รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล

ประจำปีงบประมาณ 2561

เรื่อง

ความสามารถในการอุ้มน้ำมันและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ผงเมล็ดแมงลัก

(Oil Holding Capacity and Antioxidant Activity of *Ocimum* Seed Powder Product)

โดย

ศจี น้อยตั้ง (Sajee Noitang)

ศรินทิพ สุกใส (Sarintip Sooksai)

เรืองวิทย์ สว่างแก้ว (Ruengwit Sawangkeaw)

วีระเดช สุขเอียด (Weradej Sukaead)

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

รายงานผลการวิจัยฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ เพราะได้รับการสนับสนุนทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2561 โดยได้รับการอนุมัติจาก รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ และคณะผู้บริหารสถาบันฯ ผู้ที่ให้โอกาสในการดำเนินการวิจัย รวมทั้งให้คำปรึกษาเพื่อให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี นอกจากนี้ทางสถาบันฯ ยังสนับสนุนทุนให้ไปดำเนินการเผยแพร่องค์ความรู้ผ่านช่องทางการประชุมวิชาการทั้งระดับชาติและนานาชาติ ทางคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ บุคลากร ช่าง และนิสิตของสถาบันฯ ที่มีส่วนสนับสนุนด้านต่างๆ ทั้งงานด้านเอกสารเพื่อให้งานวิจัยดำเนินการเสร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.อภิชาติ กาญจนทัต รองผู้อำนวยการสถาบันฯ และ นางสาวปภัสสรา แสงธนู ร่วมกับ นายอณุมาศ บัวเขียว และนางสาวธนพร วิชัย ที่ให้คำปรึกษา และความอนุเคราะห์สารเคมีต่างๆ ด้านการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ผงเมล็ดแมงลัก

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ ในการให้คำปรึกษาแนวทางในการนำผงเมล็ดแมงลักไปใช้ประโยชน์กับผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้เป็นอย่างดี

บัดนี้ คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงเป็นที่เรียบร้อย จึงขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างยิ่ง

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) เพื่อศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของผงเมล็ดแมงลัก ประกอบด้วย องค์ประกอบทางเคมี, ความสามารถในการอุ้มน้ำ และปริมาตรในการพองตัวเฉพาะ 2) เพื่อการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผงเมล็ดแมงลัก (*Ocimum* seed powder) ที่สกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต และตัวทำละลายต่างๆ โดยงานวิจัยนี้ ผงเมล็ดแมงลักที่นำมาศึกษา มี ความชื้น โปรตีน ไขมัน เส้นใยหยาบ เถ้า และคาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ 6.41, 16.87, 5.23, 32.15, 7.06 และ 32.29 ตามลำดับ) รวมถึงมีคุณสมบัติเด่นคือมีปริมาตรในการพองตัว (189.03 มิลลิลิตร/กรัม) และความสามารถในการอุ้มน้ำ (71.02 กรัม/กรัม) ผลของความสามารถในการอุ้มน้ำมันของผงเมล็ดแมงลักเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ ไคโตซาน กัมอะราบิก แซนแทนกัม และกัวร์กัม พบว่า ไคโตซานและกัมอะราบิกให้ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำมัน (2.94 กรัมน้ำมันต่อกรัมตัวอย่าง) สูงที่สุด โดยที่ผงเมล็ดแมงลักที่ยังไม่ผ่านการฆ่าเชื้อจะให้ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำมัน (2.76 กรัมน้ำมันต่อกรัมตัวอย่าง) มากกว่าผงเมล็ดแมงลักที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แซนแทนกรัม และ กัวร์กัม (2.65, 2.54 และ 2.38 กรัมน้ำมันต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ) เมื่อนำมาทำการสกัดสารด้วยวิธีดังนี้ น้ำกึ่งวิกฤต (121 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที 3 รอบ) และตัวทำละลายต่างๆ (โดยใช้ความเข้มข้นกรดไฮโดรคลอริกร้อยละ 1 ในน้ำ และ กรดไฮโดรคลอริกร้อยละ 0, 0.1 และ 1 ในเอทานอลร้อยละ 95) พบว่าน้ำกึ่งวิกฤตสามารถสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ (16.77 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมสารสกัด) และโปรตีน (ร้อยละ 7.01) ได้มากที่สุด รองลงมาคือ กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 1 ในน้ำ สามารถสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 10.81 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมสารสกัด และโปรตีนได้ร้อยละ 6.22) และเมื่อนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ดีพีพีเอส พบว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ความเข้มข้นกรดไฮโดรคลอริกร้อยละ 1 ในน้ำให้ค่าความเข้มข้นที่สารนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) ที่น้อยที่สุดคือ 0.002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (2 พีพีเอ็ม) แต่การสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตทำให้ค่า IC_{50} ของสารสกัดมากที่สุดคือ 4.405 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่าการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมาคือ การสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในน้ำ (48.42 และ 41.03 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ดี

คำสำคัญ ผงเมล็ดแมงลัก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ความสามารถในการอุ้มน้ำมัน วิธีวิเคราะห์ดีพีพีเอช

Abstract

This aims of research 1) to study various properties of *Ocimum* seed powder contains proximate composition, water holding capacity, specific swelling volume and oil holding capacity. 2) to testing the antioxidant activity of crude extracts of *Ocimum* seed powder extracted by subcritical water and solvent extractions. In this research, *Ocimum* seed powder contains moisture (6.41%), protein (16.87%), fat (5.23%), crude fiber (32.15%), ash (7.06%), and carbohydrate (32.29%). The prominent characteristics of *Ocimum* seed powder are high specific swelling volume (189.03 ml/g) and high water holding capacity (71.02 g/g). The results of *Ocimum* seed powder's oil holding capacity, in comparison to other products, including chitosan, gum arabic, xanthan gum and guar gum reveals that chitosan and gum arabic yield the highest oil holding capacity rate (2.94 g oil/g) while non-sterile *Ocimum* seed powder yields higher oil holding capacity rate (2.76 g oil/g) than the steriled *Ocimum* seed powder (2.65 g oil/g), xanthan gum (2.54 g oil/g) and guar gum (2.38 g oil/g). After further extracting of the *Ocimum* seed powder by subcritical water extraction (SWE, at 121 degree Celsius, for 60 minutes, 3 times) and various solvents (1% hydrochloric acid in water; 0, 0.1, and 1% hydrochloric acid in 95% ethanol), it was found that SWE provided the highest amount of polysaccharide (16.77 mg glucose/g crude extract) and protein (7.01%). Then, followed by the extraction using 1% hydrochloric acid in water (10.81 mg glucose/g crude extract and protein of 6.22%). After testing the antioxidative properties of the extracts, using DPPH assay, it was found that the extracts from using 1% hydrochloric acid in water yield the lowest half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) at 0.002 mg/ml (2 ppm). However, the SWE had the highest IC_{50} of 4.405 mg/ml. Analyzing the total phenolic compound revealed that the SWE yields the highest amount of the total phenolic compound, at 48.42 mg GAE/g crude extract. The extraction by 0.1% of hydrochloric acid in 95% ethanol for extraction had the total phenolic compound of 41.03 mg GAE/g crude extract. Phenolic compounds explicit the hydrophilic property.

Keywords: *Ocimum* seed fiber, Antioxidation, Oil holding capacity, DPPH assay

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)	ข
บทคัดย่อ	ค
Abstract	ง
สารบัญเรื่อง (Table of Contents)	จ
สารบัญตาราง (List of tables)	ฉ
สารบัญภาพ (List of Illustrations)	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย (List of Abbreviation)	ซ
บทนำ (Introduction)	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย และทบทวนวรรณกรรม	2
1.5 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป	6
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
เนื้อเรื่อง (Main Body)	
2.1 วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Methods)	8
2.2 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล (Results and Discussion)	16
สรุปและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Recommendation)	22
บรรณานุกรม (Bibliography)	23
ภาคผนวก (Appendix)	
ภาคผนวก ก	25
ภาคผนวก ข	30
ภาคผนวก ค	33
ประวัตินักวิจัยและคณะ	35

สารบัญตาราง (List of tables)

ที่		หน้า
1	องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดแมงลัก และผงเมล็ดแมงลัก	17
2	ความชื้นอิสระในอาหาร ปริมาตรในการพองตัวจำเพาะ และความสามารถในการอุ้มน้ำของเมล็ดแมงลักและผงเมล็ดแมงลัก	17
3	ปริมาณธาตุในตัวอย่างผงเมล็ดแมงลักด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS)	18
4	ปริมาณสารสกัดจากผงเมล็ดแมงลักด้วยตัวทำละลายและน้ำกึ่งวิกฤต	20
5	ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากผงเมล็ดแมงลัก	20
6	ค่า IC_{50} ของวิธีดีพีพีเอช ของสารสกัดจากผงเมล็ดแมงลัก	20
7	การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ	31

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

ที่		หน้า
1	การผลิตน าเมล็ดแมงลักออกจากฟ่อนแมงลักด้วยการประยุกต์ใช้เครื่อง Kubota	8
2	การบดหยาบเมล็ดแมงลัก	9
3	การสกัดเมล็ดแมงลักด้วยเครื่อง $SCCO_2$	9
4	การคัดแยกผงเมล็ดแมงลักที่เล็กกว่า 90 µm ด้วยเครื่อง cyclone	10
5	การบดผงเมล็ดแมงลักที่ขนาดใหญ่กว่า 90 µm ให้ได้ขนาด 100 mesh	10
6	การวัดค่าความชื้นอิสระในอาหาร (water activity : a_w)	11
7	การอุ้มน้ำมัน (Oil Holding Capacity : OHC)	12
8	การสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต	13
9	การสกัดด้วยตัวทำละลาย	13
10	สารสกัดจากผงเมล็ดแมงลักด้วยวิธีต่างๆ	14
11	ภาพรวมกระบวนการผลิตผงเมล็ดแมงลัก	16
12	การอุ้มน้ำมันของผลิตภัณฑ์ผงเมล็ดแมงลักเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด	19
13	กราฟมาตรฐานของ BSA	30
14	กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิค	30
15	กราฟมาตรฐานของกลูโคส	31
16	ปริมาณ Polysaccharide ในการสกัดจากผงเมล็ดแมงลักด้วยวิธีน้ำกึ่งวิกฤตในแต่ละรอบการสกัด	32

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย (List of Abbreviation)

$SCCO_2$	supercritical carbon dioxide
WHC	water holding capacity
OHC	oil holding capacity
ml/g	มิลลิกรัมต่อกรัม
g/g	กรัมต่อกรัม
w/w	น้ำหนักต่อน้ำหนัก
a_W	ความชื้นอิสระในอาหาร (water activity)
^oC	องศาเซลเซียส
pH	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
µm	ไมครอน/ไมโครเมตร
%	เปอร์เซนต์
IC_{50}	ค่าความเข้มข้นที่สารนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ร้อยละ 50
Oz	ออนซ์
BSA	อัลบูมิน (bovine serum albumin)

บทนำ (Introduction)

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

แมงลัก (*Ocimum canum* หรือ *Ocimum americanum*) เป็นพืชสมุนไพรที่มีประโยชน์อย่างกว้างขวาง ใบ และยอดอ่อนใช้รับประทานสด เมล็ดใช้แช่น้ำให้พองตัวแล้วบริโภคเป็นอาหารหวาน ใช้เป็นอาหารเสริมช่วยระบายท้องอ่อนๆ โดยสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ทำการยื่นขอจดสิทธิบัตรตั้งแต่ปี พ.ศ.2550 เรื่อง “กรรมวิธีการผลิตผงเมล็ดแมงลักที่มีไขมันต่ำ” (Process for the production of *Ocimum canum* seed powder with low fat content) ซึ่งจะมีประโยชน์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารผสมแมงลักรูปแบบใหม่ๆ และมีศักยภาพในการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ โดยจะนำเมล็ดแมงลักมากะเทาะให้แตกแล้วจึงนำไปสกัดน้ำมันออกด้วยเครื่อง supercritical carbon dioxide ที่ความดันและอุณหภูมิที่เหมาะสม หลังจากนำแมงลักที่สกัดน้ำมันมาทำการแยกขนาดที่เล็กกว่า 90 µm ออก แล้วจึงนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 100 mesh จะได้เป็นผงเมล็ดแมงลักที่มีไขมันต่ำ นอกจากความสามารถในการพองตัวและช่วยในการเป็นยาระบายอ่อนๆ เพื่อใช้สำหรับเป็นผลิตภัณฑ์อาหารของผงเมล็ดแมงลักไขมันต่ำ โดยผงเมล็ดแมงลักที่ผ่านกรรมวิธีการสกัดด้วย คาร์บอนไดออกไซด์ภายใต้สภาวะวิกฤติยวดยิ่ง (supercritical carbon dioxide extraction: $SCCO_2$) แบบไม่คัดแยกขนาดมีองค์ประกอบดังนี้ โปรตีน (20.16%) ไขมัน (1.18%) เส้นใย (34.46) เถ้า (8.01%) และคาร์โบไฮเดรต (36.19%) โดยเส้นใยของเมล็ดแมงลักจะเป็นมิวสิเลจ (mucilage) ซึ่งคือโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรคอยลอยด์ โดยในปัจจุบันมีการศึกษาการสกัดมิวสิเลจของเมล็ดแมงลักอย่างหลากหลายวิธีโดยมีการใช้สารเคมีและน้ำในการสกัดและยังใช้อุณหภูมิรวมถึงเวลาในการทำแห้งเพื่อให้ได้ผงมิวสิเลจที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา เพื่อใช้เป็นสารเพิ่มการคงตัว (stabilizer) สารเพิ่มความหนืด (thickener) สารที่การแขวนตะกอน (suspending agent) และตัวเชื่อมในผลิตภัณฑ์ยาเม็ด (binder in tablets/ binding agent) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยเกี่ยวกับเมล็ดแมงลักเรื่องคุณสมบัติในการดูดซับสี รวมถึงการสกัดสารเมือกด้วยวิธีการทำให้พองตัวและแยกส่วนของสารเมือกมาผ่านกระบวนต่างๆ หลายขั้นตอนที่ต้องใช้เวลาและอุณหภูมิในการอบแห้ง เมื่อนำมาทดสอบการอุ้มน้ำมัน พบว่ามีประสิทธิภาพในการดูดซับได้ถึง 3 g oil/ g sample แต่เนื่องจากขบวนการมีการใช้น้ำ อุณหภูมิ และใช้เวลาค่อนเข้างมาก

ดังนั้น ทางคณะผู้วิจัยเห็นว่า ผงเมล็ดแมงลัก เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีกระบวนการผลิตที่ไม่ผ่านขั้นตอนการใช้น้ำทำให้ไม่เกิดของเสียเหลือทิ้ง โดยที่จะไม่เสียเวลาในการพองตัวและทำแห้งที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และเส้นใยที่มีคุณสมบัติเด่นเฉพาะในการพองตัวสูง และการอุ้มน้ำจะยังคงมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับเมล็ดแมงลัก โดยทางคณะผู้วิจัยจะทำการศึกษาปัจจัยในการอุ้มน้ำมันและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของผงเมล็ดแมงลักเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้าอื่นๆ เพื่อจะทำให้เพิ่มคุณค่าของเมล็ดแมงลักซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีแหล่งผลิตในประเทศไทย โดยแนวทางการนำไปใช้ประโยชน์ของผงเมล็ดแมงลักจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำไปทดแทนผลิตภัณฑ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ เช่น mucilin หรือ ทดแทนผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ เช่น chitosan สำหรับผู้บริโภคที่เลี่ยงผลิตภัณฑ์ทางอาหารทะเล ที่นำมาใช้เป็นส่วนประกอบต่างๆ ของอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น อาหาร และ ยา หรือพวกกัมต่างๆ เป็นต้น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ศึกษาความสามารถในการอุ้มน้ำมันของเส้นใยของผงเมล็ดแมงลัก รวมทั้งการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเส้นใยทางเลือกให้แก่ผู้บริโภค

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

คณะผู้วิจัยจะดำเนินการผลิตผงเมล็ดแมงลักผ่านกรรมวิธี supercritical carbondioxide แล้วนำมาทำการทดสอบคุณลักษณะการอุ้มน้ำมัน (กรัมน้ำมันต่อกรัมผลิตภัณฑ์ : g oil/ g sample) และทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้จะทำการเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้าในปัจจุบัน เช่น chitosan หรือผลิตภัณฑ์อื่นๆ

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย และทบทวนวรรณกรรม

ปัจจุบันประชาชนจำนวนมากใส่ใจสุขภาพ นอกจากอาหารมื้อหลักที่ต้องรับประทานในแต่ละวันแล้ว ประชาชนเริ่มหันไปบริโภคอาหารเสริมที่มีองค์ประกอบของสารมีประโยชน์ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ สารเสริมเส้นใยอาหาร สารคลอลาเจน เป็นต้น

อนุมูลอิสระเป็น สารที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) กับโมเลกุลต่างๆ ภายในเซลล์ร่างกายหรือเรียกอีกอย่างว่า reactive oxygen species (ROS) หมายความรวมถึงสารประกอบเพอร์ออกไซด์ (Peroxides) เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และสารอนุมูลอิสระ (free radicals) ซึ่งเป็นโมเลกุลหรืออิออนที่มีอิเลคตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอกชนิดที่สำคัญคือ อนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน (superoxide anion) และอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) เมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นจะเกิดการทำลายโมเลกุลอื่นๆ ต่อเนื่องกันเป็นลูกโซ่ส่งผลให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อร่างกายเป็นสาเหตุของการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ เช่น โรคหัวใจขาดเลือด ต้อกระจก ความดันโลหิตสูง อัลไซเมอร์ เบาหวาน มะเร็ง เป็นต้น ปกติภายในร่างกายของเรามีกลไกป้องกันการโจมตีจากอนุมูลอิสระโดยอาศัยการทำงานของสารหรือเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นในร่างกาย เช่น เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase) คะตาเลส (catalase) กลูตาไทโอนเพอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) เป็นต้น แต่การทำหน้าที่ของสารหรือเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระนั้นยังไม่เพียงพอและมีขีดจำกัด ประกอบกับเมื่ออายุมากขึ้นร่างกายสร้างสารหรือเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระได้น้อยลง ดังนั้นร่างกายจึงควรรับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกด้วยเช่นกัน ในปัจจุบันผู้รักสุขภาพจำนวนมากนิยมบริโภคสารต้านอนุมูลอิสระทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมประเภทสารต้านอนุมูลอิสระมีหลากหลายและเป็นที่ต้องการของตลาด (ดวงกมล, 2557)

สารต้านอนุมูลอิสระหรือสารแอนติออกซิแดนท์ (antioxidants) ที่เรารู้จักกันดี ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี วิตามินเอ ลูทีน (lutein) และพฤกษเคมีต่างๆ (phytochemical) เช่น โพลีฟีนอล (polyphenols) ไอโซฟลาโวน (isoflavone) เบต้าแคโรทีน (β-carotene) คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) เป็นต้น สามารถพบสารเหล่านี้ได้จากพืช ผัก และผลไม้ที่มีอยู่ตามธรรมชาติหรืออาจพบได้ในสาหร่ายและยีสต์ เช่น สารแอสตาแซนธิน (Machmudah, S. et. al., 2006) (Thana, P. et. al. 2008) แต่การที่จะรับประทานพืชหรือ

ผักเหล่านี้ในปริมาณมากคงเป็นไปได้ยากจึงต้องทำการสกัดหรือดึงสารเหล่านี้ออกมาทำให้เข้มข้นและอยู่ในรูปแบบที่รับประทานได้ง่าย เช่น แคปซูล หรือเม็ด

วิธีการสกัดที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญต่อการสกัดสารที่มีประโยชน์ที่มีฤทธิ์ของการต้านอนุมูลอิสระ วิธีการสกัดสารแบบดั้งเดิมเป็นวิธีการสกัดที่ง่ายแต่สิ้นเปลืองตัวทำละลาย ได้แก่ การสกัดโดยชุดซอกห์เลต (soxhlet) การสกัดด้วยวิธีการแช่ (maceration) นอกจากนี้ยังมีวิธีการสกัดโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงร่วมด้วยในการสกัด (ultrasound-assisted extraction, UAE) ใช้หลักการของคุณสมบัติสารในการเกิดฟองก๊าซที่มีแรงดันสูง และวิธีการสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมด้วยในการสกัด (microwave-assisted extraction, MAE) ซึ่งจะใช้คุณสมบัติของตัวทำละลายในการต้านทานคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าเมื่อวางอยู่ในบริเวณที่มีสนามแม่เหล็กไฟฟ้า และในปัจจุบันได้มีการพัฒนาการสกัดวิธีใหม่ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและเป็นที่นิยมเนื่องจากง่ายต่อการแยกตัวทำละลายออกเมื่อสกัดเสร็จสมบูรณ์ คือ วิธีการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤติ (subcritical water extraction, SWE) และวิธีการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ภายใต้สภาวะวิกฤติยวดยิ่ง (supercritical carbon dioxide extraction, SC-CO_2) โดยถือว่าการสกัด 2 วิธีนี้ปราศจากการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นเทคโนโลยีสะอาดหรือ green technology ซึ่งเป็นที่นิยมมากในปัจจุบัน ปัจจุบันวิธีนี้ใช้กันแพร่หลายเนื่องจากให้ประสิทธิภาพในการสกัดที่ดีเมื่อเทียบกับวิธีการสกัดประเภทอื่นๆ และสามารถสกัดสารได้หลายประเภทอีกทั้งยังสามารถแยกตัวทำละลายออกจากสารที่สกัดทันที นอกจากนี้วิธีนี้จะใช้ในการสกัดสารมีคุณค่าแล้วยังสามารถเปลี่ยนและย่อยสารบางชนิดให้เป็นสารที่มีคุณประโยชน์มากกว่าได้อีก เช่น สาร hesperidin ไปเป็น hesperitin (Ruen-ngam, D. et. al., 2012)

โดยเมล็ดแมงลักเป็นแหล่งเส้นใยในอาหารซึ่งมีอยู่ในปริมาณสูงถึงร้อยละ 35 ในน้ำหนักแห้ง โดยมีคุณสมบัติในการพองตัวสูงถึง 50 ml/g (ศรินทิพ และคณะ, 2552) โดยเส้นใยอาหาร (dietary fiber) ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตจากพืช ทั้งในรูปของโอลิโกแซ็กคาไรด์และโพลีแซ็กคาไรด์ ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส สารประกอบเพคติน กัม แป้งที่ทนต่อการย่อย (resistant starch) อินนูลิน และ ลิกนิน (Elleuch, M., et. al., 2011) ไม่สามารถถูกย่อยได้ในลำไส้เล็กของมนุษย์ แต่อาจถูกย่อยได้บางส่วน หรือถูกย่อยได้ทั้งหมดในลำไส้ใหญ่ให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันชนิดสายสั้น ซึ่งช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค และยังช่วยกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้ เพิ่มความชื้นของอุจจาระทำให้ระบบขับถ่ายเป็นปกติ ดังนั้นจึงช่วยในการกำจัดสารพิษต่างๆ ที่อาจเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่ได้ด้วย ซึ่งเส้นใยในผลไม้และธัญพืชมีความสามารถในการจับน้ำ และความสามารถในการจับน้ำมัน โดยในผลไม้จะสูงกว่าเส้นใยอาหารจากธัญพืช (นุชนาฏ, 2549)

โดยผลิตภัณฑ์ที่มีการนำมาใช้ในท้องตลาดเป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additive) มีหลากหลาย เช่น

1. ไคโตซาน (Chitosan) โดยไคทิน (Chitin) เป็นวัตถุดิบเพื่อสกัด ไคโทซาน มีสมบัติย่อยสลายได้ง่าย ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ละลายได้ดีในสารละลายกรดอินทรีย์เจือจาง และจับกับไอออนของโลหะได้ดี โดยสารละลายไคโทซาน สามารถจับตัวเป็นไฟเบอร์หรือเป็นเยื่อบางๆ มีประจุบวกที่สามารถเคลือบติดกับผิวของเปลือกของผลไม้ได้ มีสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้หลายชนิด การใช้ไคโทซานเคลือบผิวผลไม้ เช่น มังคุดสามารถป้องกันการระเหยของน้ำทำให้มังคุดชุ่มชื้น และยังสามารถป้องกันการทำปฏิกิริยาโดยตรงกับออกซิเจนในอากาศกับเปลือกมังคุด ซึ่งสามารถรักษาสีของมังคุดไม่ให้ซีดจางไป และเป็นสารธรรมชาติซึ่งไม่มีผลข้างเคียงกับทั้งสิ่งแวดล้อมและผู้ใช้ ถึงแม้มีการเคลือบสารตัวนี้ไปแล้ว สามารถล้างออกได้ด้วยน้ำเปล่าหรือไม่ล้างก็ไม่มีผลกระทบต่อร่างกาย

แต่ไคโทซานมีผลิตได้จากแต่ละชนิดของทั้งกุ้ง ปู และปลาหมึก จะเหมาะกับวัตถุประสงค์แตกต่างกัน เช่น ต้องการนำสารละลายนำไปเคลือบหรือฉีดพ่น ใช้ลดหรือนำไปดักจับโลหะหนักในการผลิตน้ำผลไม้ หรือไวน์ให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ ไคโตซาน มีความเป็นด่าง มีความสามารถในการดูดจับไขมัน (Fats) หรือไขมัน (Lipids) ในทางเดินอาหารได้อย่างประสิทธิภาพ แต่ก็มีผลข้างเคียงคือ สามารถจับวิตามินที่ละลายในไขมันได้ดี เช่น วิตามินเอ วิตามินดี วิตามินอี และวิตามินเค เป็นต้น

2. แซนแทนกัม (Xanthan gum) เป็นกัม (gum) ซึ่งเป็นสารไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) ชนิดหนึ่งใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additive) สกัดได้จากเมือก (slime) ที่สร้างโดย แบคทีเรีย Xanthomonas campestris ซึ่งมักพบในกะหล่ำปลีและกระหล่ำดอก โมเลกุลของแซนแทนกัม เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ประเภท heteropolysaccharide ที่เป็นสายพอลิเมอร์ของ β-D-glucose มีโครงสร้างคล้ายกับเซลลูโลส (cellulose) แต่ทุกๆ 2 โมเลกุลของกลูโคส (glucose) เชื่อมต่อกับกิ่งของ trisaccharide ที่เกิดจากน้ำตาลแมนโนส (mannose) 2 โมเลกุล และกรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) 1 โมเลกุล โมเลกุลของแมนโนสที่อยู่ติดกับสายหลักมีเอสเทอร์ของกรดแอซีติกที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 และแมนโนส ที่ตำแหน่งปลายของ trisaccharide มีกรดไพรูวิกเชื่อมต่ออยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และ 6

โดยการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร เพื่อเป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additive) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็น thickening agent ทำให้อาหารมีความข้น ความหนืด (viscosity) ทนความร้อนได้สูง ทำให้อาหารคงรูป (stabilizer) น่ารับประทาน มันวาว โดยมักใช้ xanthan gum ผสมกับกัวร์กัม (guar gum) เพื่อเพิ่มความหนืดดีกว่าใช้เดี่ยว ใช้ทดแทนไขมัน (fat replacer) ในอาหารแคลอรีต่ำ ใช้เป็นสารก่อโฟม (foaming agent) ป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งในอาหารแช่เยือกแข็ง (Sharma B.R., et al., 2006)

3. กัวร์กัม (Guar gum) อาจเรียกว่า guar flour หรือ gum cyamopsis เป็นไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) ประเภท พอลิแซ็คาไรด์ (polysaccahride) ที่สกัดได้จากเนื้อในเมล็ด (endosperm) ของเมล็ดกัว (Cyamopsis tetragonolobus) ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดียและปากีสถาน กัวกัมเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) ประเภทเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกาแล็กโทแมนแนน (galactomannan) ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลแมนโนส (mannose) ต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic bond) ที่ตำแหน่ง บีตา-1,4แ ละมีกิ่งแขนงของน้ำตาลกาแล็กโทส (galactose) ซึ่งต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ที่ตำแหน่งแอลฟา-1,6 กัวกัมที่สกัดได้และผ่านการทำแห้ง มีลักษณะเป็นผง ละลายได้ดีในน้ำเย็น มีสีขุ่น มีโปรตีนและเซลลูโลส (cellulose) เป็นองค์ประกอบเล็กน้อย กัวกัมใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additive) หน้าที่ในอาหารใช้เป็นสารที่ทำให้อิมัลชันคงตัว (emulsifier) ทำให้อาหารข้นหนืด (thickening agent) เป็น prebiotic เป็นอาหารของแบคทีเรีย probiotic ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายในลำไส้ใหญ่ ใช้ใน functional food

4. กัมอะราบิก (Gum arabic) อาจเรียกว่า กัมอะคาเซีย (Gum acacia) เป็นกัม (gum) เป็นคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) เป็นสารในกลุ่มไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) ประเภท พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ประเภทเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) ที่ใช้เพื่อเป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additive) acacia หรือ gum arabic เป็นยาง (exudate) ที่ได้จากต้นไม้สกุล อะคาเซีย (acacia) เช่น Acacia senegal และ Acacia seyal น้ำยางจะไหลเกาะกันเป็นก้อน เมื่อกระทบกับความร้อนจากแสงแดดจะแห้งแข็งตัว มีลักษณะใส

คล้ายแก้วเกาะอยู่ตามกิ่งก้านและลำต้นของพืช มีสีสันแตกต่างกันไปตั้งแต่สีขาวใสจนถึงสีเหลืองอำพัน รูปทรงมองดูคล้ายหยดน้ำบ้าง ทรงกลมรีบ้าง ผลิตภัณฑ์ที่นำมาใช้ได้จากการนำก้อนยางมาบดให้เป็นผงละเอียด โครงสร้างโมเลกุล ของ gum arabic เป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ และซับซ้อน ประกอบด้วยน้ำตาลและอนุพันธ์ของน้ำตาล 4 ชนิดคือ น้ำตาลกาแล็กโทส (galactose, 44%) แอราบิโนส (arabinose, 27%) แรมโนส (L-rhamnose,13%) กรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid, 14.5%) นอกจากนี้ในโมเลกุลยังประกอบด้วยกรดแอมิโนได้แก่ ไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) และซีรีน (serine) โดยกัมอะราบิก ละลายในน้ำได้ดี ไม่ละลายในน้ำมันและสารประกอบอินทรีย์ ให้ความหนืดต่ำ โดยใช้เพื่อทำให้อิมัลชันคงตัว (emulsifier) สารเพิ่มปริมาณ (Bulking agent) สารเพิ่มความข้นหนืด (thickening agent) สารเพิ่มความคงตัว (stabilizing agent) ป้องกันการตกผลึกของน้ำตาล ชะลอการเกิดกลิ่นหืน เป็นต้น

นอกจากการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ หรือการนำมาใช้ในวัตถุเจือปนในอาหาราจ มีอีกคุณสมบัติที่น่าสนใจ คือ

การดูดติดผิว (Adsorption) เป็นกระบวนการกักพวกสารละลายหรือสารแขวนลอยขนาดเล็กซึ่งละลายอยู่ในน้ำให้อยู่บนผิวของสารอีกชนิดหนึ่ง โดยที่สารละลายหรือสารแขวนลอย ขนาดเล็กนี้เรียกว่า Adsorbate ส่วนของแข็งที่มีผิวเป็นที่เกาะจับของสารที่ถูกดูดติดเรียกว่า Adsorbent การดูดติดผิวนี้จะเป็นการดูดติดแบบระหว่างสถานะ (Phase) ต่างๆทั้งสามสถานะ คือ ของเหลว (Liquid) ก๊าซ (Gas) และ ของแข็ง (Solid) ซึ่งมีได้ทั้งแบบของเหลว- ของเหลว ก๊าซ-ของเหลว ก๊าซ-ของแข็ง และ ของเหลว-ของแข็ง โดยในที่นี้จะพิจารณาถึงเฉพาะแบบของเหลว-ของแข็ง (Liqid –Solid Interface)

ในการดูดติดผิวโมเลกุลของสารละลายหรือสารแขวนลอยก็จะถูกกำจัดออกจากน้ำและไปเกาะติดอยู่บนตัวดูดซับ โมเลกุลของสารส่วนใหญ่จะเกาะจับอยู่กับผิวภายในโพรงของตัวดูดซับและมีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่เกาะอยู่ที่ผิวภายนอก การถ่ายเทโมเลกุลจากน้ำไปหาตัวดูดซับเกิดขึ้นได้จนถึงสมดุลจึงหยุด ณ จุดสมดุล ความเข้มข้นของโมเลกุลในน้ำจะเหลือน้อยเพราะโมเลกุลส่วนใหญ่เคลื่อนที่ไปเกาะจับอยู่กับตัวดูดซับโดยในการเกาะติดจะมี Driving Force อยู่ 2 แบบ คือ การดูดซับทางกายภาพ และการดูดซับทางเคมี

ประเภทของการดูดซับ

ปัจจัยสำคัญในการบอกชนิดของกระบวนการดูดซับจะพิจารณาจากแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลที่ถูกดูดซับกับผิวของสารดูดซับ ถ้าแรงยึดเหนี่ยวเป็นแรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals Forces) จะเป็นการดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) แต่ถ้าแรงยึดเหนี่ยวทำให้เกิดพันธะเคมีระหว่างโมเลกุลที่ถูกดูดซับกับผิวของสารดูดซับจะเรียกว่า การดูดซับทางเคมี (chemical adsorption)

- การดูดซับทางกายภาพ เป็นการดูดซับที่เกิดจากแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลอย่างอ่อน คือ แรงแวนเดอร์วาลส์ (Vander Waals Forces) ซึ่งเกิดจากการรวมแรง 2 ชนิด คือ แรงกระจาย (London dispersion force) และแรงไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic force) การดึงดูดด้วยแรงที่อ่อนทำให้การดูดซับประเภทนี้มีพลังงานการคายความร้อนค่อนข้างน้อย คือ ต่ำกว่า 20 กิโลจูลต่อโมลและสามารถเกิดการผันกลับของกระบวนการได้ง่าย ซึ่งเป็นข้อดี เพราะสามารถฟื้นฟูสภาพของตัวดูดซับได้ง่ายด้วย สารที่ถูกดูดซับสามารถเกาะอยู่รอบ ๆ ผิวของสารดูดซับได้หลายชั้น (multilayer) หรือในแต่ละชั้นของโมเลกุลสารถูกดูดซับจะติดอยู่กับชั้นของโมเลกุลของสารถูกดูดซับในชั้น

ก่อนหน้านี้ โดยจำนวนชั้นจะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารถูกดูดซับ และจะเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้นของตัวถูกละลายในสารละลาย

- การดูดซับทางเคมี การดูดซับประเภทนี้เกิดขึ้นเมื่อตัวถูกดูดซับกับตัวดูดซับทำปฏิกิริยาเคมีกัน ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของตัวถูกดูดซับเดิม คือมีการทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างอะตอมหรือกลุ่มอะตอมเดิมแล้วมีการจัดเรียงอะตอมไปเป็นสารประกอบใหม่ขึ้น โดยมีพันธะเคมีซึ่งเป็นพันธะที่แข็งแรง มีพลังงานกระตุ้นเข้ามาเกี่ยวข้องทำให้ความร้อนของการดูดซับมีค่าสูงประมาณ 50-400 กิโลจูลต่อโมล หมายความว่าการกำจัดตัวถูกดูดซับออกจากผิวตัวดูดซับจะทำได้ยาก คือไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาผันกลับได้ (irreversible) และการดูดซับประเภทนี้จะเป็นการดูดซับแบบชั้นเดียว (monolayer) เท่านั้น ซึ่งการดูดซับทางกายภาพและทางเคมีมีข้อแตกต่างกันหลายอย่าง

ดังนั้น เมล็ดแมงลักมาผ่านกรรมวิธีการผลิตด้วย supercritical carbon dioxide พบว่าผงเมล็ดแมงลักมีค่าความพองตัวสูงขึ้น 4-5 เท่าของเมล็ดแมงลักก่อนทำการสกัด ซึ่งจากคุณสมบัติดังกล่าวนำมาประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ โดยเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้าอื่นๆ เช่น mucilin (ผลิตภัณฑ์นำเข้าจากต่างประเทศ) สำหรับผู้บริโภคที่ต้องการนำไปใช้เพิ่มเส้นใยในระบบทางเดินอาหาร หรือนำไปพัฒนากับผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆ โดยคณะผู้วิจัยเล็งเห็นว่างานวิจัยคุณสมบัติการอุ้มน้ำมันของเส้นใย รวมถึงการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของตัวผงเมล็ดแมงลัก จะช่วยเพิ่มคุณสมบัติที่บ่งชี้ความสำคัญและคุณประโยชน์ของผลิตภัณฑ์ผงเมล็ดแมงลัก เพื่ออาจนำไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมอาหารและยา เพื่อเป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additive) ทั้งนี้เมล็ดแมงลักยังเป็นวัตถุดิบที่มีอยู่ในประเทศหากมีข้อมูลงานวิจัยดังกล่าวจะมีการต่อยอดงานวิจัยสู่อุตสาหกรรมในอนาคตได้ ซึ่งจะสนับสนุนพืชเศรษฐกิจของไทยและยังเป็นเพิ่มคุณค่าของสินค้าพื้นเมืองหรือท้องถิ่น และสามารถลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศได้อีกด้วย

1.5 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป

1.5.1 รวบรวมข้อมูลต่างๆ และจัดหาผลิตภัณฑ์ทางการค้าอื่นๆ และทำการจัดซื้อวัตถุดิบ (เมล็ดแมงลัก) ที่ผ่านกระบวนการฝัดแห้ง

1.5.2 นำเมล็ดแมงลักที่สะอาดผ่านกระบวนการบดหยาบ

1.5.3 ทำการสกัดน้ำมันด้วย supercritical carbon dioxide ที่สภาวะที่เหมาะสม

1.5.4 แยกส่วนที่เล็กกว่า 90 µm ออกด้วยเครื่อง cyclone ขนาด sieve 90 µm เนื่องจากเป็นส่วนของโปรตีนสูงและปริมาณเส้นใยต่ำ

1.5.5 นำส่วนที่มีขนาดใหญ่กว่า 90 µm ซึ่งเป็นส่วนที่มีเส้นใยสูงมาลดขนาด ด้วยเครื่องบดขนาดรูตะแกรง 100 mesh (ผงเมล็ดแมงลัก)

1.5.6 นำผลิตภัณฑ์ผงเมล็ดแมงลักมาทำการตรวจสอบคุณสมบัติปริมาตรการพองตัวจำเพาะ ความสามารถในการอุ้มน้ำ และความสามารถในการอุ้มน้ำมันของผงเมล็ดแมงลัก และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

1.5.7 สรุปผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล

1.5.8 เขียนรายงานความก้าวหน้าและฉบับสมบูรณ์

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลที่ได้จะเป็นการเพิ่มคุณค่าเพื่อเป็นทางเลือกให้กับผู้บริโภคที่ต้องการอาหารที่ดีต่อสุขภาพ นอกจากนี้ยังเป็นองค์ความรู้ให้กับผู้ผลิตในการนำไปใช้ประโยชน์หรือประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อื่นๆ ในเชิงอุตสาหกรรม และเผยแพร่ผลงานตีพิมพ์ในงานวารสารหรืองานประชุมวิชาการระดับชาติ/นานาชาติ

เนื้อเรื่อง (Main Body)

2.1 วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Methods)

2.1.1 รวบรวมข้อมูลต่างๆ และจัดหาผลิตภัณฑ์ทางการค้าอื่นๆ และทำการจัดซื้อวัตถุดิบ (เมล็ดแมงลัก) ที่ผ่านกระบวนการฝัดแห้ง

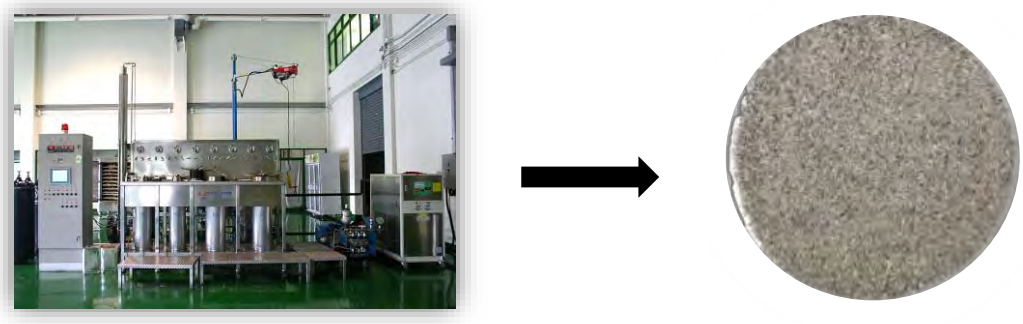
รูปที่ 1 การผลิตนำเมล็ดแมงลักออกจากฟ่อนแมงลักด้วยการประยุกต์ใช้เครื่อง Kubota

คณะผู้วิจัยได้มีการประสานงานกับทางบริษัท รอยัลไทยซีด จำกัด ซึ่งเป็นบริษัทฯ ที่มีการรับการถ่ายทอดเทคโนโลยีกระบวนการผลิตเมล็ดแมงลักแบบฝัดแห้ง จากทางสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้นำกระบวนการดังกล่าวไปปรับใช้ในการผลิตเมล็ดแมงลักของเกษตรกรในจังหวัดสุโขทัย โดยให้ใช้น้ำค้างที่เกิดขึ้นระหว่างการรอนวดฝัด ด้วยเครื่องที่ดัดแปลงจากเครื่อง Kubota (รูปที่ 1)

2.1.2 นำเมล็ดแมงลักที่สะอาดผ่านกระบวนการบดหยาบ โดยการเตรียมนำเมล็ดแมงลักเข้าเครื่อง Three roll mill เพื่อทำให้เมล็ดแตก (รูปที่ 2)

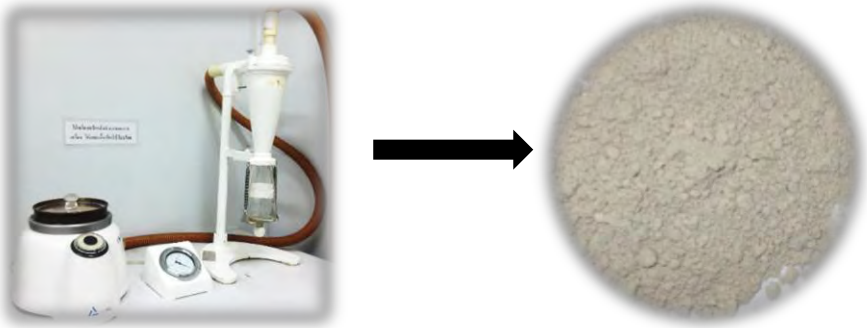
รูปที่ 2 การบดหยาบเมล็ดแมงลัก

2.1.3 ทำการสกัดน้ำมันด้วย supercritical carbon dioxide ($SCCO_2$) ที่สภาวะที่เหมาะสม โดยใช้เมล็ดแมงลักบดหยาบ 8 Kg ต่อการสกัด 1 ครั้ง ใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง อุณหภูมิ 60°C ความดัน 275 bar (รูปที่ 3)



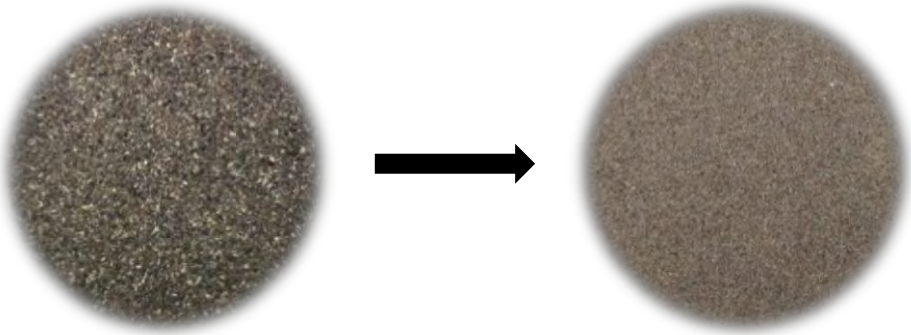
รูปที่ 3 การสกัดเมล็ดแมงลักด้วยเครื่อง $SCCO_2$

2.1.4 เมื่อได้เมล็ดแมงลัก defat ให้ทำการแยกส่วนที่เล็กกว่า 90 µm ออกด้วยเครื่อง cyclone ขนาด sieve (รูตะแกรง) 90 µm เนื่องจากเป็นส่วนของผงเมล็ดแมงลักที่มีปริมาณโปรตีนสูงและส้นใยต่ำ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 การคัดแยกผงเมล็ดแมงลักที่เล็กกว่า 90 µm ด้วยเครื่อง cyclone

2.1.5 นำส่วนที่มีขนาดใหญ่กว่า 90 µm ซึ่งเป็นส่วนที่มีเส้นใยสูงมาลดขนาด ด้วยเครื่องบดขนาดรูตะแกรง 100 mesh จะได้ผงเมล็ดแมงลัก (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 การบดผงเมล็ดแมงลักที่ขนาดใหญ่กว่า 90 µm ให้ได้ขนาด 100 mesh

2.1.6 นำผลิตภัณฑ์ผงเมล็ดแมงลักมาทำการทดสอบคุณสมบัติการพองตัว อุ้มน้ำ และทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำมันของผงเมล็ดแมงลัก

2.1.6.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (AOAC, 1995)

โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณร้อยละความชื้น โปรตีน ไขมัน เส้นใยหยาบ เถ้า และคาร์โบไฮเดรต ในเมล็ดแมงลักและผงเมล็ดแมงลัก

2.1.6.2 การวิเคราะห์หาความชื้นอิสระในอาหาร (Water activity : a_w) ด้วยเครื่อง Thermo-Hygrometer รุ่น testo 605-H1

โดยใช้ตัวอย่างในการวัด 10 g ลงในขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์ (oz) ใส่ Thermo-Hygrometer ที่เซตกับจุกยางซิลิโคน ทิ้งไว้ 30 – 60 ชั่วโมง จดบันทึกค่า (รูปที่ 6)

รูปที่ 6 การวัดค่าความชื้นอิสระในอาหาร (water activity : a_w)

2.1.6.3 ปริมาตรในการพองตัวจำเพาะ

การวิเคราะห์ปริมาตรในการพองตัวจำเพาะ โดยชั่งผงเมล็ดแมงลักประมาณ 0.5 g (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ในกระบอกตวง ขนาด 100 ml เติมน้ำกลั่นปริมาตร 80 ml ใช้แท่งแก้วคนให้ผงเมล็ดแมงลักกระจายตัวดี จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 ml (แล้วปิดปากกระบอกตวงด้วยแผ่นฟลอยด์) ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วอ่านปริมาตรการพองตัวของผงเมล็ดแมงลักเป็นml ทำการจดบันทึกแล้วนำมาคำนวณหาค่าปริมาตรในการพองตัว

$$\text{ปริมาตรในการพองตัวจำเพาะ (ml/g)} = \frac{\text{ปริมาตรที่ตัวอย่างพองตัว}}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง}}$$

2.1.6.4 ความสามารถในการอุ้มน้ำ

การวิเคราะห์หาความสามารถในการอุ้มน้ำ โดยการชั่งผงเมล็ดแมงลักประมาณ 0.1 g (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 125 หรือ 250 ml เติมน้ำกลั่น 50 ml แช่ตัวอย่างทิ้งไว้นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก (กระดาษกรองที่อุ้มน้ำแล้วโดยผ่านการ suction แล้วชั่งน้ำหนัก) ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่อุ้มน้ำบนกระดาษกรอง จะได้น้ำหนักอุ้มน้ำของตัวอย่างที่ค้างบนกระดาษกรองแล้วนำมาคำนวณหาค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ

$$\text{ความสามารถในการอุ้มน้ำ (WHC) (g/g)} = \frac{\text{น้ำหนักอุ้มน้ำของตัวอย่าง}}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง}}$$

โดยที่ น้ำหนักอุ้มน้ำของตัวอย่าง = น้ำหนักตัวอย่างที่อุ้มน้ำบนกระดาษกรอง–น้ำหนักกระดาษกรองที่อุ้มน้ำ

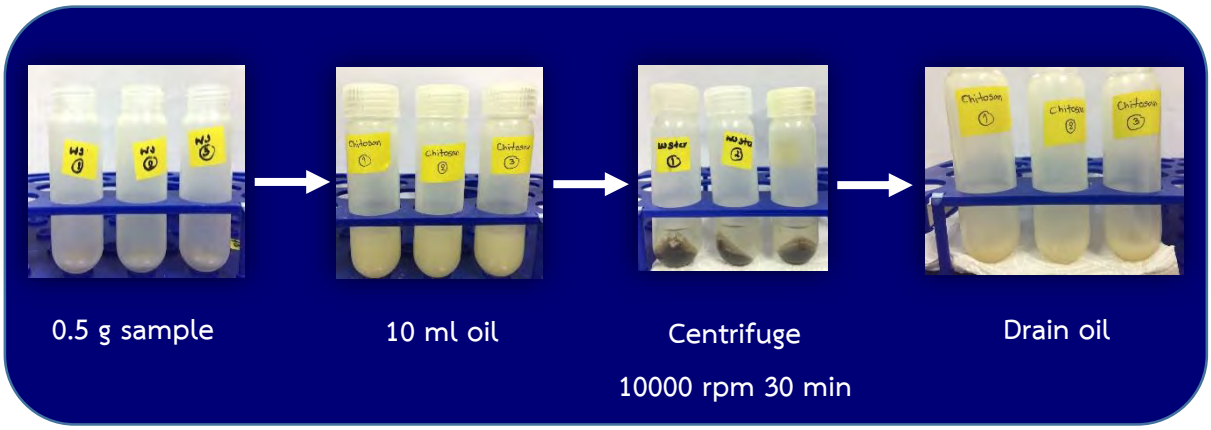
2.1.6.5 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแร่ธาตุด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงของอะตอม (Atomic Absorption Spectrophotometer: AAS) ของผงเมล็ดแมงลัก

การเตรียมตัวอย่าง โดยถ่าย ash ใน crucible ลงใน beaker โดยการล้าง crucible ด้วยน้ำกลั่นร้อน (ระวังอย่าให้ ash ไหลออกนอก beaker ล้างเถ้าออกให้หมด โดยใช้แท่งแก้วและน้ำกลั่นร้อนช่วยล้าง หลังจากนั้น ล้าง crucible ด้วย 10 ml 10% HCl คนด้วยแท่งแก้วแล้วเทลงใน beaker ล้าง crucible ด้วยน้ำกลั่นร้อนอีกครั้ง จนเถ้าจาก crucible ถูกถ่ายลงใน beaker ทั้งหมด เติมน้ำกลั่นลงใน beaker ให้ได้ระดับ 2/3 ของ beaker แล้วตวง HCl เข้มข้น จำนวน 5 ml เทลงใน beaker คนด้วยแท่งแก้วและค้างแท่งแก้วไว้ใน beaker นำไปต้มให้เดือดช้า ๆ ด้วยไฟอ่อน เพื่อระเหยให้เหลือของเหลวอยู่ประมาณ 50 ml ซึ่งใช้เวลา ประมาณ 2-3 ชม. (ระวังอย่าให้แห้ง) นำไปต้มจนเหลือปริมาตร 1-2 ml (ล้าง beaker ด้วยน้ำร้อนแล้วนำไปใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 ml) centrifuge ที่ความเร็ว 5000 rpm 5 นาที โดยให้สารละลายกรองผ่านกระดาษกรอง PTFE ขนาดรูพรุน 0.45 µm ลงใน Volumetric flask ขนาด 25 ml แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 25 ml. แล้วเก็บไว้วิเคราะห์หาแร่ธาตุ ด้วยเครื่อง AAS

2.1.6.6 การวิเคราะห์หาความสามารถในการอุ้มน้ำมันของผงเมล็ดแมงลักเทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด (รูปที่ 7)

การวิเคราะห์หาความสามารถในการอุ้มน้ำมัน (Oil Holding Capacity : OHC) โดยประยุกต์ใช้ตามวิธีของ Committee on Codex Specifications (1981) โดยชั่งตัวอย่าง 0.5 g เติมน้ำมัน 10 ml ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้องใช้เวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที แยกของเหลวออก โดยให้ทำการคว่ำกระบอกบนกระดาษชำระ เพื่อให้ของเหลวใน centrifuge ไหลออก ใช้เวลาในขั้นตอนนี้ประมาณ 1 นาที (หรือ ของเหลวหยุดไหลซึม) ชั่งน้ำหนักและจดบันทึกค่า พร้อมคำนวณค่าที่ได้

$$\text{ความสามารถในการอุ้มน้ำมัน (OHC) (g/g)} = \frac{\text{น้ำหนักอุ้มน้ำมันของตัวอย่าง}}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง}}$$

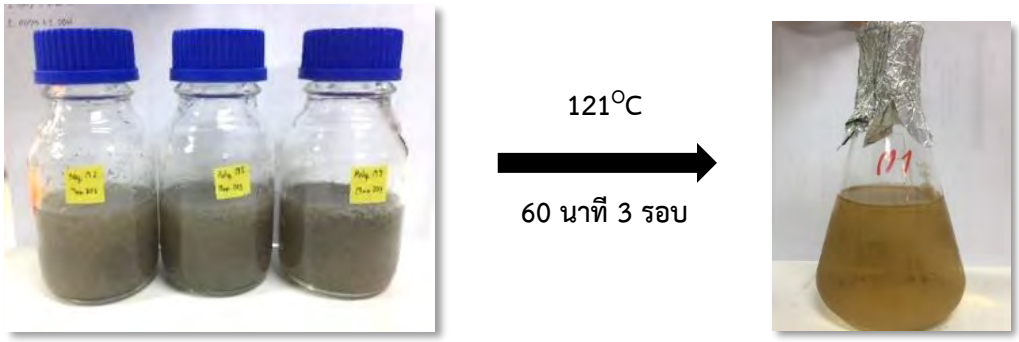


รูปที่ 7 การอุ้มน้ำมัน (Oil Holding Capacity : OHC)

2.1.7 การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

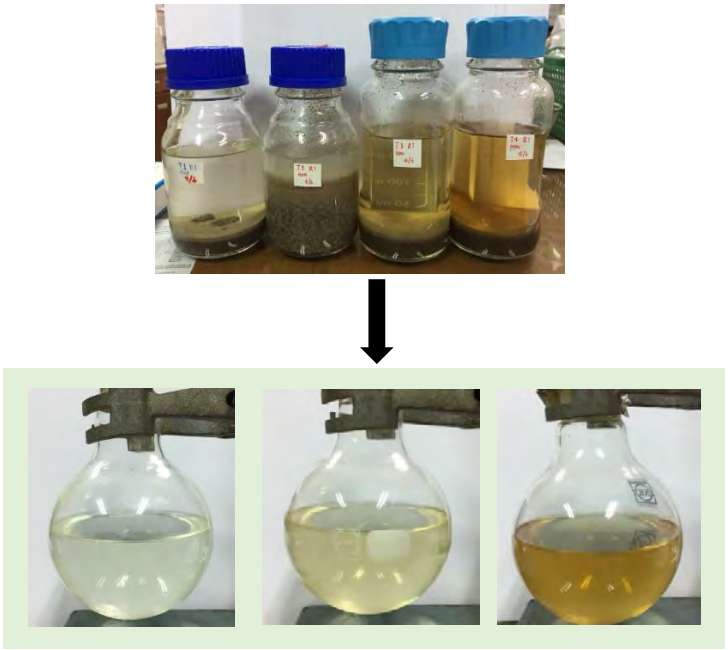
2.1.7.2 การสกัดสารจากผงเมล็ดแมงลักด้วยวิธีน้ำกึ่งวิกฤตและตัวทำละลายต่างๆ

ก. สารสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต โดยนำผลิตภัณฑ์ผงเมล็ดแมงลักมาสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต (2 กรัม ต่อ น้ำ 140 มิลลิลิตร) ในเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ทำทั้งหมด 3 รอบ โดยจะนำสารสกัดทั้งหมดมารวมกัน (ดาริกา และคณะ, 2556) (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 การสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต

ข. สารสกัดด้วยตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ กรดไฮโดรครอลิคร้อยละ 1 ในน้ำ และ กรดไฮโดรครอลิคร้อยละ 0, 0.1 และ 1 ในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยนำผลิตภัณฑ์ผงเมล็ดแมงลักมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย (20 g / ตัวทำละลาย 200 ml) ใช้เวลาในการสกัด 24 ชั่วโมง แล้วทำการแยกส่วนใสออกจากตะกอน (ดัดแปลงจาก เฉลิม และคณะ, 2559) (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

โดยนำสารสกัดที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) และนำมาใส่ vial (รูปที่ 10) ทำให้แห้งด้วย Nitrogen gas และในตู้ดูดความชื้น (desiccator)

รูปที่ 10 สารสกัดจากผงเมล็ดแมงลักด้วยวิธีต่างๆ

2.1.7.2 การวิเคราะห์สารสกัดจากผงเมล็ดแมงลักด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตและตัวทำละลายต่างๆ

ก. การวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide)

การวิเคราะห์หาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอล-กรดซัลฟูริก (Phenol-sulfuric acid) โดยนำตัวอย่างสารสกัดในแต่ละความเข้มข้น ที่เหมาะสม ปริมาตร 200 µl เติมสารละลาย 2.5% ฟีนอล (phenol) ปริมาตร 800 µl และกรดซัลฟูริกเข้มข้น (concentrate sulfuric acid) ปริมาตร 2.5 ml จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) และวางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 20 นาที เพื่อทำปฏิกิริยาในตู้ดูดควัน ดูดตัวอย่างที่ทำปฏิกริยาแล้วมา 200 µl ใส่ในถาดขนาด 96 หลุม (96 well-plate) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร (nm) นำค่าที่ได้มาคำนวณเทียบกับค่ามาตรฐานของสารละลายกลูโคสที่ใช้ 2.5% ฟีนอล ในการทำความเข้มข้นระหว่าง 50 – 1000 µg/ml รายงานปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมดเป็นมิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมสารสกัด (mg glucose / g crude extract) (Dubios *et al.*, 1956)

ข. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Bradford โดยอาศัยหลักการสมดุลระหว่างสารโคเมสซีบลู จี-250 (coomassie brilliant blue G-250) และ โปรตีนจำเพาะ โดยใช้ตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมมาอย่างละ 20 µl ลงในถาด 96 หลุม (96 well-plate) เติมสารละลายสีแบรดฟอร์ด (bradford) ลงไปในหลุมละ 200 µl นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 nm เทียบกราฟมาตรฐานกับโบไวน์ เซรั่ม อัลบูมิน (bovine serum albumin :BSA) ความเข้มข้น 25 – 1000 µg/ml

ค. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compound)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนิลิกทั้งหมดโดยใช้สารทำปฏิกิริยาโฟลิน (Folin-Ciocalteu reagent) ซึ่งเป็นสารละลายที่มีสีเหลือง เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไป สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงหรือน้ำเงิน ซึ่งเป็นสีของฟอสโฟโมลิบเดต (phosphomolybdate) วัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้สารมาตรฐานกรดแกลลิค (gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้น 150-1000 µg/ml ในเอทานอล และสารสกัดตัวอย่าง โดยใส่สารสกัดตัวอย่างลงในถาดขนาด 96 หลุม (96-well plate) ปริมาตร 20 µl เติมสารละลาย 4% โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาตร 80 µl และเติมสารละลาย Folin Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 µl โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบลงค์ (blank) ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่องอ่านถาดไมโครเพลท (microplate reader) นำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิคและแสดงผลเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิค (Gallic acid equivalents : GAE) ต่อน้ำหนักสารสกัดหนัก 1 g (mg GAE/g crude extract) (Pekal A. and Pyrzynska, K., 2004)

ง. การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี ดีพีพีเอช

การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ดีพีพีเอช (DPPH assay) เตรียมสารละลายตัวอย่างในความเข้มข้นต่างๆ และทำการดูดมา 160 µl ผสมกับ 640 µl สารละลาย DPPH (ที่มีความเข้มข้น 100 µM ใน methanol) เขย่าในเข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm แล้วนำค่าที่วัดได้ไปคำนวนหา % การยับยั้งของสารที่ใช้ (%Inhibition) หลังจากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวนหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) จากกราฟสัมพันธ์ระหว่าง %การยับยั้ง กับ ความเข้มข้นของสารสกัด (Predner *et al.*, 2008)

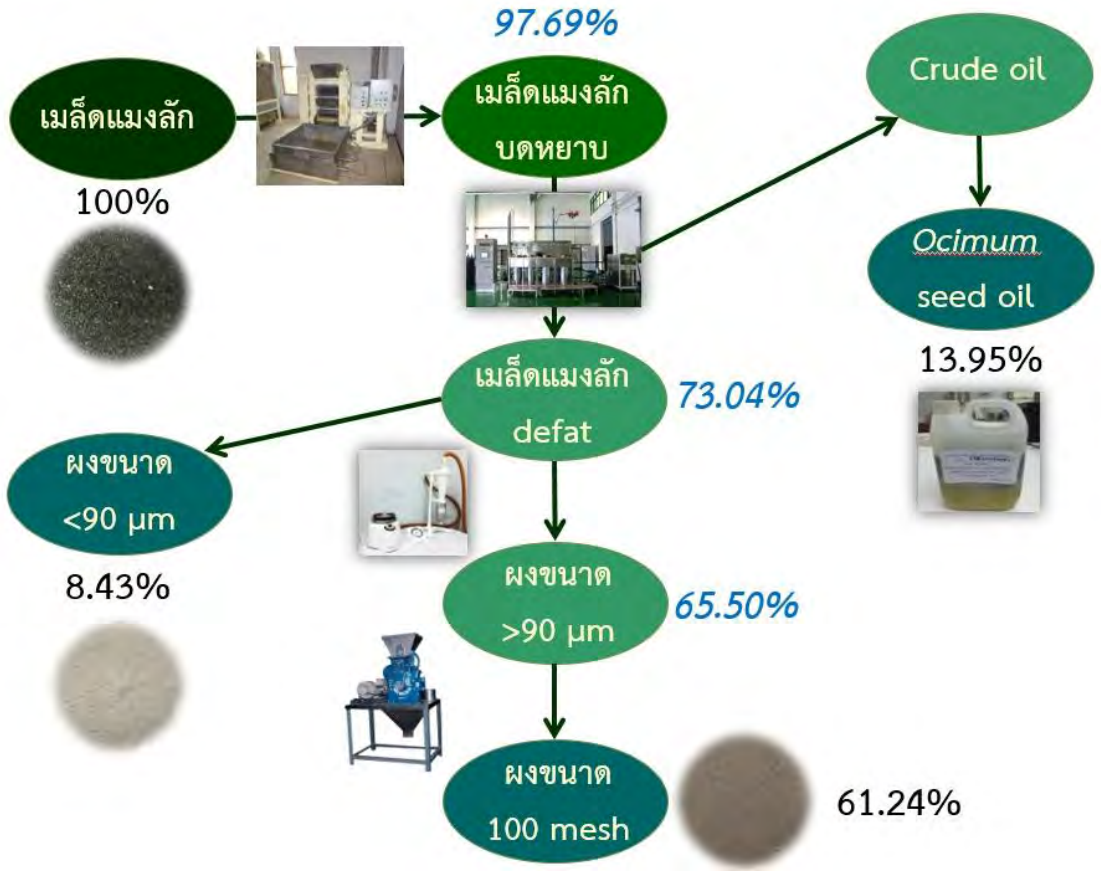
2.1.8 สรุปผลการทดลอง

2.2 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล (Results and Discussion)

2.2.1 ผลการวิจัย

2.2.1.1 กระบวนการผลิตผงเมล็ดแมงลักและคุณสมบัติต่างๆ ของผงเมล็ดแมงลัก

นำเมล็ดแมงลักทำการบดหยาบก่อนผ่านการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต (supercritical carbon dioxide extraction: $SCCO_2$) ตามภาวะที่เหมาะสม (ศรินทิพ และคณะ, 2552) โดยในกระบวนการผลิตได้เมล็ดแมงลักไขมันต่ำ (73.04%) และน้ำมันดิบ (18.11%) จากนั้น จึงทำการคัดแยกเมล็ดแมงลักไขมันต่ำผ่านแผ่นตะแกรงขนาด 90 µl เพื่อคัดส่วนผงที่เล็กกว่าออก (8.43%) ออก จึงนำส่วนเมล็ดแมงลักไขมันต่ำที่มีขนาดใหญ่กว่า 90 µl (65.50%) มาทำการบดเพื่อลดขนาด 100 เมช (mesh) เรียกว่าผงเมล็ดแมงลัก “Ocimum seed powder” หรือ เส้นใยแมงลัก “*Ocimum* fiber” (61.24%) นำไปทำการฆ่าเชื้อด้วยการสเตอริไลเซชั่น (sterilization) ได้ผงเมล็ดแมงลัก (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 ภาพรวมกระบวนการผลิตผงเมล็ดแมงลัก

2.2.1.2 การทดสอบองค์ประกอบทางเคมี แร่ธาตุ และคุณสมบัติต่างๆ ของผงเมล็ดแมงลัก

เมล็ดแมงลักเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีองค์ประกอบทางเคมีในน้ำหนักแห้ง คือ โปรตีน ไขมัน เส้นใยหยาบ เถ้า และคาร์โบไฮเดรต เมื่อนำมาผ่านการสกัดด้วยเครื่อง $SCCO_2$ และผ่านกระบวนการแปรรูปแล้วได้เป็นผลิตภัณฑ์ผงเมล็ดแมงลัก จะทำให้ปริมาณของไขมันลดลงเหลือ 5.46±0.11% (จากเดิมในเมล็ดแมงลักมีไขมันอยู่ 19.99±0.21%) และสัดส่วนของเถ้า เส้นใยหยาบ และ คาร์โบไฮเดรตจะเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 1

โดยในการวิเคราะห์เบื้องต้น เมล็ดแมงลักมีความชื้นในอาหารมากกว่าผงเมล็ดแมงลัก เพราะเนื่องจากใช้ $SCCO_2$ ในการสกัดจะนำพาของเหลวออกจากตัวอย่างที่สกัดไปด้วย แต่ในส่วนของ ปริมาตรในการพองตัวจำเพาะ และ ความสามารถในการอุ้มน้ำ ของผงเมล็ดแมงลัก มีค่าเพิ่มมากขึ้นกว่าเมล็ดแมงลัก ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดแมงลัก และผงเมล็ดแมงลัก

ปริมาณร้อยละขององค์ประกอบทางเคมี	เมล็ดแมงลัก		ผงเมล็ดแมงลัก	
	ในน้ำหนักสด	ในน้ำหนักแห้ง	ในน้ำหนักสด	ในน้ำหนักแห้ง
ความชื้น (moisture)	9.46±0.09	-	6.41±0.41	-
โปรติน (protein)	17.29±0.91	19.09±1.01	16.87±0.35	18.30±0.32
ไขมัน (fat)	19.99±0.21	22.07±0.23	5.23±0.08	5.64±0.11
เส้นใยหยาบ (crude fiber)	24.53±1.37	26.90±1.51	32.15±1.31	33.56±0.05
เถ้า (ash)	5.48±0.07	6.05±0.07	7.06±0.05	7.55±0.02
คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate)	23.25	25.89	32.29	34.95

ตารางที่ 2 ความชื้นอิสระในอาหาร ปริมาตรในการพองตัวจำเพาะ และความสามารถในการอุ้มน้ำของเมล็ดแมงลักและผงเมล็ดแมงลัก

ตัวอย่าง	ความชื้นอิสระในอาหาร (a_W)	ปริมาตรในการพองตัวจำเพาะ (ml/g)	ความสามารถในการอุ้มน้ำ (g/g)
เมล็ดแมงลัก	0.61±0.00	33.71±0.22	34.33±0.97
ผงเมล็ดแมงลัก	0.48±0.03	189.03±10.35	71.02±3.32

จากองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดแมงลักและผงเมล็ดแมงลัก (ตารางที่ 1) พบว่า ผงเมล็ดแมงลัก ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เส้นใยหยาบ เถ้า และคาร์โบไฮเดรต (6.41, 16.87, 5.23, 32.15, 7.06 และ 32.29% ตามลำดับ) ซึ่งจะทำให้สัดส่วนของไขมันและโปรตีนลดลงแต่มีปริมาณเส้นใยหยาบและคาร์โบไฮเดรตที่สูงขึ้น เนื่องจากมีการนำไขมันและโปรตีนออกในส่วนของการแปรรูป นอกจากนี้ในผลิตภัณฑ์ผง

เมล็ดแมงลัก มีแร่ธาตุหลักคือ โปตัสเซียม (Potassium: K) แคลเซียม (Calcium: Ca) และ แมกนีเซียม (Magnesium: Mg) อยู่ 753.90, 1103.00 และ 288.70 mg/ 100 g ตามลำดับ รวมถึงผงเมล็ดแมงลักยังคงมีคุณสมบัติเด่นคือมีปริมาตรในการพองตัว (189.03 ml/g) และความสามารถในการอุ้มน้ำ (71.02 g/g) ดังแสดงในตารางที่ 3

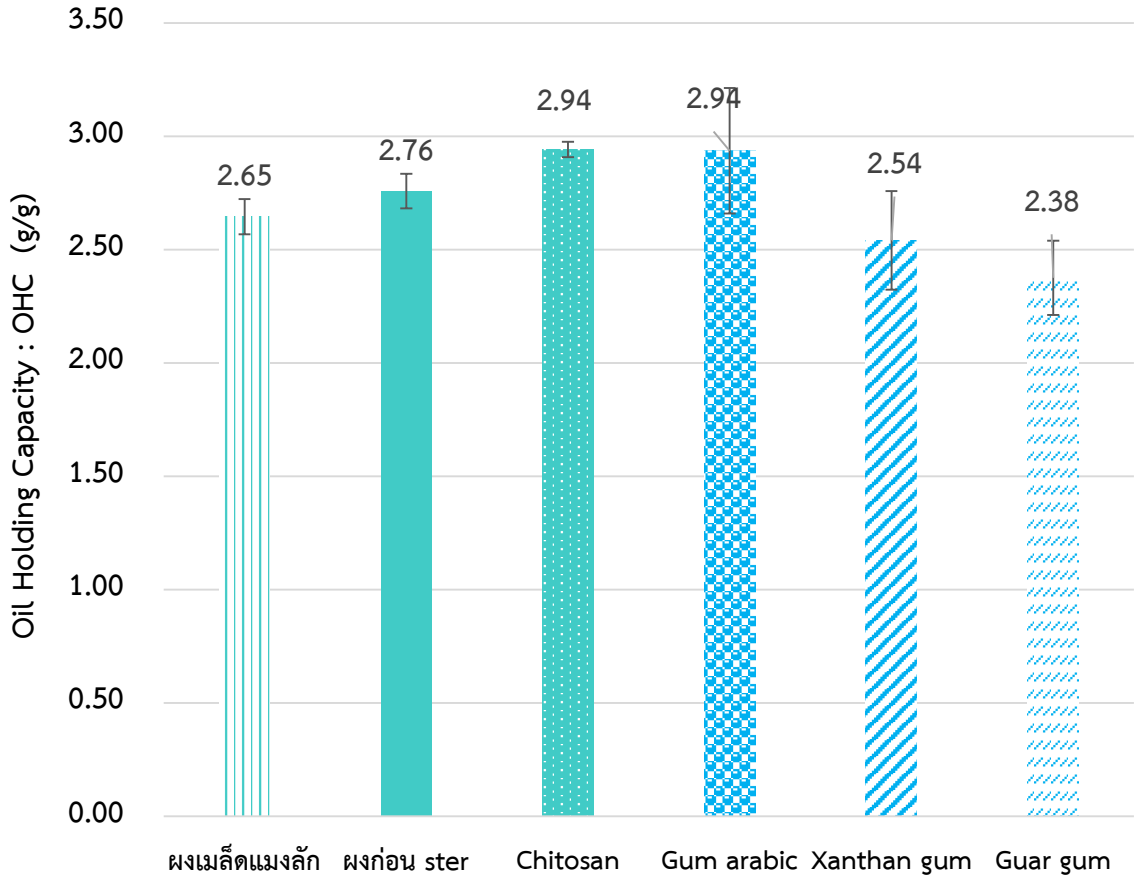
ตารางที่ 3 ปริมาณธาตุในตัวอย่างผงเมล็ดแมงลักด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS)

ชนิดธาตุ	ปริมาณธาตุ (mg/l)*	คิดเป็น mg/100 g
โซเดียม (Sodium : Na)	5.19	51.90
โปตัสเซียม (Potassium : K)	**75.39**	**753.90**
แคลเซียม (Calcium : Ca)	**110.3**	**1,103.00**
แมกนีเซียม (Magnesium : Mg)	**28.87**	**288.70**
คอปเปอร์ (Copper : Cu)	0.56	5.60
สังกะสี (Zinc : Zn)	0.58	5.80
เหล็ก (Iron : Fe)	0.93	9.30
แมกนีเซียม (Magnesium : Mn)	0.25	2.50
นิเกิล (Nikel : Ni)	<0.05	
โคบอลต์ (Cobalt : Co)	<0.02	
แคดเมียม (Cadmium : Cd)	<0.01	
ตะกั่ว (Lead : Pb)	<0.05	

หมายเหตุ * ส่งวิเคราะห์ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วย Hydrochloric acid ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.1.3 การวิเคราะห์หาความสามารถในการอุ้มน้ำมันของผงเมล็ดแมงลัก (Oil Holding Capacity : OHC)

พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ผงเมล็ดแมงลัก (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) กับผงเมล็ดแมงลักก่อนการฆ่าเชื้อ (ผงก่อน ster) chitosan (ผลิตภัณฑ์ที่ใช้สำหรับดูดซับน้ำมันในท้องตลาด) Gum arabic Xanthan gum และ Guar gum พบว่า Chitosan และ Gum Arabic ค่า OHC สูงที่สุด (2.94 g oil/g) และในผงเมล็ดแมงลักก่อนการฆ่าเชื้อ (2.76 g oil/g) จะให้ค่าสูงกว่าผลิตภัณฑ์ผงเมล็ดแมงลัก (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) (2.65 g oil/g) ถึงจะให้ค่ารองลงมา แต่ก็ถือว่าน่าสนใจในการนำไปใช้ประโยชน์ ดังแสดงในรูปที่ 12



รูปที่ 12 การอุ้มน้ำมันของผลิตภัณฑ์ผงเมล็ดแมงลักเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด

2.2.1.4 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผงเมล็ดแมงลัก

จากการสกัดผงเมล็ดแมงลักด้วยน้ำกึ่งวิกฤตในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 60 นาที 3 รอบ และการสกัดสารด้วยตัวทำละลายความเข้มข้นต่างๆ คือ 1% กรดไฮโดรคลอริก ในน้ำ และ 0, 0.1, 1% กรดไฮโดรคลอริกในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปทำการระเหยตัวทำละลายออกแล้ว พบว่า การใช้น้ำกึ่งวิกฤตในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อสามารถสกัดสารได้มากที่สุด (22.86±1.34%) และการสกัดสารด้วยตัวทำละลาย 1% กรดไฮโดรคลอลิก ในน้ำ สามารถสกัดสารได้น้อยที่สุด (2.85±0.48%) ดังแสดงผลในตารางที่ 4 เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ดังแสดงผลในตารางที่ 5 และการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ดีพีพีเอช (DPPH assay) ดังแสดงผลในตามตารางที่ 6 สามารถสรุปผลวิเคราะห์ได้ดังนี้

ตารางที่ 4 ปริมาณสารสกัดจากผงเมล็ดแมงลักด้วยตัวทำละลายและน้ำกึ่งวิกฤต

สารสกัดผงเมล็ดแมงลักด้วยวิธีต่างๆ		**Yield (%w/w)**
ตัวทำละลาย	0% กรดไฮดรอคลอริก ใน 95% เอทานอล	3.46±0.32
	0.1% กรดไฮดรอคลอริก ใน 95% เอทานอล	3.77±0.27
	1% กรดไฮดรอคลอริก ใน 95% เอทานอล	3.79±0.57
	1% กรดไฮดรอคลอริก ในน้ำ	2.85±0.48
น้ำกึ่งวิกฤต	121°C นาน 60 นาที 3 รอบ	22.86±1.34

ตารางที่ 5 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากผงเมล็ดแมงลัก

สารสกัดผงเมล็ดแมงลักด้วยวิธีต่างๆ		**Protein (%w/w)**	**Polysaccharide (mg glucose/ g crude extract)**	**Total Phenolic Compound (mg GAE/ g crude extract)**
ตัวทำละลาย	0% กรดไฮดรอคลอริก ใน 95% เอทานอล	1.26±0.07	1.25±0.02	2.17±0.05
	0.1% กรดไฮดรอคลอริก ใน 95% เอทานอล	1.21±0.16	0.92±0.05	3.56±0.03
	1% กรดไฮดรอคลอริก ใน 95% เอทานอล	1.40±0.15	0.85±0.01	5.64±0.11
	1% กรดไฮดรอคลอริก ในน้ำ	6.22±0.43	10.81±0.29	41.03±4.73
น้ำกึ่งวิกฤต	121°C นาน 60 นาที 3 รอบ	7.01±0.35	16.77±0.68	48.42±7.96

ตารางที่ 6 ค่า IC_{50} ของวิธีดีพีพีเอช ของสารสกัดจากผงเมล็ดแมงลัก

สารสกัดผงเมล็ดแมงลักด้วยวิธีต่างๆ		**ค่า IC_{50} ของวิธีดีพีพีเอช (mg/ml)**
ตัวทำละลาย	0% กรดไฮดรอคลอริก ใน 95% เอทานอล	0.400±0.040
	0.1% กรดไฮดรอคลอริก ใน 95% เอทานอล	0.758±0.040
	1% กรดไฮดรอคลอริก ใน 95% เอทานอล	0.269±0.020
	1% กรดไฮดรอคลอริก ในน้ำ	0.002±0.140
น้ำกึ่งวิกฤต	121°C นาน 60 นาที 3 รอบ	4.405±0.010

2.2.2 อภิปรายผล

ผงเมล็ดแมงลัก (*Ocimum* seed powder) ที่สกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต และตัวทำละลายต่างๆ โดยงานวิจัยนี้ ผงเมล็ดแมงลักที่นำมาศึกษา มี ความชื้น โปรตีน ไขมัน เส้นใยหยาบ เถ้า และคาร์โบไฮเดรต (6.41, 16.87, 5.23, 32.15, 7.06 และ 32.29% ตามลำดับ) รวมถึงมีคุณสมบัติเด่นคือมีปริมาตรในการพองตัว (189.03 ml/g) และความสามารถในการอุ้มน้ำ (71.02 g/g) ผลของความสามารถในการอุ้มน้ำมันของผงเมล็ดแมงลักเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ ไคโตซาน กัมอะราบิก แซนแทนกัม และกัวร์กัม พบว่า ไคโตซานและกัมอะราบิกให้ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำมัน (2.94 กรัมน้ำมันต่อกรัมตัวอย่าง) สูงที่สุด โดยที่ผงเมล็ดแมงลักที่ยังไม่ผ่านการฆ่าเชื้อจะให้ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำมัน (2.76 g oil/g sample) มากกว่าผงเมล็ดแมงลักที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แซนแทนกรัม และ กัวร์กัม (2.65, 2.54 และ 2.38 g oil/g sample ตามลำดับ) โดยในปี 2556 จากงานวิจัยของ ฐิตา และคณะ ได้มีการทดสอบความสามารถอุ้มน้ำและอุ้มน้ำมันของกากมะรุมและการสกัดเซลลูโลสจากกากมะรุมด้วยน้ำร้อนและเอนไซม์ พบว่า ความสามารถในการอุ้มน้ำของกากมะรุมที่ผ่านการสกัดด้วยน้ำร้อน (5.92 g/g) และเอนไซม์ (3.18 g/g) จะเพิ่มขึ้นกว่ากากมะรุม (2.14 g/g) ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถในการอุ้มน้ำมันของกากมะรุมที่ผ่านการสกัดด้วยน้ำร้อน (4.58 g oil/g) และเอนไซม์ (2.84 g oil/g) จะเพิ่มขึ้นกว่ากากมะรุม (1.28 g oil/ g) ดังนั้น หากมีการนำผงเมล็ดแมงลักมาทำการสกัดด้วยความร้อน หรือ เอนไซม์ อาจมีแนวโน้มทำให้ความสามารถต่างๆ เพิ่มมากขึ้น

หลังจากนั้น ได้มีกระบวนการสกัดสารที่ได้จากผงเมล็ดแมงลัก ผลการวิจัยพบว่า การสกัดที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายสามารถสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน และสารประกอบฟีนอลิกได้ดีกว่าตัวทำละลายที่เป็น เอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 95 เนื่องจาก พอลิแซ็กคาร์ไรด์ โปรตีน และสารประกอบฟีนอลิกสามารถละลายได้ดีในน้ำ ในปี พ.ศ. 2559 เฉลิมชัย และคณะ ได้ทำการสกัดสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากข้าวเหนียวดำ พบว่า สารสกัดจากข้าวเหนียวดำด้วยตัวทำละลาย กรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 1% ในน้ำ ให้สารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 0.77 mg GAE/ g crude extract และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ให้ค่า IC_{50} = 0.0887 mg/ml (88.70 ppm) ในขณะที่สารสกัดจากผงเมล็ดแมงลักด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกันให้ สารประกอบฟีนอลิก เท่ากับ 41.03 mg GAE/ g crude extract และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ให้ค่า IC_{50} = 0.002 mg/ml (2 ppm) แต่ในปี ค.ศ. 2013 ปราลี และคณะ ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อปริมาณสารพฤกษเคมีและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำฟักข้าว พบว่า การให้ความร้อนที่มีอุณหภูมิที่สูงกว่า $80^{O}C$ จะส่งผลให้สารพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำฟักข้าวลดลง (Paralee et.al, 2013) ซึ่งสอดคล้องกับผลของการใช้น้ำที่ให้ความร้อนในการสกัดสารจากผงเมล็ดแมงลักนั้น ทำให้ประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผงเมล็ดแมงลักลดลง

ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้อธิบายว่า หากมีการบริโภคผงเมล็ดแมงลักที่มีการใช้น้ำร้อนเป็นตัวทำละลาย จะทำให้ได้รับสารประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน และสารประกอบฟีนอลิก ได้ดี แต่หากมีการใช้กรดไฮโดรคลอริคที่มีความเข้มข้น 1% ในน้ำ โดยไม่ใช้ความร้อนจะสามารถให้สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เหมาะสมที่สุด แต่ทั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับอุณหภูมิ หรือ ตัวทำละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ เพิ่มเติม เพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุดในการวิจัยครั้งต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ
(Conclusion and Recommendation)

ผงเมล็ดแมงลักที่ผ่านกระบวนการฝัดแห้งจากบริษัทฯ นำมาสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต (supercritical carbon dioxide extraction: $SCCO_2$) มีปริมาณเส้นใยหยาบและคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลัก แต่ยังมีปริมาณโปรตีนและไขมันอยู่ โดยมีแร่ธาตุหลักในผลิตภัณฑ์คือ โปตัสเซียม แคลเซียม และ แมกนีเซียม ผงเมล็ดแมงลัก มีคุณสมบัติเด่นคือมีปริมาตรในการพองตัวและความสามารถในการอุ้มน้ำ นอกจากนี้ พบว่า ผงเมล็ดแมงลักที่ยังไม่ผ่านการการฆ่าเชื้อ มีความสามารถในการอุ้มน้ำมันใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ ไคโตซาน และกัมอะราบิกให้ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำมันสูง แต่เมื่อนำผงเมล็ดแมงลักมาผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121^{O}C นาน 15 นาที จะทำให้ความสามารถในการอุ้มน้ำมันลดลงเล็กน้อย แต่ก็ยังคงความสามารถในการอุ้มน้ำ อุ้มน้ำมัน และปริมาตรในการพองตัวจำเพาะอยู่ หลังจากนั้น เมื่อนำผงเมล็ดแมงลักมาทำการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตและตัวทำละลายกรดไฮโดรคลอริกในน้ำและเอทานอล พบว่า การสกัดที่ใช้น้ำกึ่งวิกฤตเป็นตัวทำละลายสามารถสกัดสารพอลิแซ็กคาร์ไรด์ โปรตีน และสารประกอบฟีนอลิกได้มากที่สุด และสามารถสกัดได้เพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิในการสกัด และในส่วนของการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดจากผงเมล็ดแมงลักที่ได้จากการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกร่วมกับน้ำ (ตัวทำละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 1% ในน้ำ) มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด คือ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (2 ppm) ดังนั้น หากมีการศึกษาการนำผงเมล็ดแมงลักไปทดลองสกัดด้วยทำละลายที่แตกต่างๆ มากขึ้น อาจจะเป็นแนวทางในการประยุกต์นำผงเมล็ดแมงลักเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารที่มีการเติม food additive ต่างๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ

บรรณานุกรม
(Bibliography)

1. ฐิตา ฟูเผ่า, อัจฉรา พรหมแสง, พัชรา อ้นโต และ วีระ พุ่มเกิด. 2556. ผลของวิธีการสกัดต่อคุณสมบัติของสารสกัดเซลลูโลสจากกากเมล็ดมะรุม. วารสารวิจัย มสด 7 (2): 33-55.
2. ดวงกมล เรือนงาม. 2557. การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง, 23 (2): 12-22.
3. นุชนาฏ กิจเจริญ. 2549. อาหารสมุนไพรยาระบาย: ใยอาหาร. Thai Pharmaceutical and Health Science Journal, 2:153-158.
4. ศรินทิพ สุกใส, ศจี น้อยตั้ง, วีระเดช สุขเอียด และ อมร เพชรสม. คุณสมบัติการพองตัวและอุ้มน้ำของสารเมือกของผงเมล็ดแมงลักหลังสกัดน้ำมัน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 40 (2) : 219-228.
5. สหขวัญ โรจนคุณธรรม และ อังคณา จันทรพลพันธ์. 2557. คุณสมบัติทางเคมี และเคมีกายภาพของเส้นใยอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระจากมะม่วงสายพันธุ์แก้วเขียว (Mangifera indica L.). วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี การประชุมวิชาการ มหาสารคามวิจัย ครั้งที่ 10 : 333-341.
6. สุธินี คำเพ็ง, จอมใจ พีรพัฒนา และ เกษม นันทชัย. 2555. การสกัดและคุณสมบัติของสารเมือกเมล็ดแมงลัก. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 43 (3) พิเศษ: 372-375.
7. A.O.A.C. 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International 16th ed., Virginin: Association of Official. Analytical Chemists International.
8. Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C. 2011. Dietary fiber and fiber-rich by- products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. Food Chemistry, 124:411-421
9. Machmudah, S., Shotipruk, A., Goto, M. Sasaki, M. and Hirose, T. 2006. Extraction of astaxanthin from Haematococcus pluvialis using supercritical CO2 and ethanol as entrainer. Ind. Eng. Chem. Res., 45, 3652-3657.
10. Ruen-ngam, D., Armando, T. Quitain, Mitsuru C., Sasaki O., and Goto, M., 2012. Hydrothermal hydrolysis of hesperidin into more valuable compounds under supercritical carbon dioxide condition. Ind. Eng. Chem. Res., 51: 13545-13551.
11. Ruen-ngam, D., Armando, T. Quitain, Tanaka M., Sasaki M. and Goto, M., 2012. Reaction kinetics of hydrothermal hydrolysis of hesperidin into more valuable compounds under supercritical carbon dioxide conditions. J. Supercrit. Fluids, 66: 215-220.
12. Sarfraz, Z., Anjum, M.F., Khan, I.M., Arshad, S.M. and Nadeem, M. 2011. Characterization of Basil (Ocimum basilicum L.) parts for antioxidant potential. Afr. J. Food Sci. Technol. 2 (9): 204-213.

13. Sharma, B.R., Naresh, L., Dhuldhoya, Merchan, N.C., S.U. t and Merchant, U. C.. Xanthan Gum-A Boon to Food Industry. Food Promotion Chronicle, 1 (5) , 27-30 (2006).
14. Thana, P., Machmudah, S., Goto, M., Sasaki, M., Pavasant, P. and Shotipruk, A. 2008. Response surface methodology to supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from Haematococcus pluvialis. Bioresource Technol., 99: 3110–3115.
15. Thanatcha, R. and Pranee, A. 2011. Extraction and characterization of mucilage in Ziziphus mauritiana Lam. International Food Research Journal, 18: 201-212.

ภาคผนวก ก (Appendix)

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี (proximate analysis)

การหาปริมาณร้อยละของความชื้น (% Moisture)

อุปกรณ์

1. Aluminum foil
2. Spatula stainless / plastic (ช้อนตักสาร)
3. Hot air oven
4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. Desiccator
6. Forcep

วิธีวิเคราะห์

1. นำ Aluminum dish/ foil ไปอบในตู้อบ (Hot air oven) ที่ 100±5°C แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่าง 2 - 5 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ใน Aluminum dish
3. นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100±5°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
4. นำ Aluminum dish กับตัวอย่างที่ผ่านการอบไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่ง แล้วนำไปอบจนได้น้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

วิธีการคำนวณ

$$\textbf{\% Moisture (w/w)} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่าง} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ})}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

การหาปริมาณร้อยละของไขมัน (% Fat)

อุปกรณ์

1. ชุดกลั่น Soxhlet ประกอบด้วย Condenser, Soxhlet apparatus และ Round bottom flask
2. Spatula stainless / plastic (ช้อนตักสาร)
3. Hot air oven
4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. Desiccator

6. Forcep
7. Water bath
8. Cooling
9. Thimble
10. กระดาษกรอง
11. Cylinder / Beaker ขนาด 250 มล.

สารเคมี

1. Petroleum ether

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างที่แห้ง 2 – 3 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ในกระดาษกรอง แล้วนำไปใส่ใน Thimble ใน Extraction tube ของ Soxhlet apparatus (กรณีตัวอย่างอาจจะเป็น drying oil ในสกัดสด แล้วคำนวนจากหนักแห้ง)
2. ใส่ 250 มล. Petroleum ether ลงในขวดก้นกลมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน
3. นำไป Reflux บน Heating mantle (โดยใช้ Water bath แทน) ใช้อุณหภูมิปานกลาง โดยให้อัตราการกลั่นตัวของ Petroleum ether 2 – 3 หยด / วินาที ใช้เวลาในการ Reflux $\simeq$ 10 ชั่วโมง
4. ระเหยเอา Petroleum ether ออกจากขวดก้นกลม (Round bottom flask) ที่สกัดไขมัน
5. จากนั้นนำไปอบในตู้อบ (Hot air oven) ที่ 100$\pm$5°C แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

วิธีการคำนวณ

$$\textbf{\% Fat (w/w)} = \frac{(\text{น้ำหนักขวดก้นกลมกับน้ำมัน} - \text{น้ำมันขวดก้นกลม})}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง}} \times 100$$

การหาปริมาณร้อยละของโปรตีน (% Protein)

อุปกรณ์

1. ชุดย่อย ประกอบด้วย Kjeldahl flask, Digestion apparatus (เตาไฟ), Digestion rack
2. ชุดกลั่น (Distillation unit)
3. Spatula stainless / plastic (ช้อนตักสาร)
4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. Erlenmeyer flask 250 มล.
6. Burette ขนาด 25 มล.
7. Hood (ตู้ดูดควัน)
8. Volumetric flask

สารเคมี

1. Potassium sulphate

2. Copper sulphate heptahydrate
3. Sulfuric acid
4. Sodium hydroxide
5. Boric acid
6. Hydrochloric acid
7. Mixed indicator (methyl red + bromocresol green)
8. DI water

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

1. ชั่งตัวอย่างแห้ง 0.5 - 2 กรัม ใส่ใน Kjeldahl flask
2. เติม Catalyst 7 กรัม (เตรียมจาก 95 กรัม K_2SO_4 : 5 กรัม $CuSO_4.5H_2O$)
3. เติม 15 มล. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
4. นำไปย่อยบนเตาไฟจนได้ของเหลวสีเขียวใส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
5. เติม 50 มล. DI water
6. นำ Erlenmeyer flask ขนาด 250 มล. ซึ่งบรรจุ 50 มล. 4% Boric acid และหยด 2 – 3 หยด Mixed indicator ต่อเข้ากับชุดกลั่นโดยให้ปลายล่างของ Condenser อยู่ใต้ระดับของเหลวใน Erlenmeyer flask
7. เติม 32% NaOH ลงใน Kjeldahl flask
8. กลั่นจนได้ของเหลวประมาณ 150 มล. (ดูจาก scale ของ Erlenmeyer flask) นำ Erlenmeyer flask ออก ล้างปลาย Condenser ด้วย DI water
9. นำมาทำการ titrate สารที่กลั่นได้กับ 0.1 N HCl ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

<u>วิธีการคำนวณ</u>

$$N\ (g) = (\text{Vol. HCl}_{\text{titrate}} - \text{Vol. HCl}_{\text{blank}}) \times N_{HCl} \times 0.014007$$

$$\%\ N\ (w/w) = \frac{N \times 100}{\text{Wt. sample}}$$

% Protein (w/w) = % N x factor

<u>หมายเหตุ</u> factor ที่ใช้คำนวณ = 6.25

การหาปริมาณร้อยละของเส้นใยหยาบ (% Fiber)

<u>อุปกรณ์</u>

1. Erlenmeyer flask 500 มล.
2. Spatula stainless / plastic (ช้อนตักสาร)
3. Hot air oven
4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

5. Desiccator
6. Forcep
7. Cylinder 50 / 100 มล.
8. Hot plate
9. ชุดกรอง
10. Suction pump
11. กระดาษกรอง
12. เตาเผา
13. Tong (ที่คีบถ้วย Crucible)
14. Crucible

<u>สารเคมี</u>

1. Sulfuric acid
2. Sodium hydroxide
3. DI Water
4. Ethyl alcohol

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

1. ชั่งตัวอย่างแห้งที่สกัดไขมันออกแล้ว (ยกเว้นกรณีที่ไขมันน้อยกว่า 1%) 2 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask 500 มล.
2. เติม 50 มล. 5% H_2SO_4 และเติม 200 มล. DI Water
3. ต้มให้เดือดนาน 30 นาที บน Hot plate (ขณะต้มให้หมุน Erlenmeyer flask เป็นครั้งคราวเพื่อไม่ให้มีส่วนแข็งติด)
4. นำมากรองในชุดกรองผ่านกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) โดยใช้ Suction pump ล้าง Erlenmeyer flask ด้วยน้ำร้อน 50 – 70 มล. แล้วเทลงผ่านกระดาษกรอง
5. ใช้น้ำร้อน 50 มล. ล้างซ้ำอีก 2 – 3 ครั้ง
6. นำกากที่ได้ใส่ใน Erlenmeyer flask เติม 50 มล. 5% NaOH เติม 200 มล. DI Water
7. ต้มให้เดือดนาน 30 นาที บน Hot plate (ขณะต้มให้หมุน Erlenmeyer flask เป็นครั้งคราวเพื่อไม่ให้มีส่วนแข็งติด)
8. กรองโดยใช้วิธีเดียวกับข้อ 4 และ 5
9. ล้างด้วย 25 มล. 1.25% H_2SO_4 ล้างตามด้วยน้ำร้อน 50 มล. และ 25 มล. Alcohol ตามลำดับ นำกระดาษกรองพร้อมกากเส้นใยใส่ใน Crucible ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)
10. นำไปอบในตู้อบ (Hot air oven) ที่ 100$\pm$5°C แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

11 นำไปเผาที่อุณหภูมิ 600$\pm$5°C เป็นเวลานาน 30 นาที ทำให้เย็นใน Desiccator ชั่งน้ำหนักอีกครั้ง และนำไปเผาจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

วิธีการคำนวณ

น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ = (น้ำหนักตัวอย่าง+กระดาษกรอง+Crucible หลังอบ)–(น้ำหนักกระดาษกรอง+crucible)
น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา = (น้ำหนักตัวอย่าง+crucible หลังเผา) – น้ำหนัก crucible

$$\textbf{\% Crude Fiber (w/w)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ – น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา}}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง}} \times 100$$

การหาปริมาณร้อยละของเถ้า (% Ash)

อุปกรณ์

1. Crucible
2. Spatula stainless / plastic (ช้อนตักสาร)
3. Hot air oven
4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. Desiccator
6. Forcep
7. Hood
8. เตาเผา
9. Tong

วิธีวิเคราะห์

1. นำ Crucible ไปเผาที่เตาเผา ที่ 550±5°C แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ใน Crucible
3. นำไปเผาบน Hot plate ในตู้ดูดควัน (Hood) จนหมดควันสีดำ
4. นำไปเผาในเตาเผาที่ 550±5°C แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก และนำไปเผาจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

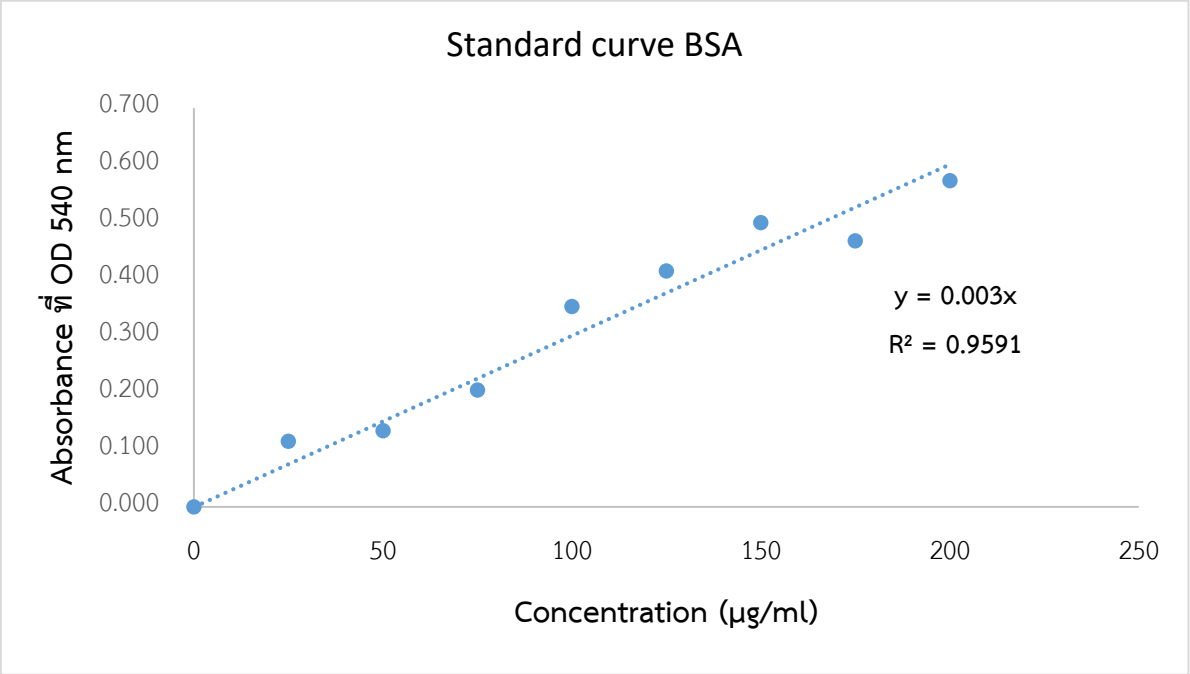
วิธีการคำนวณ

$$\textbf{\% Ash (w/w)} = \frac{\text{(น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา+crucible) – น้ำหนัก crucible}}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง}} \times 100$$

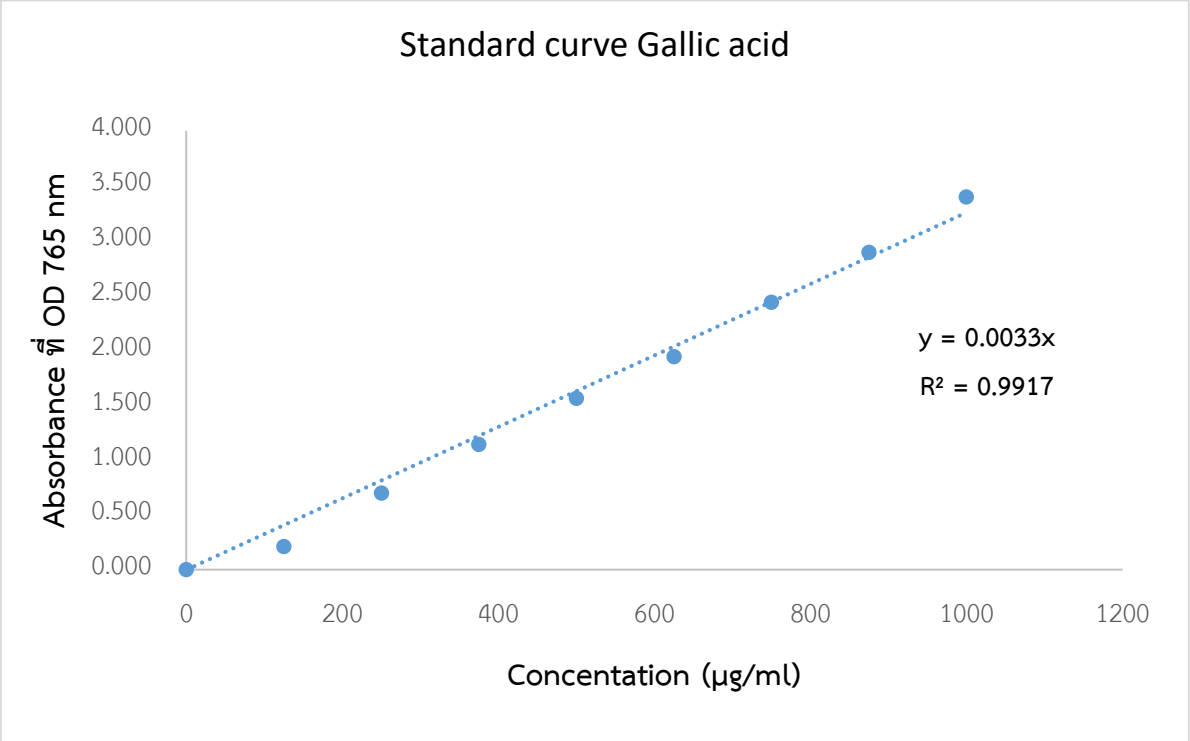
การหาปริมาณร้อยละของคาร์โบไฮเดรต (% Carbohydrate)

% Carbohydrate (w/w) = 100 – %Protein – %Fat – %Crude Fiber - %Ash

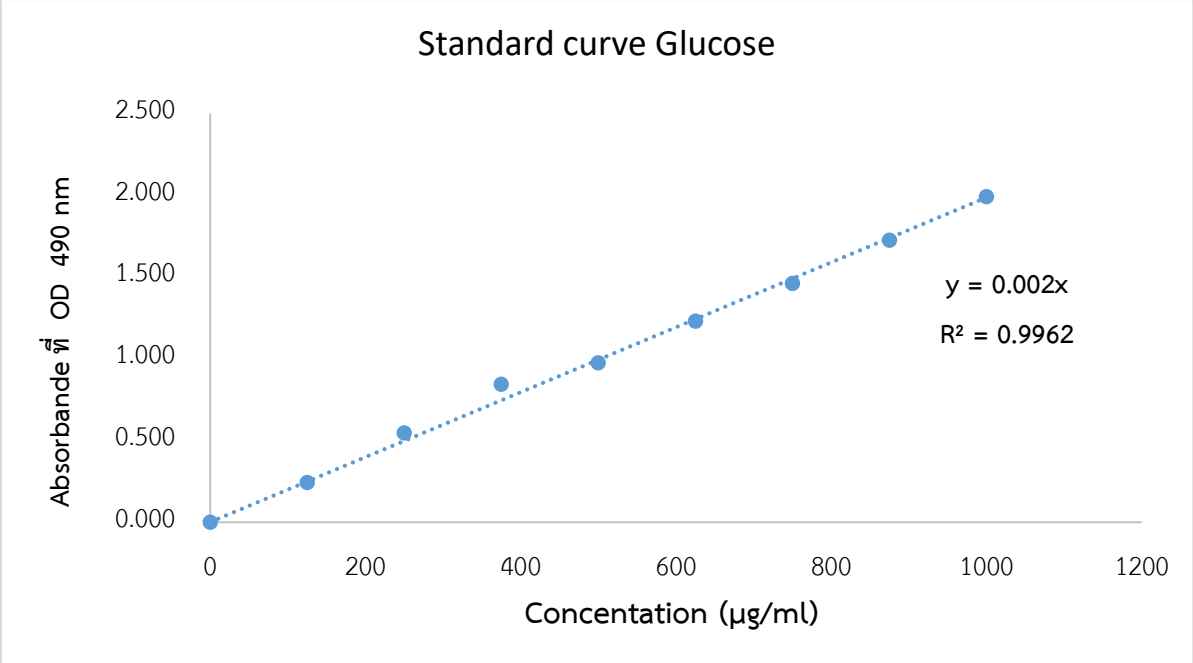
ภาคผนวก ข (Appendix)



รูปที่ 13 กราฟมาตรฐานของ BSA



รูปที่ 15 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิค

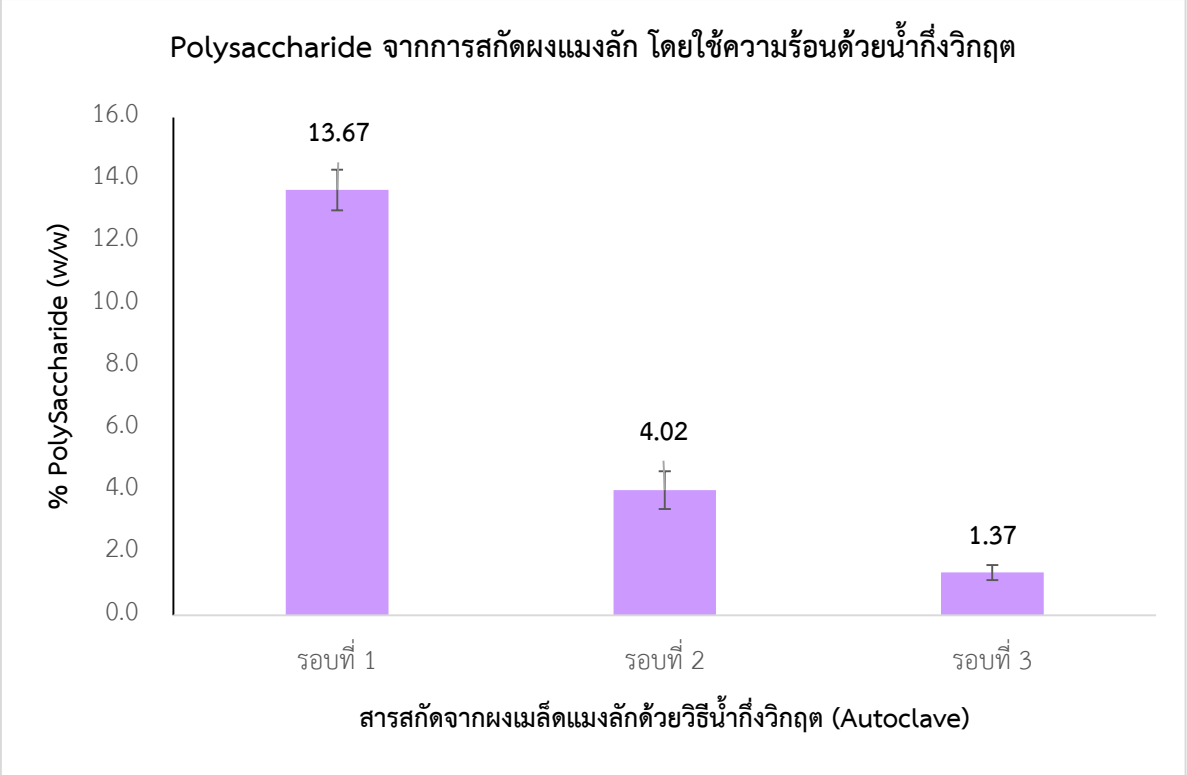


รูปที่ 14 กราฟมาตรฐานของกลูโคส

ตารางที่ 7 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ

ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานกลูโคส (µg/ml)	ปริมาตรสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1 mg/ml (µl)	ปริมาตรน้ำกลั่น (µl)
0	0	1000
125	125	875
250	250	750
375	375	625
500	500	500
625	625	375
750	750	250
875	875	125
1000	1000	0

หมายเหตุ การเตรียมความเข้มข้นต่างๆ สารละลายมาตรฐานกลูโคส โดยใช้สารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 1 mg/ml (1000 µg/ml) ในการทำ dilution



รูปที่ 16 ปริมาณ Polysaccharide ในการสกัดจากผงเมล็ดแมงลักด้วยวิธีน้ำกึ่งวิกฤตในแต่ละรอบการสกัด

ภาคผนวก ค (Appendix)

นำเสนอผลงานในรูปแบบ Poster ของ งานประชุมวิชาการ ระดับนานาชาติ

THE 44th CONGRESS ON SCIENCE AND TECHNOLOGY OF THAILAND (October 29-31, 2018)

Effect of *Ocimum* seed powder toward oil adsorption and change of food coloring

Sajee Noitang, Weradej Sukaead, Ruengwit Sawangkeaw, Sarintip Nimsung*
The Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok, THAILAND
*e-mail: sarintip.n@chula.ac.th

Introduction

Ocimum **seed was a seed crop that mostly cultivated at the area of** ***Sukhothai*** **province in Thailand. The distinctive characteristics of** ***Ocimum*** **seeds were the swelling property and water holding capacity of their mucilage. Because the mucilage at the surface of** ***Ocimum*** **seed greatly adsorbs the surrounding water, it swells and capable to hold some water (shown in Figure 1).**

Ocimum **seed powder is a processed product made with supercritical carbon dioxide extraction : SC-CO_2 (shown in Figure 2).**

Figure 1 Swelling and iodine staining of *Ocimum* seed at 40X by light microscope showing starch granule in hairy tube

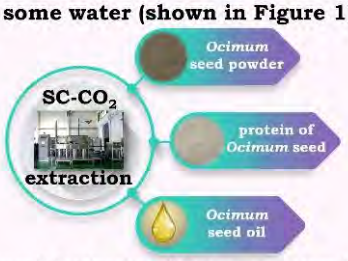


Figure 2 Production of *Ocimum* seed powder

Results

This work studied on the ***Ocimum*** **seed powder's oil adsorption, in comparison to chitosan, gum arabic, xanthan gum and guar gum. It was revealed that chitosan and gum arabic have the highest oil adsorption capacity. Furthermore, the non-steriled** ***Ocimum*** **seed powder has higher oil adsorption capacity than the steriled** ***Ocimum*** **seed powder, xanthan gum and guar gum (Figure 3).**

Another experiments on adsorption of food coloring with ***Ocimum*** **seed powder, testing food colors were green, yellow, and red (concentration of coloring solutions was 1 µl/ml) for an incubation period of 7 days. The experiments revealed that the intensities of green and yellow food coloring solution are slightly darker and then remain stable. Meanwhile, the intensity of red food coloring solution is somewhat lighter (Figure 4).**

Figure 3 Oil adsorption with *Ocimum* seed powder, guar gum, xanthan gum, gum arabic and chitosan

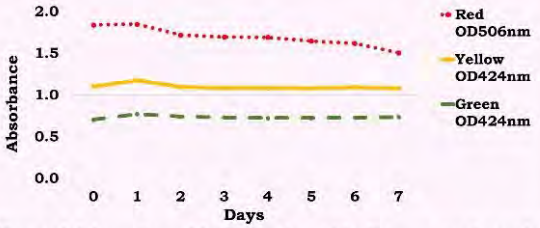


Figure 4 Adsorption of food coloring with *Ocimum* seed powder

Discussions and Conclusions

Therefore, if we are going to apply the knowledge acquired herein with food products, the result suggests that the ***Ocimum*** **seed powder has the oil adsorption rate of 2.65 g oil/g and does not affect on the green and yellow food coloring; however,** ***Ocimum*** **seed powder could be lighten the color of food products that use red food coloring.**

Reference

Thanatcha, R and Pranee, A. 2011. Extraction and characterization of mucilage in *Ziziphus mauritiana* Lam. *International Food Research Journal*, 18: 201-212.

นำเสนอผลงานในรูปแบบ Poster ของ งานประชุมวิชาการระดับชาติ

สำหรับบุคลากรสายสนับสนุนในสถาบันอุดมศึกษา ครั้งที่ 11 (19-21 มิถุนายน 2562)

ประวัตินักวิจัยและคณะ

ประวัติหัวหน้าโครงการ (1.1)

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวศจี น้อยตั้ง
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Ms. Sajee Noitang
2. ความเชี่ยวชาญ
   Food science
3. ตำแหน่ง/สถานที่ทำงานปัจจุบัน
   นักวิจัยผู้ช่วย สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. ที่อยู่และหมายเลขโทรศัพท์ที่สามารถติดต่อได้
   สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   อาคารสถาบัน 3 ซอยจุฬาฯ 62 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพ 10330
   โทรศัพท์ 02-218-8070 (ทำงาน)
   โทรสาร 02-253-3543 e-mail: sajee.n@chula.ac.th

ประวัติผู้ร่วมวิจัย (1.2)

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางศรินทิพ สุกใส
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Sarintip Sooksai
2. ความเชี่ยวชาญ
   Yeast Genetics, Fatty acid biosynthesis
3. ตำแหน่ง/สถานที่ทำงานปัจจุบัน
   ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์
   จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. ที่อยู่และหมายเลขโทรศัพท์ที่สามารถติดต่อได้
   สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   อาคารสถาบัน 3 ซอยจุฬาฯ 62 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพ 10330
   โทรศัพท์ 02-218-8070 (ทำงาน)
   โทรสาร 02-253-3543 e-mail: sarintip.so@chula.ac.th

<u>ประวัติผู้ร่วมวิจัย</u> (1.3)

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายเรืองวิทย์ สว่างแก้ว
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Ruengwit Sawangkeaw
2. ความเชี่ยวชาญ
   เคมีเทคนิค
   การสกัดสารต่างๆ
   Supercritical carbon dioxide
3. ตำแหน่ง/สถานที่ทำงานปัจจุบัน
   นักวิจัย A-4 /สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. ที่อยู่และหมายเลขโทรศัพท์ที่สามารถติดต่อได้
   สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   อาคารสถาบัน 3 ซอยจุฬาฯ 62 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพ 10330
   โทรศัพท์ 02-218-8073 (ทำงาน)
   โทรสาร 02-253-3543 e-mail: rueangwit.s@chula.ac.th

<u>ประวัติผู้ร่วมวิจัย</u> (1.4)

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ว่าที่ ร้อยเอก วีระเดช สุขเอียด
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) WERADEJ SUKAEAD, Army Captain
2. ประวัติการศึกษา ต้องระบุสถาบันการศึกษา สาขาวิชา และปีที่จบการศึกษา
   ปริญญาตรี (เทคโนโลยีการเกษตร) 2532 วิทยาลัยครูภูเก็ต
3. ความเชี่ยวชาญ
   การใช้เทคโนโลยีการเกษตร
   การขยายพันธุ์พืช
   การแปรรูปผลิตผลทางการเกษตร
4. ตำแหน่ง/สถานที่ทำงานปัจจุบัน
   เจ้าหน้าที่วิจัยชำนาญการ/สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์
   จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. ที่อยู่และหมายเลขโทรศัพท์ที่สามารถติดต่อได้
   สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   อาคารสถาบัน 3 ซอยจุฬาฯ 62 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพ 10330
   โทรศัพท์ 02-218-8073 (ทำงาน)
   โทรสาร 02-253-3543 e-mail: weradej.s@chula.ac.th