกัด (เอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วยเอนไซม์ชนิดอื่น เช่น ปาเปน เพกติเนส หรือ โปรเตส เป็นต้น) ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดเนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติเฉพาะช่วยย่อยพันธะต่าง ๆ ระหว่างเซลลูโลส เพกติน โปรตีนและโมเลกุลอื่นภายในผนังเซลล์พืชได้ (Chen et al, 2013)

ความเข้มข้นของเอนไซม์เป็นหนึ่งปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการสกัด เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์สูงขึ้นประสิทธิภาพการเข้าทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และซับสเตรทเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามหากความเข้มข้นมากเกินพอจนเกิดการอิ่มตัว ส่งผลให้โมเลกุลของเอนไซม์บางโมเลกุลมีโอกาสเข้าทำปฏิกิริยาต่อซับสเตรทลดลง ประสิทธิภาพการย่อยลดลง (Li et al., 2019)

2) ศึกษาการสกัดด้วยเอนไซม์ต่างชนิดที่ความเข้มข้นเดียวกัน

พบว่าแต่ละความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ศึกษาต่างให้ปริมาณร้อยละผลผลิตสูงกว่าวิธีการต้มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยของ Li et al. (2019) ที่ศึกษาการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Auricularia auricula-judae, A. polytricha* และ *A. delicate* ด้วยวิธีสกัด 3 วิธี คือ วิธีต้ม วิธีสกัดด้วยการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมด้วย และวิธีการสกัด

ด้วยการใช้เอนไซม์ช่วยสกัด จากการศึกษาพบว่าเมื่อสกัด *Auricularia auricula-judae* ด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ให้ปริมาณร้อยละผลผลิตสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบชนิดของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการสกัดที่แต่ละความเข้มข้น พบว่าให้ผลไม่ต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากการศึกษาสรุปได้ว่านอกเหนือจากชนิดของเอนไซม์และความเข้มข้นที่ใช้สกัด ควรพิจารณาถึงปัจจัยอื่นที่สามารถส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ร่วมด้วย คือ อุณหภูมิ, พีเอช, ระยะเวลาการสกัด และอัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดสามารถทำงานได้ดีในสภาวะพีเอชและอุณหภูมิต่างกัน (Chen et al, 2013)

ตารางที่ 1 ร้อยละผลผลิตของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากใบหมี่จากเอนไซม์ที่ยูนิตเอนไซม์ต่างกัน

วิธีการสกัด	**ปริมาณร้อยละผลผลิต**		
	20 ยูนิต/กรัม	**40 ยูนิต/กรัม**	**60 ยูนิต/กรัม**
เซลลูเลส	7.56 ± 0.82^{aA}	7.03 ± 0.20^{aA}	4.18 ± 0.53^{bB}
เพกติเนส	2.69 ± 0.93^{cB}	5.44 ± 0.87^{bA}	3.58 ± 0.94^{bAB}
ปาเปน	5.82 ± 0.36^{abB}	6.04 ± 0.59^{abB}	9.11 ± 0.43^{aA}
เอนไซม์ผสมทั้งสามชนิด*	5.36 ± 0.48^{bC}	7.07 ± 0.48^{aB}	9.25 ± 0.51^{aA}

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก แสดงถึง ความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในสดมภ์เดียวกัน

อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ แสดงถึง ความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในแถวเดียวกัน

เครื่องหมายดอกจัน แสดงถึง ความเข้มข้นรวมของเอนไซม์ผสมทั้งสามชนิดมีค่าเป็น 3 เท่าของความเข้มข้นที่ศึกษา

3. ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดจากใบหมี่

ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมวิเคราะห์ด้วยวิธี phenol-sulfuric acid แสดงดังตารางที่ 2

1) ศึกษาการสกัดด้วยเอนไซม์ต่างความเข้มข้น

ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมสูงสุด มีค่าเท่ากับ 452.26±0.13 มิลลิกรัมสมมูลกลูโคส/กรัมสารตัวอย่าง เมื่อสกัดด้วยเอนไซม์ผสมทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้น 20 ยูนิตเอนไซม์/กรัม ขณะที่ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมต่ำสุด มีค่าเท่ากับ 182.14±0.06 มิลลิกรัมสมมูลกลูโคส/กรัมสารตัวอย่าง เมื่อสกัดด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ความเข้มข้น 20 ยูนิตเอนไซม์/กรัม

เมื่อสกัดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าวิธีการสกัดด้วยเอนไซม์เซลลูเลสให้ผลสูงกว่าการสกัดด้วยวิธีต้มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เว้นการสกัดที่ความเข้มข้น 20 ยูนิตเอนไซม์/กรัมให้ผลต่ำกว่าวิธีการสกัดด้วยวิธีต้มอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) นอกจากนี้พบว่าเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมมีค่าสูงขึ้นตามลำดับ จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น เอนไซม์เซลลูเลสสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับซับสเตรทได้มากขึ้น โดยให้ผลผลิตเป็นเซลโลบิโอสและกลูโคสในที่สุด (Jayasekara & Ratnayake, 2019)

เมื่อสกัดด้วยเอนไซม์เพกติเนส พบว่าให้ผลการศึกษาในเชิงเดียวกันกับการสกัดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส นอกจากนี้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมที่ได้จากการสกัดด้วยเอนไซม์เพกติเนสมีค่าสูงกว่าการสกัดด้วยวิธีต้มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เว้นแต่การสกัดที่ความเข้มข้น 20 ยูนิตเอนไซม์/กรัม ที่ให้ผลการสกัดต่ำกว่าวิธีต้มอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันกับการสกัดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส สรุปได้ว่าเมื่อเอนไซม์เพกติเนสสูงขึ้น เอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยาย่อยเพกตินที่อยู่ในผนังเซลล์ของเนื้อเยื่อพืชได้มากยิ่งขึ้น โดยให้ผลผลิตเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กรดกาแล็กทูโรนิก เป็นต้น (Verma et al., 2018)

ผลการสกัดด้วยเอนไซม์ปาเปน พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นที่ 40 ยูนิตเอนไซม์/กรัม ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมที่ได้มีค่าลดลงและมีผลต่ำกว่าการสกัดด้วยวิธีต้มอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) สาเหตุอาจเนื่องมากจากความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มากเกินพอ ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการสกัดลดลง (Li et al., 2019) แต่เมื่อความเข้มข้นเพิ่มสูงกว่า 40 ยูนิตเอนไซม์/กรัม ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมกลับมีค่าเพิ่มขึ้น โดยผลที่วิเคราะห์ได้อาจมีความคลาดเคลื่อนเนื่องจากตัวอย่างอาจมีองค์ประกอบของโปรตีนหรือสารประกอบเชิงซ้อนอื่นเจือปน (Chen et al., 2016)

เมื่อสกัดด้วยเอนไซม์ผสม พบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น เมื่อพิจารณาผลการศึกษาระหว่างการสกัดด้วยเอนไซม์ผสมทั้งสามชนิดและวิธีการต้ม พบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมที่ได้จากการสกัดด้วยเอนไซม์ผสมมีค่าสูงกว่าการสกัดด้วยวิธีต้มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับสาเหตุของปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมลดลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น อาจมีสาเหตุคล้ายคลึงกับการสกัดด้วยเอนไซม์ปาเปน เนื่องจากเอนไซม์ที่มากเกินพอ ส่งผลโมเลกุลของเอนไซม์มีโอกาสเข้าทำปฏิกิริยากับซับสเตรทได้น้อยลง (Li et al., 2019)

2) ศึกษาการสกัดด้วยเอนไซม์ต่างชนิดที่ความเข้มข้นเดียวกัน

ผลการศึกษาของแต่ละความเข้มข้น พบว่าที่แต่ละความเข้มข้น เอนไซม์แต่ละชนิดให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 2 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากใบหมี่ด้วยวิธีการสกัดแบบต่าง ๆ ที่ระดับยูนิตของเอนไซม์แตกต่างกัน

วิธีการสกัด	ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม (มก. กลูโคสสมมูล/กรัม)		
	20 ยูนิต/กรัม	40 ยูนิต/กรัม	60 ยูนิต/กรัม
เซลลูเลส	182.32 ± 0.28^{dC}	286.24 ± 0.21^{aB}	326.81 ± 0.16^{cA}
เพกติเนส	228.13 ± 0.34^{cC}	250.26 ± 0.34^{cB}	434.07 ± 0.16^{aA}
ปาเปน	416.27 ± 0.32^{bA}	230.93 ± 0.28^{dC}	368.41 ± 0.12^{bB}
เอนไซม์ผสมทั้งสามชนิด*	452.26 ± 0.12^{aA}	285.29 ± 0.28^{bB}	268.59 ± 0.11^{dC}

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก แสดงถึง ความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในสดมภ์เดียวกัน

อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ แสดงถึง ความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในแถวเดียวกัน

เครื่องหมายดอกจัน แสดงถึง ความเข้มข้นรวมของเอนไซม์ผสมทั้งสามชนิดมีค่าเป็น 3 เท่าของความเข้มข้นที่ศึกษา

การสกัดด้วยการใช้เอนไซม์แสดงประสิทธิภาพการสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์จากใบหมี่สูงกว่าวิธีการสกัดด้วยวิธีต้มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มีลักษณะคล้ายคลึงกับวิธีต้มทั้งทางกายภาพและเคมี ปริมาณร้อยละผลผลิตสูงสุดและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมสูงสุดได้จากสกัดด้วยเอนไซม์ผสมทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้น 60 ยูนิตเอนไซม์/กรัม และ 20 ยูนิตเอนไซม์/กรัม ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาครั้งต่อไปควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ เช่น พีเอช, อุณหภูมิ, เวลา และอัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย เพื่อประสิทธิภาพการสกัดของเอนไซม์สูงสุด

2. การวิเคราะห์ด้วยวิธี phenol-sulfuric method แสดงถึงปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์โดยเบื้องต้น หากต้องการวิเคราะห์สารสำคัญควรวิเคราะห์ด้วย HPLC เพิ่มเติม

รายการอ้างอิง

ณฐพัชร์ เหล่าอาภาสุวงศ์. (2557). *ประสิทธิผลของสารสกัดใบหมี่ต่อการบำรุงผม เพื่อการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์สำหรับเส้นผม* (การค้นคว้าอิสระปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

วรางคณา จินตพัฒนากิจ และสาวิตรี อัมภา. (2551). *การพัฒนาสูตรตำรับแชมพูป้องกันผมร่วงจากใบหมี่* (ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต). มหาวิทยาลัยมหิดล.

วีรภัทร วิโนทพรรษ์. (2557). การประยุกต์ใช้เอนไซม์ในรูปอิสระและรูปตรึงสำหรับการสกัดสารธรรมชาติจากพืช. *Thai Bulletin of Pharmaceutical Sciences*, *9*(1), 57-70.

Chen, J., Lai, P., Shen, H., Zhen, H., & Fang, R. (2013). Effect of extraction methods on polysaccharide of *Clitocybe maxima* stipe. *Adv J Food Sci Technol*, *5*(3), 370-373.

Chen, Y., Yao, F., Ming, K., Wang, D., Hu, Y., & Liu, J. (2016). Polysaccharides from traditional Chinese medicines: extraction, purification, modification, and biological activity. *Molecules*, *21*(12), 1705.

Das, D., Maiti, S., Maiti, T. K., & Islam, S. S. (2013). A new arabinoxylan from green leaves of *Litsea glutinosa* (Lauraeae): Structural and biological studies. *Carbohydrate Polymers*, *92*(2), 1243-1248.

Fernández-Lucas, J., Castañeda, D., & Hormigo, D. (2017). New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, *68*, 91-101. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.017

Hasnain, M. S., & Nayak, A. K. (2019). Polysaccharides from leafy vegetables: Chemical, nutritional and medicinal. In *Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications* (p.575). Elsevier Science.

Herath, H., Kumar, N. S., & Wimalasiri, K. S. (1990). Structural studies of an arabinoxylan isolated from *Litsea glutinosa* (Lauraceae). *Carbohydrate Research*, *198*(2), 343-351.

Hien, N. T., Thang, T. D., & Thai, T. H. (2010). Chemical composition of the leaf oil of *Litsea glutinosa* (Lour.) CB Rob. from Ha Tinh province. *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, *26*(3), 161-164.

Jayasekara, S., & Ratnayake, R. (2019). Microbial Cellulases: An Overview and Applications. In A. R. Pascual, & M. E. E. Martín (Eds.), *Cellulose* (p.87). IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.84531

Li, L., Yang, X., Pan, L., Su, Y., & Wang, Y. (2019). Comparing three methods of extraction of *Auricularia auricula* polysaccharides. *Current Topics in Nutraceutical Research*, *17*(1), 7-11.

Mohan, H., & Pathak, H. (1975). Flavonoids from the leaves of *Litsea glutinosa*. *Natural and Applied Science Bulletin*, *27*(3), 95-99

Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, *30*(1), 37-44.

Ramana, K. V., & Raju, A. S. (2017). Traditional and commercial uses of *Litsea glutinosa* (Lour.) CB Robinson (Lauraceae). *Journal of Medicinal Plants Studies*, *5*(3), 89-91.

Salomon, S., Sevilla, I., Betancourt, R., Romero, A., Nuevas-Paz, L., & Acosta-Esquijarosa, J. (2014). Extraction of mangiferin from *Mangifera indica* L. leaves using microwave-assisted technique. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, *26*(7), 616-622.

Singh, P. K., Shrivastava, N., & Ojha, B. (2019). Enzymes in the meat industry. In *Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 111-128). Elsevier.

Sitthithaworn, W., Khongkaw, M., Wiranidchapong, C., & Koobkokkruad, T. (2018). Mucilage powder from *Litsea glutinosa* leaves stimulates the growth of cultured human hair follicles. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, *40*(5), 1076-1080.

Verma, H., Narnoliya, L. K., & Jadaun, J. S. (2018). Pectinase: A useful tool in fruit processing industries. *Nutr Food Sci Int J*, *5*(5), 555673.

Yang, J. H., Li, L., Wang, Y. S., Zhao, J. F., Zhang, H. B., & Luo, S. D. (2005). Two new aporphine alkaloids from *Litsea glutinosa*. *Helvetica Chimica Acta*, *88*(9), 2523-2526.

Zhao, Y. M., Song, J. H., Wang, J., Yang, J. M., Wang, Z. B., & Liu, Y. H. (2016). Optimization of cellulase-assisted extraction process and antioxidant activities of polysaccharides from *Tricholoma mongolicum* Imai. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*(13), 4484-4491.

Zhu, Y., Li, Q., Mao, G., Zou, Y., Feng, W., Zheng, D., . . . Wu, X. (2014). Optimization of enzyme-assisted extraction and characterization of polysaccharides from *Hericium erinaceus*. *Carbohydrate Polymers*, *101*, 606-613. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.099