

การเตรียมสารสกัดเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเปลือกมะนาวด้วยวิธีการทางเอนไซม์

Preparation of Pecto-oligosaccharide Extracts from Lime Peels

Using Enzymatic Method

ภทราธิษฐ์ ลิขิตพัฒนานุกุล

อีเมล: 6451701280@lamduan.mfu.ac.th

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัญญาวัฒน์ ปินตาทอง

อีเมล: punyawatt.pin@mfu.ac.th

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

เปลือกมะนาว เป็นวัสดุเศษเหลือที่มีเพกตินเป็นองค์ประกอบสำคัญ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเพกตินในเปลือกมะนาวด้วยวิธีเอนไซม์และประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการสกัด โดยทำการสกัดเพกตินจากเปลือกมะนาว จากนั้นนำเพกตินที่สกัดได้มาย่อยด้วยเอนไซม์เพกตินเนสในช่วงเวลา 30, 60, 120, 180 และ 240 นาที ทำการวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (TLC) จากนั้นทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) ผลการศึกษา พบว่าเพกตินจากเปลือกมะนาวจัดอยู่ในกลุ่ม low-methoxy pectin (LMP) และเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการย่อยเพกตินด้วยเอนไซม์เพกตินเนสในแต่ละเวลามีขนาดใกล้เคียงกัน นอกจากนี้การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการย่อย พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเพกติน ดังนั้นเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเปลือกมะนาวที่เตรียมด้วยกระบวนการทางเอนไซม์ ช่วยเพิ่มมูลค่าวัสดุเศษเหลืออย่างเปลือกมะนาว และสามารถนำไปต่อยอดหรือพัฒนาเป็นวัตถุดิบทางเครื่องสำอางได้

คำสำคัญ: มะนาว, วัสดุเศษเหลือ, เพกติน, เพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์, กระบวนการย่อยทางเอนไซม์, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

Lime peels are an agricultural waste containing pectin as a main component. This study aimed to prepare pectooligosaccharide (POS) from the lime peel pectin using an enzymatic method and evaluate the antioxidant capacity of the extracted POS. The pectin was extracted from lime peel and hydrolyzed using pectinase at 30, 60, 120, 180, and 240 minutes. The products were analyzed using Thin-Layer Chromatography (TLC), and antioxidant capacity was assessed using Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay. The results showed that the extracted pectin from lime peel is classified as low-methoxy pectin (LMP). The POS obtained from different enzymatic hydrolysis times had similar pattern detected by TLC. Moreover, the POS exhibited higher antioxidant capacity than the original pectin. Therefore, POS derived from lime peels prepared by an enzymatic process could add value to lime peels and can be further applied as raw materials in cosmetics.

Keywords: Lime, Wastes, Pectin, Pectooligosaccharide, Enzymatic Hydrolysis, Antioxidant Capacity

บทนำ/หลักการและเหตุผล (Introduction)

มะนาวเป็นผลไม้ตระกูลส้มที่พบได้มากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย โดยทุกส่วนของผลมะนาวสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ ไม่ว่าจะเป็นน้ำมะนาวที่นิยมใช้ในการประกอบอาหาร เปลือกที่มีกลิ่นหอมซึ่งใช้เป็นสารแต่งกลิ่น หรือเมล็ดที่มีศักยภาพทางชีวภาพ อย่างไรก็ตาม ในกระบวนการผลิตน้ำมะนาวในระดับอุตสาหกรรม มักมีการคัดทิ้งส่วนเปลือกและเมล็ดในปริมาณมาก แม้ว่าเปลือกมะนาวจะมีองค์ประกอบของสารที่มีคุณค่า เช่น เพกติน พอลิฟีนอล น้ำมันหอมระเหย และเส้นใย (Narang & Jiraungkoorskul, 2016) ซึ่งเป็นสารที่สามารถนำมาใช้ในอาหาร เครื่องสำอาง และอาหารสัตว์ได้ โดยเพกติน จัดเป็นสารในกลุ่มเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบมากในเปลือกผลไม้ เช่น ส้มและเลมอน มีคุณสมบัติหลักเป็นเพิ่มความหนืดหรือก่อเจล (Freitas et al, 2021) เมื่อย่อยสลายจะได้สารเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ที่มีด้านอนุมูลอิสระ และพรีไบโอติกส์ (Yeung et al, 2021) ซึ่งการเตรียมสารเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถทำได้หลายวิธี โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ถือเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับเปลือกมะนาว เนื่องจากสามารถรักษาสารสำคัญไว้ได้โดยไม่

เกิดสารปนเปื้อน จากเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากเปลือกมะนาวด้วยวิธีทางเอนไซม์ เพื่อเพิ่มมูลค่าให้ของเหลือทิ้ง และต่อยอดสู่การพัฒนาในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางอย่างยั่งยืน.

เพกตินเป็นสารกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์จากธรรมชาติ มีคุณสมบัติช่วยเพิ่มความหนืด ซึ่งสามารถถูกย่อยได้เป็นเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยสามารถผลิตได้หลากหลายวิธี ได้แก่ การย่อยการใช้น้ำและความร้อน การย่อยในสภาวะกรด และการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยวิธีการทางเอนไซม์ เป็นหนึ่งในวิธีการเตรียมสารเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้รับความนิยม เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ การกักร้อนต่ำ และไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังสามารถทำงานได้แม้อยู่ในสภาวะที่ไม่รุนแรง เพื่อรักษาสารอาหารและคุณภาพของผลผลิตที่ได้ (Amo-Mateos et al, 2024)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาการเตรียมสารเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเปลือกมะนาวด้วยวิธีการทางเอนไซม์ และประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากเปลือกมะนาว

ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

1. การสกัดและหาปริมาณเพกตินจากเปลือกมะนาว และวิเคราะห์ Degree of esterification

ทำความสะอาดและคัดเปลือกของผลมะนาวแป้น จากตลาดคลองเตย 2 จังหวัดกรุงเทพมหานคร นำมาอบแห้งจนน้ำหนักคงที่ และบดให้เป็นผงละเอียด ต่อมาเติมน้ำปราศจากไอออนในอัตราส่วน 1:40 w/v และปรับ pH ให้ได้ pH 2 และเขย่าในสภาวะอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกสารละลายออกมาเติมด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ในอัตราส่วน 1:5 v/v และแช่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกน้ำตะกอนอุ่นมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่และบดเป็นผงละเอียด การหาปริมาณเพกตินในสารตัวอย่างที่สกัดได้ เริ่มจากชั่งผงของสารตัวอย่างจากเปลือกมะนาว ปริมาณ 0.15 กรัม นำมาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และต่อยอดด้วยสารละลายกรดอะซิติก จากนั้นเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ และตั้งทิ้งไว้ จากนั้นกรอกคัดเอาตะกอนเจลมาอบแห้งจนน้ำหนักคงที่ เพื่อคำนวณหาปริมาณเพกตินของสารตัวอย่าง จากนั้นวิเคราะห์ Degree of esterification ดัดแปลงจากวิธีการของ Pasandide et al. (2017) นำผงตัวอย่างจากเปลือกมะนาว ปริมาณ 0.2 กรัม เติมด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาณ 3 มิลลิตร และน้ำปราศจากไอออน ปริมาณ 20 มิลลิตร จากนั้นปั่นส่วนผสมและให้ความร้อนจนละลายเข้ากันดี ต่อมา

หดยดสารละลายพืพนอฟพาลินเข้มข้นร้อยละ 1 จำนวน 2 หดยดและไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู (V1) ต่อจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ต่อมาเติมสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาณ 10 มิลลิลิตร และกวนสารละลายจนสารละลายเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นไม่มีสี จากนั้นไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู (V2) และคำนวณค่า Degree of esterification (%DE) จากสูตรด้านล่างนี้

$$\%DE = \frac{V2}{V1+V2} \times 100$$

โดย DE คือค่า Degree of esterification

V1 คือปริมาณของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอลที่เติมลงในสารละลายตัวอย่างในการไทเทรตครั้ง 1

V2 คือปริมาณของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอลที่เติมลงในสารละลายตัวอย่างในการไทเทรตครั้ง 2

ซึ่งค่า %DE จากการคำนวณสามารถแปลผลได้ตามด้านล่างนี้

1) %DE มากกว่าร้อยละ 50 หมายถึงสารละลายตัวอย่างเป็นเพกตินชนิด High methoxyl pectin (HMP)

2) %DE น้อยกว่าร้อยละ 50 หมายถึงสารละลายตัวอย่างเป็นเพกตินชนิด Low methoxy pectin (LMP)

2. การเตรียมและศึกษาคุณสมบัติของสารเพกโดโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเพกตินที่สกัดจากเปลือกมะนาว

ดัดแปลงวิธีการของ Combo et al. (2012) นำสารละลายเพกตินเข้มข้น 0.05% มาปรับ pH ให้ได้ pH 4 จากนั้นเติมเอนไซม์เพกตินเนส P4716 (Sigma-Aldich, Merck) ปริมาณ 200 ยูนิตต่อสารละลายเพกติน 100 มิลลิลิตร ณ สภาวะอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยแบ่งออกเป็น 6 สภาวะดังนี้

สภาวะที่ 1 สารละลายเพกตินที่ไม่ใส่เอนไซม์เพกตินเนส (LPP)

สภาวะที่ 2 สารละลายเพกตินที่เติมเอนไซม์เพกตินเนสเป็นเวลา 30 นาที (LPPOS1)

สภาวะที่ 3 สารละลายเพกตินที่เติมเอนไซม์เพกตินเนสเป็นเวลา 60 นาที (LPPOS2)

สภาวะที่ 4 สารละลายเพกตินที่เติมเอนไซม์เพกตินเนสเป็นเวลา 120 นาที (LPPOS3)

สภาวะที่ 5 สารละลายเพกตินที่เติมเอนไซม์เพกตินเนสเป็นเวลา 180 นาที (LPPOS4)

สภาวะที่ 6 สารละลายเพกตินที่เติมเอนไซม์เพกตินเนสเป็นเวลา 240 นาที (LPPOS5)

จากนั้นนำสารละลายสภาวะที่ 2-6 ไปต้มในอ่างน้ำร้อนเป็นเวลา 2 ชั่วโมงเพื่อยุติปฏิกิริยาของเอนไซม์ จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกสารละลายส่วนใสออกมาระเหยด้วยเครื่อง Evaporator จนได้สารละลายเข้มข้น และเติมเอทานอลเข้มข้น 95% ในอัตราส่วน 1:5 v/v และแช่ตู้เย็นเป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นแยกสารละลายส่วนใสมาระเหยจนสารตัวอย่างมีน้ำหนักคงที่

3. การวิเคราะห์

3.1 การศึกษาคุณลักษณะของสารเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีการ Thin-Layer Chromatography (TLC)

ดัดแปลงวิธีการของ Zhou et al. (2014) เตรียมสารมาตรฐานทั้งหมด 9 ชนิดได้แก่ กลูโคส ซูโครส ฟรุคโทส ไซโลส ฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ อัลฟา-กลูแคน โอลิโกแซ็กคาไรด์ อินูลิน และเพกตินจากแอปเปิ้ล ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร และสารตัวอย่างทั้งหมด 6 สภาวะ (LPP, LPPOS1, LPPOS2, LPPOS3, LPPOS4 และ LPPOS5) ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมมาจุดบนแผ่นเจลซิลิกา และนำมาแช่ในสารตัวเคลื่อนที่ (Mobile phase) จากนั้นนำแผ่นเจลซิลิกาที่จุดสารละลายมาแช่ในสารละลาย Visualizing agent ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง และนำมาผ่านความร้อนจนเกิดจุดสีน้ำตาล และวัดระยะการเคลื่อนที่ของสาร เพื่อคำนวณ Rf ตามสูตรด้านล่างนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่าง (cm)}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย (cm)}}$$

3.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดัดแปลงวิธีการของ Fernandes et al. (2016) เริ่มจากการเตรียมตัวอย่างปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ปริมาณ 5 มิลลิตรโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเป็นตัวทำละลาย ต่อมาจุดสารละลายตัวอย่าง ปริมาณ 1.5 มิลลิตรมาใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย FRAP ปริมาณ 1.5 มิลลิตร แล้วผสมสารละลายให้เข้ากันดี จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสง มาคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหน่วยของปริมาณสมมูลของสารมาตรฐานทรอล็อกซ์ต่อกรัมตัวอย่าง

ผลวิจัย (Results)

การสกัดและปริมาณเพกตินจากเปลือกมะนาว พบว่าการสกัดเพกตินจากเปลือกมะนาว โดยใช้ น้ำเป็นตัวทำละลาย พบว่าร้อยละผลผลิตของสารตัวอย่างที่สกัดได้เท่ากับ 31.8 ± 0.28 และ ปริมาณเพกตินของสารตัวอย่างที่สกัดได้ มีค่าร้อยละโดยน้ำหนักของเพกตินที่เท่ากับ 91.11 ± 3.85 ทั้งนี้ได้มีการปรับสภาวะในการสกัดให้มีความเป็นกรด เพื่อเพิ่มผลผลิตของเพกติน โดยงานวิจัยของ Duwee et al. (2022) นอกจากนี้ ค่า Degree of esterification สารเพกตินที่สกัดได้ พบว่ามี ค่าเท่ากับ 24.45 ± 2.09 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 50 จึงถูกจัดเป็นเพกตินชนิด Low methoxy กล่าวได้ว่า ภายใต้อัตราส่วนศึกษาเดียวกัน อัตราส่วนตัวทำละลาย อุณหภูมิและเวลาที่ใช้สกัดเท่ากัน ผลผลิตเพกตินจากการสกัดภายใต้สภาวะกรด จะได้ผลผลิตมากกว่าสภาวะกลาง นอกจากนี้ ภายใต้อัตราส่วนศึกษาเดียวกัน ปัจจัยที่มีผลต่อผลผลิตเพกตินคือ อัตราส่วนตัวทำละลาย อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้สกัด ทั้งนี้หากอัตราส่วนของตัวทำละลายมาก อุณหภูมิและเวลาที่ใช้สกัดจะมีผลต่อผลผลิตมากขึ้น โดย ภายใต้อัตราส่วนศึกษาเดียวกัน และระยะเวลาในการสกัดนาน จะส่งผลให้ได้ผลผลิตของเพกตินมาก ในขณะที่สภาวะอุณหภูมิต่ำ และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดสั้น จะทำให้ได้ผลผลิตของเพกตินน้อย (Pasandide et al, 2017)

การเตรียมสารเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยเอนไซม์เพกตินเอส พบว่า เพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ จากการย่อยด้วยเอนไซม์ในระยะเวลาต่างกัน มีลักษณะแตกต่างกับเพกตินอย่างชัดเจน ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะของสารเพกติน และสารเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ เพกตินเอสในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

สารตัวอย่าง	ลักษณะทางกายภาพ	ภาพสารตัวอย่าง
เพกติน	แผ่นเกล็ดบางสีเหลืองนวล เปราะแตกง่าย	
เพกตินที่ถูกย่อยเป็นเวลา 30 นาที	ของแข็งสีเหลืองอำพัน	
เพกตินที่ถูกย่อยเป็นเวลา 60 นาที	ของแข็งสีเหลืองอำพัน	
เพกตินที่ถูกย่อยเป็นเวลา 120 นาที	ของแข็งสีเหลืองอำพัน	
เพกตินที่ถูกย่อยเป็นเวลา 180 นาที	ของแข็งสีเหลืองอำพัน	
เพกตินที่ถูกย่อยเป็นเวลา 240 นาที	ของแข็งสีเหลืองอำพัน	

สารเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้นั้น แตกต่างกับสารเพกตินอย่างชัดเจน เนื่องจากเพกตินจากเปลือกมะนาวก่อนผ่านกระบวนการระเหย และอบแห้ง มีลักษณะเป็นวุ้นเจล ในขณะที่เพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการย่อยด้วยเอนไซม์ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอำพัน ส่งผลให้เมื่อผ่านกระบวนการระเหย และอบแห้ง เพกตินจากเปลือกมะนาวมีความเป็นแผ่นเกล็ดที่มีความเปราะแตกง่าย และเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์มีลักษณะเป็นของแข็งสีอำพัน

การศึกษาคุณลักษณะของสารเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีการ Thin-Layer Chromatography (TLC) พบว่า เพกติน (สารตัวอย่าง) พบจุดสีเข้มบริเวณที่จุดเริ่มต้นเพียงจุดเดียว และไม่พบการเคลื่อนที่ของสาร ซึ่งสอดคล้องกับสารมาตรฐานเพกตินจากแอปเปิ้ล ในขณะที่สารตัวอย่างหมายเลข 2, 3, 4, 5 และ 6 ที่แสดงถึงสารเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่จากการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ 30 60, 120, 180 และ 240 นาที ตามลำดับ พบการเคลื่อนที่ของสาร โดยตำแหน่งการเคลื่อนที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงตามภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของสารมาตรฐานและสารตัวอย่างด้วยวิธีการ โครมาโทกราฟีผิวบาง

หมายเหตุ: เรียงลำดับจากซ้ายไปขวาดังนี้ กลูโคส, ซูโครส, ฟรุกโตส, ไซโลส, ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์, ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์, แอลฟา-กลูแคน โอลิโกแซ็กคาไรด์, อินูลิน, เพกตินจากแอปเปิ้ล, เพกตินจากเปลือกมะนาว (1), เพกตินที่ถูกย่อยเป็นเวลา 30 นาที (2), เพกตินที่ถูกย่อยเป็นเวลา 60 นาที (3), เพกตินที่ถูกย่อยเป็นเวลา 120 นาที (4), เพกตินที่ถูกย่อยเป็นเวลา 180 นาที (5) และ เพกตินที่ถูกย่อยเป็นเวลา 240 นาที (6)

ตารางที่ 2 ค่า Rf ของสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง

สารที่ทดสอบ	Rf
D-Glucose	0.6875
Sucrose	0.6250
Fructose	0.6875
D-Xylose	0.7500
Fructooligosaccharide	วัดค่าไม่ได้
Xylooligosaccharide	0.2500, 0.3000, 0.3250, 0.4250
Alpha-Glucan Oligosaccharide	0.2500, 0.3000, 0.4375, 0.5250, 0.5750
Inulin	วัดค่าไม่ได้
Pectin from apple (PFA)	ไม่พบการเคลื่อนที่ของสาร
LPP	ไม่พบการเคลื่อนที่ของสาร
LPPOS1	0.3750
LPPOS2	0.3625
LPPOS3	0.3500
LPPOS4	0.3375
LPPOS5	0.3375

คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยโครงสร้างของเพกตินประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ หมู่ไฮดรอกซิล (-OH) หมู่คาร์บอกซิล (-COOH) หมู่คาร์บอนิล (-C=O) เป็นต้น (Abari et al., 2021) จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP พบว่า สารเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 120 180 และ 240 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง โดยมีค่าเท่ากับ 368.03 ± 10.21 , 384.88 ± 1.13 และ 374.55 ± 7.51 มก.สมมูลทริโลอิกซ์/กรัมสารสกัด ตามลำดับ ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในช่วงเวลาข้างต้น ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเพกตินและเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเปลือกมะนาว

ลำดับที่	สารทดสอบ	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (มก.สมมูลทอรอล็อกซ์/กรัม สารสกัด)
1	เพกติน	234.76 ± 10.92^C
2	เพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ย่อยเพกตินเป็นเวลา 30 นาที)	282.99 ± 9.93^B
3	เพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ย่อยเพกตินเป็นเวลา 60 นาที)	217.61 ± 12.48^C
4	เพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ย่อยเพกตินเป็นเวลา 120 นาที)	368.03 ± 10.21^A
5	เพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ย่อยเพกตินเป็นเวลา 180 นาที)	384.88 ± 1.13^A
6	เพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ย่อยเพกตินเป็นเวลา 240 นาที)	374.55 ± 7.51^A

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ หมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบ (ตารางที่ 2) พบว่าเพกตินที่ไม่ผ่านการย่อย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด แต่ในเวลา 30 นาที พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น สันนิษฐานว่า เมื่อเพกตินถูกย่อย ทำให้ได้เพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีหมู่ฟังก์ชันอิสระมากขึ้น ส่งผลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากขึ้น แต่ทว่าในเวลา 60 นาที เอนไซม์เพกตินเนส P4716 ซึ่งมีการทำงานแบบสุ่มตำแหน่ง ทำได้เพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีหมู่ฟังก์ชันซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ ขณะที่เวลา 120 นาที พบว่าเมื่อเกิดกิจกรรมการย่อยสูงขึ้น และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกลับมาสูงขึ้น สันนิษฐานว่า การย่อยในระยะเวลานานขึ้น ทำให้เกิดเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง แต่เนื่องจากกิจกรรมการย่อยที่เวลา 180 และ 240 นาที ไม่แตกต่างกับการย่อยในเวลา 120 นาที จึงทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของช่วงเวลาดังกล่าวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงสรุปได้ว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สูงกว่าเพกตินทั่วไป

อภิปรายและข้อเสนอแนะ (Discussion and Suggestion)

จากการสกัดเพกตินโดยการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในสภาวะเป็นกรด เมื่อเทียบกับการสกัดที่ไม่ได้ผ่านการปรับสภาวะให้มีความเป็นกรด พบว่าภายใต้การใช้พืชตัวอย่างเป็นพืชตระกูลส้มเหมือนกัน การสกัดเพกตินในสภาวะกรดมีแนวโน้มช่วยเพิ่มผลผลิตเพกตินได้ดีกว่าการสกัดเพกตินในสภาวะปกติ แต่เนื่องจากเพกตินที่พบในเปลือกผลไม้ตระกูลแต่ละชนิดมีปริมาณที่ไม่เท่ากัน ทำให้อาจมีตัวแปรอื่นๆที่มีผลต่อการสกัดเพกตินที่เกิดขึ้นได้ ดังนั้นในอนาคตอาจต้องทำการศึกษาการสกัดเพกตินภายใต้การใช้ตัวอย่างพืชสายพันธุ์เดียวกันเพิ่มเติม เพื่อที่จะสามารถสรุปเรื่องสภาวะการสกัดเพื่อเพิ่มผลผลิตของเพกตินได้อย่างชัดเจน รวมถึงสภาวะการสกัดเพกตินที่อาจมีผลต่อชนิดของเพกตินที่ได้ว่าจะเป็ High methoxy pectin (HMP) หรือ Low methoxy pectin (LMP) อาจจะต้องออกแบบวิธีการสกัดเพกตินในสภาวะที่ทำให้ได้เพกตินต่างกันชนิดกัน ซึ่งสามารถประเมินได้จาก Degree of esterification ของเพกติน ซึ่งอาจส่งผลต่อหมู่ฟังก์ชันของเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ และฤทธิ์ทางชีวภาพที่อาจมีความแตกต่างกัน ส่วนผลการศึกษาคุณสมบัติของสารเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่าสารที่ได้มีขนาดที่ใกล้เคียงกัน แต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน ซึ่งวิธีการทดสอบด้วยโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง ยังไม่สามารถใช้อธิบายคุณสมบัติของเพกตินและเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเปลือกมะนาวอย่างละเอียดได้ จึงแนะนำให้ดำเนินการทดสอบเพิ่มเติมด้วยวิธีการวิเคราะห์ที่มีความเจาะจงและเหมาะสมกับสาร อาทิ วิเคราะห์โครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง (HPLC) และ โครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง และวิเคราะห์ร่วมกับแมสสเปกโตรเมทรี (LC/MS) เพื่อที่จะสามารถจำแนกขนาดโมเลกุลและโครงสร้างอย่างละเอียด (Pasarin et al, 2023) การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเปลือกมะนาว จากงานวิจัยของ Amo-Mateos et al. (2024) กล่าวว่า เพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และเป็นพรีไบโอติกส์ ทว่าวิธีการสกัดเพกตินจากเปลือกมะนาวของงานวิจัยนี้ มีการปรับสภาวะให้มีความเป็นกรดเพียงสภาวะเดียว ไม่ได้ทำการสกัดแบบทั่วไปควบคู่ด้วย อาจทำให้ไม่สามารถพิสูจน์ชนิดของเพกตินที่อาจส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงแนะนำให้ศึกษาและดัดแปลงวิธีสกัดเพื่อให้ได้เพกตินชนิดต่างกัน และศึกษาฤทธิ์ชีวภาพของเพกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากเพกตินที่ต่างชนิดกัน รวมถึงฤทธิ์พรีไบโอติกส์ สำหรับต่อยอดองค์ความรู้เพื่อนำวัสดุเหลือทิ้งอย่างเปลือกมะนาวมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านเครื่องสำอางอย่างคุ้มค่าต่อไป

รายการอ้างอิง

- Abari, A.H., Rourani, H.A., Ghasemi, S.M., Kim H., & Kim, Y.G. (2021). Investigation of antioxidant and anticancer activities of unsaturated oligo-galacturonic acids produced by pectinase of *Streptomyces hydrogenans* YAM1. *Scientific Reports*, 11, 8491.
- Amo-Mateos, E., Pérez, R., Merino, A., Lucas, S., Garcia-Cubero, M.T. & Coca, M. (2024). Rhamnogalacturonan-I pectin and derived oligosaccharides obtained from sugar beet pulp and discarded red beetroot: Characterization and comparative study of their antioxidant and prebiotic properties. *Food Hydrocolloids*, 152, 109955.
- Combo, A.M.M., Aguedo, M., Goffin, D., Wathelet, B., & Paquot, M. (2012). Enzymatic production of pectic oligosaccharides from polygalacturonic acid with commercial pectinase preparations. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3), 588–596.
- Duwee, Y.S., Kiew, P.L., & Teoh, W.M. (2022). Multi-objective optimization of pectin extraction from orange peel via response surface methodology: yield and degree of esterification. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16, 1710-1724.
- Fernandes, R.P., Trindade, M.A., Tonin, F.G., Lima, C.G., Pugine, S.M., Munekata, P.E., Lorenzo, J. M. & de Melo, M. P. (2016). Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. *Journal of food science and technology*, 53(1), 451–460.
- Freitas, C.M.P., Coimbra, J.S.R., Souza, V.G.L. & Sousa, R.C.S. (2021). Structure and Applications of Pectin in Food, Biomedical, and Pharmaceutical Industry: A Review. *Coatings*, 11, 922.
- Liew, S.Q., Chin, N.L., & Yusof, Y.A. (2014). Extraction and characterization of pectin from passion fruit peels. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 231–236.

- Narang, N. & Jiraungkoorskul, W. (2016). Anticancer Activity of Key Lime, *Citrus aurantifolia*. *Pharmacognosy Reviews*, 10, 118-122.
- Parasin, A., Ghizdareanu, A.I., Teodorescu, F., Rovinaru C. & Banu A. (2023). Characterization of Pectin Oligosaccharides Obtained from Citrus Peel Pectin. *Fermentation*, 9(312).
- Pasandide, B., Khodaiyan, F., Mousavi, Z., & Hosseini, S. (2017). Optimization of aqueous pectin extraction from *Citrus medica* peel. *Carbohydrate Polymers*, 178, 27–33.
- Quoc, L.P.T., Huyen, V.T.N., Hue, L.T.N., Hue, N.T.H., Thuan, N.H.D., Tam, N.T.T., . . . (2015). Extraction of pectin from pomelo (*Citrus maxima*) peels with the assistance of microwave and tartaric acid. *International Food Research Journal*, 22(4), 1637-1641.
- Yeung, Y.K., Kang, Y., So, B.R., Jung, S.K. & Chang, Y.H. (2021). Structural, antioxidant, prebiotic and anti-inflammatory properties of pectic oligosaccharides hydrolyzed from okra pectin by Fenton reaction. *Food Hydrocolloids*, 118, 106779.

