

การเตรียมสารสกัดจากไข่น้ำด้วยการใช้เอนไซม์ช่วยสกัด

Preparation of Extracts from *Wolffia arrhiza* (L.)

Using Enzyme-assisted Extraction

จารุณีภา เครือวัฒนเวช

อีเมล: 6551701251@lamduan.mfu.ac.th

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัญญาวัฒน์ ปินตาทอง

อีเมล: punyawatt.pin@mfu.ac.th

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

ไข่น้ำ มีชื่อเรียกตามท้องถิ่นที่กำเนิดในประเทศไทย คือ ผำ องค์ประกอบเป็นโปรตีนกรดอะมิโน จำเป็น กรดไขมันไม่อิ่มตัว วิตามิน แร่ธาตุ สารสำคัญกลุ่มแคโรทีนอยด์ ไฟโตสเตอรอล และสารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์สูง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมสารสกัดจากไข่น้ำด้วยวิธีสีเขียว และเพื่อประเมิน โปรตีน สารประกอบฟีนอลิกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไข่น้ำเพื่อประโยชน์ทางเครื่องสำอาง โดยทำการสกัดไข่น้ำด้วยเอนไซม์เซลลูเลสช่วยสกัดเทียบกับวิธีดั้งเดิม คือ ใช้เอทานอลร้อยละ 70 จากนั้น วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากสารสกัดไข่น้ำ พบว่าสารสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 5 ยูนิต/มิลลิลิตร มีปริมาณ โปรตีนมากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 54.25 ± 0.74 มิลลิกรัม BSA/กรัม สารสกัด ซึ่งสูงกว่าสารสกัดชนิดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลสช่วยสกัดสามารถให้ปริมาณ โปรตีนที่ดี การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สารสกัดฟิเตรทด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ความเข้มข้น 15 ยูนิต/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด 7.51 ± 0.04 มิลลิกรัม TEAC/กรัม สารสกัด ซึ่งมีฤทธิ์สูงกว่าสารสกัดชนิดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สารสกัดหยาบฟีนอลิกที่สกัดด้วย เอทานอลร้อยละ 70 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ไม่แตกต่างกับสารสกัดฟิเตรทด้วยเอนไซม์ เซลลูเลสความเข้มข้น 15 ยูนิต/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 56.97 ± 0.86 และ 54.92 ± 2.48 มิลลิกรัม TEAC/กรัม สารสกัด ตามลำดับสารสกัดหยาบฟีนอลิกที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด 58.93 ± 1.03 มิลลิกรัม GAE/กรัม สารสกัด และให้ปริมาณฟลาโวนอยด์

รวมสูงสุด 323.73 ± 1.93 มิลลิกรัม QE/กรัม สารสกัด รongลงมา ได้แก่ สารสกัดฟิเตรทด้วยเอนไซม์ เซลลูเลสความเข้มข้น 15 ยูนิต/มิลลิลิตร ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 45.56 ± 0.46 มิลลิกรัม GAE/กรัม สารสกัด และให้ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 86.85 ± 0.16 มิลลิกรัม QE/กรัม สารสกัด

คำสำคัญ: ไข่น้ำ, เอนไซม์เซลลูเลส, สารประกอบฟีนอลิก, โปรตีน,ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

Wolffia arrhiza L., also known locally as 'phaam' in Thailand, high levels of proteins, essential amino acids, unsaturated fatty acids, vitamins, minerals, carotenoids, phytosterols and flavonoids. This study aimed to prepare extracts from *Wolffia arrhiza* L. using green extraction methods and to evaluate the protein content, phenolic compounds, and antioxidant activity of duckweed extracts for cosmetic applications. *Wolffia arrhiza* L. was extracted using cellulase-assisted extraction compared to a conventional method using 70% ethanol. Protein content, total phenolic content, flavonoid content, and antioxidant activities of the extracts were analyzed. The extract obtained using cellulase at a concentration of 5 units/mL yielded the highest protein content at 54.25 ± 0.74 mg BSA/g extract, which was significantly higher than the other extraction methods ($p < 0.05$). This indicates that cellulase-assisted extraction enhances protein yield. For antioxidant activity measured by the DPPH assay, the filtrate extract obtained using cellulase at 15 units/mL showed the highest antioxidant activity at 7.51 ± 0.04 mg TEAC/g extract, significantly higher than the other extracts ($p < 0.05$). In the FRAP assay, the crude phenolic extract using 70% ethanol and the filtrate extract using cellulase at 15 units/mL showed no statistically significant difference, with values of 56.97 ± 0.86 and 54.92 ± 2.48 mg TEAC/g extract, respectively. The crude phenolic extract obtained using 70% ethanol had the highest total phenolic content at 58.93 ± 1.03 mg GAE/g extract and the highest total flavonoid content at 323.73 ± 1.93 mg QE/g extract. Following that, the filtrate extract using cellulase at 15 units/mL had a total phenolic content of 45.56 ± 0.46 mg GAE/g extract and a total flavonoid content of 86.85 ± 0.16 mg QE/g extract.

Keywords: *Wolffia arrhiza* L., Cellulase Enzyme, Phenolic content, Protein, Anti-oxidant

บทนำ/หลักการและเหตุผล

ไชน้ำเป็นอีกหนึ่งกระแสนิยมที่มาแรงและเป็นที่กำลังถึงอย่างมาก ในภาคอุตสาหกรรมเกษตร เป็นพืชน้ำที่ได้รับความสนใจ อยู่ในยุทธศาสตร์นโยบายการขับเคลื่อนใหม่ของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ในด้านอาหารแห่งอนาคต มีชื่อเรียกตามท้องถิ่นที่กำเนิดในประเทศไทย คือ ผำ เป็นพืชตระกูลเดียวกับแห่น ไชน้ำที่ผ่านการอบแห้งแล้ว อุดมไปด้วยสารอาหารต่าง ๆ ได้แก่ โปรตีน 45% คาร์โบไฮเดรต 20% ไขมัน 5% และสารอาหารอื่น ๆ 5% ซึ่งปริมาณโปรตีนสูงเทียบเท่ากับถั่วและธัญพืช อีกทั้งยังมีกรดอะมิโนที่ให้โปรตีนคุณภาพสูงไม่แพ้เนื้อสัตว์ นอกจากนี้ยังมีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง ถือได้ว่าไชน้ำเป็นซูเปอร์ฟู้ดสุดยอดของแหล่งโปรตีนทดแทน (Appenroth et al., 2018)

การได้มาของสารสกัดจากไชน้ำนั้นต้องผ่านกระบวนการสกัดสารจากพืชก่อน การสกัดสารจากพืชทำได้หลากหลายวิธี เช่น การสกัดแบบแช่หมักด้วยตัวทำละลาย (Maceration extraction) การสกัดแบบซอกซ์เลต (Soxhlet extraction) เป็นต้น วิธีเหล่านี้ใช้ระยะเวลาในการสกัดค่อนข้างนาน อีกทั้งยังจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายละลายอินทรีย์ (organic solvent) ในปริมาณสูง ซึ่งเป็นสารที่ระเหยง่าย อาจส่งผลถึงปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม นำไปสู่มลพิษทางอากาศ ไวกัง่าย เกิดความเป็นพิษ เป็นสารก่อมะเร็งได้ (Garrigues, 2019) ดังนั้นจึงเกิดการพัฒนากการสกัดแบบสีเขียว (green extraction) สามารถให้คำจำกัดความ คือ การวางแผนการพัฒนาในขั้นตอนการใช้สารเคมีต่าง ๆ โดยการหลีกเลี่ยง ลดการใช้ หรือสังเคราะห์สารที่เป็นอันตรายและมีพิษต่อระบบนิเวศ การพัฒนาและวางแผนกระบวนการสกัดที่ประหยัดพลังงาน และการผลิตสารจากธรรมชาติที่สามารถรีไซเคิลได้ โดยให้ความสำคัญกับความปลอดภัยและคุณภาพของสารสกัดที่ได้ การสกัดโดยใช้เอนไซม์ช่วยสกัด (enzyme-assisted extraction) เป็นหนึ่งในการสกัดที่มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม คือ การสกัดสารโดยใช้เอนไซม์การใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัดนั้น มีคุณสมบัติในการแยกสารสำคัญและองค์ประกอบต่าง ๆ ออกจากพืชที่ศึกษา ทำให้ได้สารสำคัญและผลผลิตเพิ่มมากขึ้น โดยมักใช้ร่วมกับการสกัดทางเคมี เพื่อให้เอนไซม์ช่วยย่อยสลายส่วนประกอบของพืชในขั้นต้นก่อนที่จะทำการสกัดด้วยวิธีดั้งเดิม (Puri et al., 2012) การสกัดโปรตีนจากพืชโดยใช้เอนไซม์ เช่น เซลลูเลส (cellulase) เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) และเพกตินเนส (pectinase) จะช่วยในการย่อยสลายโครงสร้างของผนังเซลล์พืช ทำให้โปรตีนที่ถูกยึดเกาะอยู่ภายในเซลล์ถูกปลดปล่อยออกมาและละลายในสารละลายสกัดได้มากขึ้น (ทิพวรรณ ทองสุข, 2559) วิธีการนี้ถือเป็นกระบวนการที่เป็นมิตรต่อ

สิ่งแวดล้อม เนื่องจากลดการใช้ตัวทำละลายเคมี ใช้พลังงานและอุณหภูมิต่ำ ใช้เวลาสกัดน้อย และทำให้การสกัดมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Zhao et al., 2016)

รายงานวิจัยของ Yadav et al. (2017) เกี่ยวกับการศึกษาองค์ประกอบลิกโนเซลลูโลสของแห่น ซึ่งเป็นพืชตระกูลเดียวกับขมิ้น ด้วยวิธี Van Soest Method ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ปริมาณ เซลลูโลส ลิกโนเซลลูโลส และลิกนินของแห่น (ไม่ระบุชนิดพันธุ์) พบว่าสัดส่วนขององค์ประกอบทั้งสามชนิดที่วิเคราะห์ได้นั้น มีสัดส่วนของลิกนินในปริมาณต่ำที่สุดที่ร้อยละ 12.0 ในขณะที่องค์ประกอบที่มากที่สุด ได้แก่ เซลลูโลส ที่ร้อยละ 55.2 ตามด้วยเฮมิเซลลูโลสที่พบว่ามีอยู่ประมาณร้อยละ 32.6 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เอนไซม์เซลลูเลสช่วยสกัด

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อเตรียมสารสกัดจากใข้่น้ำด้วยวิธีสีเขียว และเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ โปรตีน สารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใข้่น้ำ โดยได้ศึกษาการสกัดโปรตีน ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์จากใข้่น้ำด้วยวิธีการใช้เอนไซม์เซลลูเลสช่วยสกัดเพื่อเทียบกับการสกัดแบบดั้งเดิม คือ การสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 พร้อมศึกษาประเมินคุณลักษณะทางกายภาพเคมีของสารสกัดใข้่น้ำ เพื่อนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในทางเครื่องสำอาง หรืออาหารต่อไปได้

บททวนวรรณกรรม

ใข้่น้ำภาษาถิ่นเรียกว่า ผำ ใข้่น้ำถูกจำแนกอยู่ในวงศ์แห่น (Lemnaceae) สกุล *Wolffia* ชนิดใข้่น้ำในไทยที่พบมากที่สุด คือ *W. globosa* (Roxburgh) และ *W. arrhiza* (Linnaeus) Horker ex Wimmer) วิลาสินี ตีปัญญา (2555) โดยความแตกต่างกันของทั้งสองชนิด คือ *W. arrhiza* จะมีความกว้างมากกว่าความยาวมีขนาดใหญ่กว่า *W. globosa* ผิวสีเขียวเข้ม มันวาว ขณะที่ *W. globosa* ลักษณะเฉพาะคือมีความยาวมากกว่าความกว้าง มีขนาดเล็กกว่า มีรูปทรงทรงกระบอกที่ชัดเจน ลักษณะโปร่งแสงกว่า *W. arrhiza* (ภานุมาศ ทองคำ, 2562)

องค์ประกอบทางเคมีของใข้่น้ำเมื่อนำพืชดังกล่าวมาอบแห้งและนำมาสกัดด้วยเอทานอล และหาองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้เครื่องมือโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์และโครมาโทกราฟีแบบของเหลวความดันสูง ผลการวิเคราะห์พบว่า ใข้่น้ำประกอบด้วยสารสำคัญ 8 ประเภท ได้แก่ apigenin-7-O- β -D-glucoside, isovitexin, orientin, isoorientin, luteolin-7-O- β -D-glucoside, isoorientin-6-O- β -D-glucoside และ apigenin-6,8-di-C- β -D-glucoside จากผลการศึกษาดังกล่าวจึงสามารถวิเคราะห์ได้ว่าการศึกษาใข้่น้ำจัดเป็นพืชที่มีความน่าสนใจ เพื่อเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในประเภทฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ซึ่งเป็นอนุพันธ์หนึ่งของสารฟีนอลิก (จุฬารรรณ ดอกไม้งาม, 2560) และงานวิจัยโดย Appenroth et al. (2018) แสดงให้เห็นว่า

ไข่น้ำที่ผ่านการทำแห้งมีโปรตีนสูงถึง 45% คาร์โบไฮเดรต 20% ใยอาหาร 25% ไขมัน 5% และอื่น ๆ 5% โดยมีปริมาณโปรตีนในน้ำหนักแห้งที่ใกล้เคียงกับถั่วและธัญพืช และยังประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ให้โปรตีนคุณภาพสูงคล้ายกับเนื้อสัตว์และมีเบต้าแคโรทีนสูง

การสกัดด้วยการใช้เอนไซม์ช่วยสกัด (Enzyme-assisted extraction : EAE) เป็นกระบวนการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ลดปริมาณตัวทำละลายเคมีที่ใช้ในการสกัด สามารถทำการสกัดได้ง่าย ดำเนินการโดยใช้พลังงานและอุณหภูมิต่ำ ใช้ระยะเวลาในการสกัดที่สั้น ส่งผลให้การสกัดมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น, สภาวะของปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง (Zhao et al., 2016) ข้อจำกัด คือ ต้องควบคุมพารามิเตอร์ต่าง ๆ ให้แม่นยำ เช่น อุณหภูมิ pH และความเข้มข้น การสกัดด้วยการใช้เอนไซม์ช่วยสกัด คือ การสกัดสารโดยใช้เอนไซม์เป็นการใช้เอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยองค์ประกอบและสารสำคัญออกจากพืชที่ต้องการศึกษา เพื่อให้ได้ปริมาณสารสำคัญและผลผลิตที่มากขึ้น โดยเอนไซม์จะทำหน้าที่ในการทำลายหรือทำให้ผนังเซลล์พืชอ่อนตัวลง เอนไซม์ที่นิยมนำมาใช้ในการสกัด ได้แก่ เซลลูเลส (cellulase), เฮมิเซลลูเลส (hemi-cellulase) และเพกตินเนส (pectinase) เป็นต้น การสกัดด้วยเอนไซม์มักใช้ร่วมกับการสกัดด้วยวิธีทางเคมี เนื่องจากสามารถช่วยย่อยสลายส่วนประกอบของพืชได้ในเบื้องต้น ก่อนที่จะทำการสกัดด้วยวิธีทั่วไป (Puri et al., 2012) เอนไซม์เซลลูเลสมีค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ที่ 4.0-6.0 และ 40-50 องศาเซลเซียสตามลำดับ

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างไข่น้ำ

ซื้อไข่น้ำที่ทำการเพาะเลี้ยงในบ่อด้วยน้ำสะอาดจากจังหวัดกาฬสินธุ์ นำไข่น้ำมาทำความสะอาดหลังจากนั้นเกลี่ยให้มีความหนาสม่ำเสมอจนกดแล้ว ให้นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2 วัน ไข่น้ำที่ผ่านการอบแห้ง ทำการบดให้ละเอียดเป็นผง เก็บตัวอย่างบรรจุใส่ถุงห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์และเก็บรักษาผงไข่น้ำในโถสุญญากาศความชื้นเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

2. การเตรียมสารสกัดจากไข่น้ำ

1) การสกัดโปรตีนจากไข่น้ำ ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสช่วยสกัด

ผสมผงไข่น้ำที่บดละเอียดกับอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.5 ให้เข้ากัน ในอัตราส่วน 1:10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปรับสภาพผนังเซลล์ของไข่น้ำด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยศึกษาที่ความเข้มข้นเอนไซม์ 3 ระดับ ได้แก่ เอนไซม์ 5, 10, 15 ยูนิต/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่ได้ใส่เอนไซม์ ระยะเวลาย่อย 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ ด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ

80 องศาเซลเซียส 2 นาที นำไปกรองผ่านกรวยกรองบุชเนอร์ นำส่วนใสที่ได้จากการตกตะกอน เติมน้ำเอทานอล ทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอลเท่ากับ 70% เป็นการทำให้ปริมาตรเพิ่มขึ้นและช่วยเสริมการสกัด จากนั้นใช้แท่งแม่เหล็กกวนสารกวนเบา ๆ 30 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน นำสารสกัดส่วนใสไประเหยตัวทำละลายออกเครื่องระเหยแห้งแบบหมุน นำส่วนของตะกอนโปรตีนไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน 45 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ ซึ่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาปริมาณร้อยละของผลผลิต และนำไปวิเคราะห์ (ดัดแปลงจาก ธัญญา สายโอะ, 2562)

2) การสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากไข่น้ำ

การสกัดสารกลุ่มฟีนอลิกจากไข่น้ำด้วยวิธีดั้งเดิมแบบเขย่า โดยนำผงไข่น้ำที่เตรียมไว้มาผสมกับเอทานอลร้อยละ 70 อัตราส่วน 1:10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยเครื่องเขย่าสาร ความเร็วรอบ 200 rpm หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรอง นำไปผ่านกระบวนการระเหยเพื่อกำจัดตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบหมุน จะได้สารสกัดหยาบ (crude extracts) นำไปชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ คำนวณหา %yield บันทึกและสังเกตผล และเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็นเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป (ดัดแปลงจากวิธีของ วชิราภรณ์ พูนัน, 2562)

3. การศึกษาความคงตัวและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสารสกัดไข่น้ำ

บันทึกผล ถ่ายภาพลักษณะทางกายภาพ, ทดสอบการละลาย, ถ่ายภาพสีของสารสกัด, ทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดไข่น้ำ

4. การวิเคราะห์

1) การวิเคราะห์ปริมาณผลได้

$$\% \text{yield} = (\text{น้ำหนักสารสกัดที่ได้} / \text{น้ำหนักไข่น้ำแห้งที่ใช้ในการสกัด}) \times 100$$

2) การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสารสกัดไข่น้ำ (Total Soluble Protein) ด้วยวิธี Dye-binding (Bradford assay)

เตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA ปิเปตสารสกัดจากไข่น้ำลงในหลอดทดลอง เติมน้ำ DI Water, Bradford reagent ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าสาร ตั้งอุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นเติม 4% NaOH ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 8 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร โดยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ทำการวิเคราะห์สารสกัดไข่น้ำ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA เพื่อหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดที่ได้ รายงานผลปริมาณ BSA equivalent (มิลลิกรัม BSA/กรัม สารสกัด) (อ้างอิงจาก Bradford et al., 1976)

3) การวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก (Total Phenolic compounds) ของสารสกัดใข้่น้ำ

ปีเปตสารสกัดจากใข้่น้ำลงหลอดทดลอง เติมสาร Folin ciocaltue's reagent, DI Water, 7.5% sodium carbonate ผสมสารด้วยเครื่องเขย่าสาร ตั้งไว้อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทำการวิเคราะห์สารสกัดใข้่น้ำ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก เพื่อหาค่าความเข้มข้นฟีนอลิกทั้งหมดที่ได้ รายงานผลเป็นปริมาณ Gallic acid equivalent (มิลลิกรัม GAE/กรัม สารสกัด) (Siddiqui et al., 2017)

4) การวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดใข้่น้ำ (Total Flavonoid Content)

ปีเปตสารสกัดจากใข้่น้ำลงไปหลอดทดลอง เติม DI Water, 5%NaNO₂,10%AlCl₃ ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร ทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติม 4%NaOH ผสมสารด้วยเครื่องเขย่าสาร ตั้งไว้อุณหภูมิห้อง 8 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ทำการวิเคราะห์สารสกัดใข้่น้ำ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานเคอร์เซติน เพื่อหาค่าความเข้มข้นฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่ได้ รายงานผลเป็นปริมาณ Quercetin equivalent (มิลลิกรัม QE/กรัม สารสกัด) (Fattah et al., 2014)

5) การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดใข้่น้ำด้วยวิธี DPPH scavenging assay

ปีเปตสารสกัดใข้่น้ำใส่หลอดทดลอง เติมสารละลาย DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) 0.1 mM และ เอทานอลร้อยละ 95 ลงไป ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร ตั้งไว้ในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ทำการวิเคราะห์สารสกัดใข้่น้ำ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะนำมาใช้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไทรอลอกซ์ รายงานผลเป็นปริมาณค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (มิลลิกรัม TEAC/กรัม สารสกัด) (Baliyan et al., 2022)

6) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใข้่น้ำด้วยวิธี Ferric reducing-antioxidant power (FRAP) assay

ทำการปีเปตสารสกัดใข้่น้ำลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย FRAP รีเอเจนท์และอะซิเตรทบัฟเฟอร์ แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 30 นาที หลังจากนั้น นำสารสกัดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น

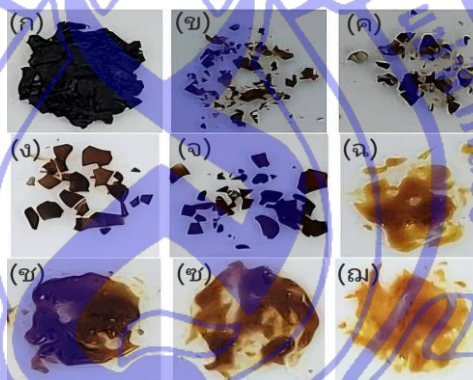
593 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณและเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโพลีแลกซ์ เพื่อรายงานผลในรูปแบบของปริมาณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (มิลลิกรัม TEAC /กรัม สารสกัด)(Fernandes, et al., 2016)

7) การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลสารประกอบฟีนอลิก, โปรตีน, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการทดลองโดย ANOVA และ Duncan's new Multiple Range Test ($p=0.05$) โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statics version 25

ผลวิจัยและอภิปรายผล

ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดใข้่น้ำ จากการทดลองสกัดสารสกัดใข้่น้ำด้วยวิธีต่าง ๆ พบว่า สารสกัดหยาบฟีนอลิก ที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 มีลักษณะทางกายภาพที่เหนียวหนืด เกาะตัวกัน มีสีเขียวเข้ม สารสกัดโปรตีน มีลักษณะเป็นตะกอนผงแห้งสีน้ำตาลเข้ม เช่นเดียวกับกับสารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 5, 10, 15 ยูนิต/มิลลิลิตร สารสกัดฟิเตรทที่นำไปประเหยแห้งออกพบว่า สารมีลักษณะเหนียวหนืด สีน้ำตาลเข้ม เช่นเดียวกับกับ สารสกัดฟิเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 5, 10, 15 ยูนิต/มิลลิลิตร ดังแสดงภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดใข้่น้ำ ภาพ (ก) สารสกัดหยาบฟีนอลิก, (ข) สารสกัดโปรตีน, (ค) สารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 5 ยูนิต/มิลลิลิตร, (ง) สารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 10 ยูนิต/มิลลิลิตร, (จ) สารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 15 ยูนิต/มิลลิลิตร (ฉ) สารสกัดฟิเตรท, (ช) สารสกัดฟิเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 5 ยูนิต/มิลลิลิตร, (ซ) สารสกัดฟิเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 10 ยูนิต/มิลลิลิตร, (ม) สารสกัดฟิเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 15 ยูนิต/มิลลิลิตร

สีของสารสกัดใข้่น้ำ จากการถ่ายภาพลักษณะทางกายภาพของสารสกัดใข้่น้ำโดยการดูสีของสารสกัดด้วยตาเปล่า พบว่า สารสกัดหยาบฟีนอลิกที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 และสารสกัดฟิเตรทมีสีเขียวมน้ำตาลที่เข้มกว่ากว่าสารสกัดโปรตีน เนื่องจากสารสกัดใข้่น้ำด้วยเอทานอลร้อยละ 70

และสารสกัดฟิเตรทต้องใช้ความร้อนในการระเหยตัวทำละลายออกซึ่งใช้อุณหภูมิที่สูงและใช้ระยะเวลาก่อนข้างนานมีผลทำให้คลอโรฟิลล์ ซึ่งเป็นรงควัตถุให้สีเขียวของไข่น้ำเปลี่ยนเป็นฟิโอฟิติน (Pheophytins) ทำให้สีของไข่น้ำมีความเข้มข้นเป็นสีเขียวอมน้ำตาล (ภานุมาศ ทองคำ, 2562)

จากการทดลองการสกัดไข่น้ำด้วยวิธีต่าง ๆ พบว่าปริมาณสารสกัดหยาบร้อยละของสารสกัดโปรตีนเท่ากับ 3.80 สารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 5 ยูนิต/มิลลิลิตรเท่ากับ 4.50 สารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 10 ยูนิต/มิลลิลิตร เท่ากับ 5.70 สารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 15 ยูนิต/มิลลิลิตรเท่ากับ 8.10 สารสกัดฟิเตรทเท่ากับ 12.9 สารสกัดฟิเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 5 ยูนิต/มิลลิลิตรเท่ากับ 26.6 สารสกัดฟิเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 10 ยูนิต/มิลลิลิตรเท่ากับ 26.2 สารสกัดฟิเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 15 ยูนิต/มิลลิลิตร เท่ากับ 25.5 สารสกัดหยาบฟีนอลิกจากไข่น้ำที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 เท่ากับ 19.75 ไกล่เคียงกับรายงานวิจัยของ (สุพรรณทิพนี, 2560) ได้ทำการสกัดไข่น้ำหมักกับเอทานอลพบว่า ได้ปริมาณสารสกัดหยาบร้อยละ 12.25 ของไข่น้ำแห้ง

การทดลองวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด (Total Soluble Protein) ด้วยวิธี Dye-binding (Bradford assay) พบว่าสารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 5 ยูนิต/มิลลิลิตร มีปริมาณโปรตีนมากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 54.25 ± 0.74 มิลลิกรัม BSA/กรัม สารสกัด ซึ่งมีฤทธิ์สูงกว่าสารสกัดชนิดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รองลงมาได้แก่ สารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 10 ยูนิต/มิลลิลิตร และสารสกัดโปรตีนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 15 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 48.34 ± 0.59 และ 47.59 ± 0.53 มิลลิกรัม BSA/กรัม สารสกัด ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากการที่ใช้เอนไซม์ในปริมาณสูงเกินไปอาจส่งผลให้เกิดการทำลายโครงสร้างผนังเซลล์ แต่ยังย่อยโปรตีนที่เพิ่งถูกปลดปล่อยให้กลายเป็นกรดอะมิโนหรือเปปไทด์ขนาดเล็กที่ไม่สามารถตกตะกอนได้ ซึ่งเอนไซม์มีปฏิกิริยาต่อสารที่ไม่ต้องการในวัสดุ เช่น ไขมันหรือส่วนที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งทำให้การสกัดโปรตีนไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนที่ได้น้อยลง นอกจากนี้กรณีที่มีเอนไซม์เข้มข้นสูงแต่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอง (self-inhibition) หรือเกิด feedback inhibition จากผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา เอนไซม์จึงทำงานได้ไม่เต็มที่ ซึ่งล้วนส่งผลให้ประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการใช้ความเข้มข้นที่ต่ำกว่าอาจได้ผลผลิตที่สูงกว่าในบางกรณี (Iyer et al., 2022) ในส่วนของสารสกัดฟิเตรทและสารสกัดฟิเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 15 ยูนิต/มิลลิลิตร ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 16.08 ± 0.36 และ 16.35 ± 0.30 มก BSA/กรัม สารสกัด ตามลำดับ สารสกัด

หยาบฟีนอลิกที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 มีค่าโปรตีนน้อยที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 7.76 ± 0.12 มิลลิกรัม BSA/กรัม สารสกัด ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนของสารสกัดไชน้ำ

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ เอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน มก BSA/กรัม สารสกัด
สารสกัดโปรตีน	0	24.67 ± 0.24^c
	5	54.25 ± 0.74^a
	10	48.34 ± 0.59^b
	15	47.59 ± 0.53^b
	0	16.08 ± 0.36^d
สารสกัดฟิลเตรท	5	13.26 ± 0.06^f
	10	14.44 ± 0.34^e
	15	16.35 ± 0.30^d
	-	7.76 ± 0.12^g

หมายเหตุ ตัวอักษรยกพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$

จากการทดลองวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดไชน้ำด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่าสารสกัดทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารสกัดหยาบฟีนอลิกที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 58.93 ± 1.03 มิลลิกรัม GAE/กรัม สารสกัด รองลงมา ได้แก่ สารสกัดฟิลเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 15 ยูนิต/มิลลิลิตร โดยมีค่าเท่ากับ 45.56 ± 0.46 มิลลิกรัม GAE/กรัม สารสกัด และสารสกัดสารสกัดฟิลเตรท มีค่าน้อยที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 31.89 ± 0.39 มิลลิกรัม GAE/กรัม สารสกัด ดังแสดงตารางที่ 2 มีรายงานการวิจัยของ ธัญญา สายโื้อะ, 2565 ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (หน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม โดยน้ำหนักแห้ง) จากไชน้ำของกระบวนการพริทรีดเมนต์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า ระยะเวลาย่อย 15, 30, 45 และ 60 นาที ที่ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสารประกอบฟีนอลิกในส่วนซูเปอร์เนเทนได้เท่ากับ 61.40 ± 0.00 , 80.32 ± 0.00 , 13.90 ± 0.00 และ 78.50 ± 0.01 มิลลิกรัม GAE/กรัม ตามลำดับ ขณะที่ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 2.0 ให้ค่าเท่ากับ 74.20 ± 0.65 , 71.80 ± 0.00 ,

81.60 $\pm$ 0.04 และ 85.90 $\pm$ 0.06 มิลลิกรัม GAE/กรัม ตามลำดับ ทั้งนี้ เวลาการย่อยสลายและความเข้มข้นของเอนไซม์มีผลต่อปริมาณฟีนอลิกรวมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เอนไซม์เซลลูเลสมีประสิทธิภาพในการสกัดสารฟีนอลิกน้อยกว่าการใช้เอทานอลร้อยละ 70 เนื่องจากกลไกการทำงานที่แตกต่างกัน เอนไซม์เซลลูเลสมีหน้าที่หลักในการย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืช การใช้เอนไซม์มีจุดมุ่งหมายเพื่อทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์ ทำให้สารประกอบภายในเซลล์ เช่น สารฟีนอลิกถูกปลดปล่อยออกมาได้ง่ายขึ้น ประสิทธิภาพของเอนไซม์จะจำเพาะเจาะจงต่อพันธะไกลโคซิดิกในเซลลูโลสเป็นหลัก และอาจมีผลกระทบต่อปลดปล่อยสารฟีนอลิกที่จับอยู่กับส่วนประกอบอื่น ๆ ของผนังเซลล์ เช่น ลิกนิน หรือเพกทิน ได้ไม่ดีเท่าที่ควร ในส่วนของเอทานอลร้อยละ 70 เป็นตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง ทำให้สามารถละลายสารประกอบที่มีความหลากหลายของขั้วได้ดี รวมถึงสารฟีนอลิกหลายชนิดที่มีทั้งส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้ว การใช้เอทานอลร้อยละ 70 ช่วยในการสกัดสารฟีนอลิกโดยการแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช ละลายสารประกอบเป้าหมายและนำออกมา การผสมกับน้ำจะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายสารฟีนอลิกที่มีความขั้วสูงได้ดีขึ้น (ภัทรพร ผูกคล้าย, 2553)

ตารางที่ 2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดใข้ น้ำ ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ เอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณฟีนอลิกรวม (มก. GAE/กรัม สารสกัด)
สารสกัดฟิลเตรท	0	31.89 $\pm$ 0.39 ^c
	5	32.91 $\pm$ 0.19 ^d
	10	43.13 $\pm$ 0.28 ^c
	15	45.56 $\pm$ 0.46 ^b
	-	58.93 $\pm$ 1.03 ^a
สารสกัดหยาบฟีนอลิก	-	

หมายเหตุ ตัวอักษรยกพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$

จากการทดลองวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดใข้ น้ำ ด้วยวิธี Aluminum Chloride พบว่าสารสกัดทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารสกัดหยาบฟีนอลิกที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 323.73 $\pm$ 1.93 มิลลิกรัม QE/กรัม สารสกัด รองลงมา ได้แก่ สารสกัดฟิลเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 15 ยูนิต/มิลลิลิตร โดยมีค่าเท่ากับ 86.85 $\pm$ 0.16 มิลลิกรัม QE/กรัม สารสกัด และสารสกัดฟิลเตรทที่มีค่าน้อยที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 69.01 $\pm$ 0.09 มิลลิกรัม QE/กรัม สารสกัด ดังแสดง ตารางที่ 3

การที่เอนไซม์เซลลูเลสมีประสิทธิภาพในการสกัดสารฟลาโวนอยด์น้อยกว่าการใช้เอทานอลร้อยละ 70 เนื่องจากกลไกการทำงานที่ต่างกัน เอนไซม์เซลลูเลสมีหน้าที่หลักในการย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืช การใช้เอนไซม์มีจุดมุ่งหมายเพื่อทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์ ประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับชนิดเอนไซม์และโครงสร้างของผนังเซลล์พืช เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วระดับปานกลาง ซึ่งสามารถละลายสารฟลาโวนอยด์ได้ดีโดยเฉพาะฟลาโวนอยด์ที่มีความเป็นขั้วน้อยหรือปานกลาง สามารถแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชและดึงสารออกมาได้มาก โดยไม่ต้องพึ่งการย่อยสลายผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ เอทานอลสามารถสกัดฟลาโวนอยด์ได้หลากหลายชนิด รวมถึงทั้งแบบอิสระและที่จับอยู่กับน้ำตาล (glycosides) (ภัทรพร ผูกคล้าย, 2553)

ตารางที่ 3 ปริมาณรวมของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดไข่น้ำ ด้วยวิธี Aluminum Chloride

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ เอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (มก. QE/กรัม สารสกัด)
สารสกัดฟิลเตรท	0	69.01±0.09 ^c
	5	72.94±0.19 ^d
	10	77.62±0.17 ^c
	15	86.85±0.16 ^b
สารสกัดหยาบฟีนอลิก	-	323.73±1.93 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรยกพิมพ์เล็กที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$

จากการทดลองวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay พบว่าสารสกัด สารสกัดฟิลเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 15 ยูนิต/มิลลิลิตร มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 7.51 ± 0.04 มิลลิกรัม TEAC/กรัม สารสกัด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yin, H., 2023 ได้ทำการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืช *Equisetum arvense* L. (EAL) หรือหญ้าหางม้า โดยใช้วิธีการทดสอบการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH-scavenging assay) เพื่อประเมินศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้ จากผลการทดลองแบบ factor-by-factor พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์จาก 0.2% เป็น 0.5% ค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์ในระดับที่เหมาะสมสามารถช่วยเร่งกระบวนการ

สลายผนังเซลล์ของพืช ส่งผลให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระถูกปลดปล่อยออกมาในปริมาณสูงขึ้น ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลโดยตรงต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเหง้าหางม้า สารสกัดฟิเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 10 ยูนิต/มิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 4.86 ± 0.08 มิลลิกรัม TEAC/กรัม สารสกัด สารสกัดฟิเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 5 ยูนิต/มิลลิลิตร ไม่แตกต่างกับสารสกัดหยาบฟีนอลิก ที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 4.37 ± 0.17 และ 4.42 ± 0.03 มิลลิกรัม TEAC/กรัม สารสกัดตามลำดับ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ตารางผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ เอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มก TEAC/กรัม สารสกัด
สารสกัดฟิเตรท	0	3.88 ± 0.04^d
	5	4.37 ± 0.17^c
	10	4.86 ± 0.08^b
	15	7.51 ± 0.04^a
สารสกัดหยาบฟีนอลิก	-	4.42 ± 0.03^c

หมายเหตุ ตัวอักษรยกพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$

จากการทดลองวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing-antioxidant power (FRAP) assay พบว่าสารสกัดใช้น้ำด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ไม่แตกต่างกับสารสกัดฟิเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 15 ยูนิต/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 56.97 ± 0.86 และ 54.92 ± 2.48 มิลลิกรัม TEAC/กรัม สารสกัด ตามลำดับ สารสกัดฟิเตรทที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส 5 ยูนิต/มิลลิลิตร แตกต่างกับสารสกัดฟิเตรท 10 ยูนิต/มิลลิลิตร และสารสกัดฟิเตรทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงตารางที่ 5 รายงานวิจัยของ ธัญญา สายโื้อะ, 2565 ได้ทำการวิเคราะห์ร้อยละความสามารถในการแย่งจับโลหะหนักของใช้น้ำผ่าน กระบวนการพรีทรีทเมนต์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสย่อยผนังเซลล์พืชพบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสร้อยละ 0.5 และ 2 ที่เวลาสกัด 60 นาที มีค่าร้อยละความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนักเท่ากับ 37.72 ± 1.39 และ 40.04 ± 0.80 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นความเข้มข้นของเอนไซม์มีอิทธิพลต่อการ

เปลี่ยนแปลงของความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP แสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลสช่วยสกัดทำให้ผนังเซลล์พืชแตกออกง่ายขึ้นสามารถเพิ่มความสามารถในการปลดปล่อยสารต้านอนุมูลอิสระออกมาในปริมาณมากขึ้น สารสกัดมีศักยภาพในการเป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) ที่สามารถเปลี่ยน Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Kapasakalidis et al., 2009)

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing-antioxidant power (FRAP) assay

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ เอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็ก เชิงซ้อน มก. TEAC/กรัม สารสกัด
รสกัดฟิลเตรท	0	34.32±1.65 ^d
	5	39.02±1.09 ^c
	10	42.06±1.04 ^b
	15	54.92±2.48 ^a
รสกัดหยาบฟีนอลิก	-	56.97±0.86 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรยกพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$

จากผลการวิจัยทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดโปรตีนไข่น้ำที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสช่วยสกัดให้ปริมาณโปรตีนรวมได้ดี และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง เนื่องจากการใช้เอนไซม์เซลลูเลสช่วยสกัดมีคุณสมบัติในการย่อยองค์ประกอบและสารสำคัญออกจากพืชที่ศึกษาเพื่อให้ได้ปริมาณสารสำคัญและผลผลิตสูงขึ้น ช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ โครงสร้างของผนังเซลล์จะถูกทำลายทำให้โปรตีนที่ถูกจับยึดอยู่ภายในเซลล์ละลายออกมาในสารละลายสกัดได้มากขึ้น (ทิพวรรณ ทองสุข, 2559) อีกทั้งเป็นวิธีการสกัดที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายเคมีที่ใช้ในการสกัดดำเนินการโดยใช้พลังงานและอุณหภูมิต่ำใช้ระยะเวลาการสกัดที่สั้นส่งผลให้การสกัดมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น (Zhao et al., 2016) วิธีนี้สามารถสกัดได้ทั้งโปรตีนและฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพร้อมกันได้ใน การสกัดครั้งเดียว ซึ่งเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบฟีนอลิกที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ให้ปริมาณฟีนอลิก รวมและฟลาโวนอยด์รวมในปริมาณสูง แต่ปริมาณโปรตีนรวมให้ค่าที่น้อยกว่ามากอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และสารอนุพันธ์ซึ่งมีวงแหวน เบนซีนอยู่ในสูตรโครงสร้าง จึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสภาพขั้วสูง เช่น เมทานอล เอทานอล แต่ละลายได้น้อย ในน้ำ หรือกล่าวได้ว่าสารดังกล่าวมีสภาพขั้ว (Polarity) ใกล้เคียงกับเอทานอลร้อยละ 70 จึงละลายในเอทานอลร้อยละ 70 ได้ดีกว่า (ภทราพร ผูกคล้าย, 2553) ดังนั้นการนำวิธีการสกัดด้วยการใช้เอนไซม์

ช่วยสกัด ถือว่าสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการสกัดโปรตีน และสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ หรือฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง หรือ อาหาร ต่อไปได้

ข้อเสนอแนะ

1. ผลการวิเคราะห์การประเมินสารประกอบฟีนอลิก องค์ประกอบโปรตีนและคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่พบในสารสกัดไข่น้ำ นำไปต่อยอดการวิจัยและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ในอนาคต
2. ในการศึกษาครั้งต่อไปควรศึกษาเกี่ยวกับชนิดของเอนไซม์อื่น ๆ ที่ใช้ในการสกัดให้หลากหลายชนิดมากยิ่งขึ้น

รายการอ้างอิง

- จุฬารรรณ ดอกไม้งาม. (2560). *การศึกษาการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากไข่น้ำและการประยุกต์ใช้สำหรับเครื่องสำอางประเภทเอนแคปซูเลชันอิมัลชัน* (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ทิพวรรณ ทองสุข. (2559). *การสกัดโปรตีนและน้ำตาลจากรำข้าวสาคัดน้ำมัน. นเรศวรวิจัยครั้งที่ 12: วิจัยและนวัตกรรมกับการพัฒนาประเทศ*. มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- ธัญญา สายโื้อะ. (2565). *ผลของการปรับสภาพและเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อสมบัติทางเคมีกายภาพและกิจกรรมทางชีวภาพของสารสกัดจากไข่น้ำ* (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- ภัทราพร ผูกคล้าย และธัญญรัตน์ เชื้อสะอาด. (2553). *การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระในพรอพอลิส*. มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่เฉลิมพระเกียรติ.
- ภานุมาศ ทองคำ. (2562). *ผลของอุณหภูมิต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในไข่ฟ้าแห้งและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร*. มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี.
- วชิราภรณ์ พูนัน. (2562). *วิธีการสกัดสารสกัดหยาบจากพรอพอลิสของชันโรงที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว*. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร.
- Appenroth, K.-J., Sree, K. S., Bog, M., Ecker, J., Seeliger, C., Böhm, ... Jahreis, G. (2018). Nutritional value of the duckweed species of the genus *Wolffia*. *Journal of Food Chemistry*, 252, 342–349.
- Baliyan, S., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R. P., . . . Chang, C. M. (2022). Determination of antioxidants by DPPH radical scavenging activity

- and quantitative phytochemical analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules*, 27(4), 1326.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Fattahi, S., Zabihi, E., Abedian, Z., Pourbagher, R., Ardekani, A. M., Mostafazadeh, A., & Akhavan-Niaki, H. (2014). Total phenolic and flavonoid contents of aqueous extract of stinging nettle and in vitro antiproliferative effect on HeLa and BT-474 cell lines. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 3(2), 102.
- Fernandes, R. D. P. P., Trindade, M. A., Tonin, F. G., Lima, C. G. D., Pugine, S. M. P., Munekata, P. E. S., . . . 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, 451–460.
- Garrigues, S., Armenta, S., & de la Guardia, M. (2010). Green strategies for decontamination of analytical wastes. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(7), 592–601.
- Iyer, A., Guerrier, L., Leveque, S., & others. (2022). High throughput method development and optimised production of leaf protein concentrates with potential to support the agri-industry. *Food Measure*, 16(1), 49–65.
- Kapasakalidis, P. G., Rastall, R. A., & Gordon, M. H. (2009). Effect of a cellulase treatment on extraction of antioxidant phenols from black currant (*Ribes nigrum* L.) pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(10), 4342–4351.
- Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30(1), 37–44.
- Siddiqui, N., Rauf, A., Latif, A., & Mahmood, Z. (2017). Spectrophotometric determination of the total phenolic content, spectral and fluorescence study of the herbal Unani drug Gul-e-Zoofa (*Nepeta bracteata* Benth). *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 12(4), 360–363.

Yin, H., Zhang, Y., Hu, T., Li, W., Deng, Y., Wang, X., . . . Yan, G. (2023).

Optimization of cellulase-assisted extraction of total flavonoids from *Equisetum* via response surface methodology based on antioxidant activity. *Processes*, 11(7), 1978.

Yadav, D., Barbora, L., Bora, D., Mitra, S., Rangan, L., & Mahanta, P. (2017).

An assessment of duckweed as a potential lignocellulosic feedstock for biogas production. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 119, 253–259.

Zhao, Y. M., Wang, J., Wu, Z. G., Yang, J. M., Li, W., & Shen, L. X. (2016). Extraction, purification and anti-proliferative activities of polysaccharides from *Lentinus edodes*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 136–144.

