



การสักระการเสริมรเช่งหน้าท่จากากมะเชือเทศด้วยเอนไซม์ร่วมกับคลิ่นเสียงความถี่สูง

นางสาวพรพร พุธีงักร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

ปีการศึกษา 2567

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

การสกัดสารเสริมรสเชิงหน้าที่จากกากมะเขือเทศด้วยเอนไซม์ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาลักสูตร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

ปีการศึกษา 2567

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

เรื่อง การสักระการเสริมรสนางานที่จากากมาะเชือเทศด้วยเอนไซม์ร่วมกับคลิ่นเสียงความถึสูง

โดย นางสาวพชรพร พุรธังกูร

ได้รับอนุมัติให้ับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา
เคมีอุตสาหกรรม

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย / หัวหน้าภาควิชา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ณัฐรา เลหากุลจิตต์)

ประธานกรรมการ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิกานต์ ซ่อนกลิ่น)

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา เทพวาที)

กรรมการ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อวัช วิเศษสัย)

กรรมการ

ชื่อ : นางสาวพชรพร พุทธิงกูร
 ชื่อวิทยานิพนธ์ : การสกัดสารเสริมรสเชิงหน้าที่จากกากมะเขือเทศด้วย
 เอนไซม์ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง
 สาขาวิชา : เคมีอุตสาหกรรม
 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
 อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิกานต์ ช่อนกลิ่น
 ปีการศึกษา : 2567

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการสกัดสารเสริมรสจากกากมะเขือเทศโดยใช้เอนไซม์ร่วมกับเทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasound assisted extraction, UAE) เพื่อใช้เป็นสารเสริมรสอูมามิ (รสอร่อย) และหน้าที่เชิงสุขภาพในด้านความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด แปรค่าปริมาณเอนไซม์ และระยะเวลาในการสกัดที่มีผลต่อปริมาณผลได้ (yield) ปริมาณโปรตีน ปริมาณกรดกลูตามิก ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH•, ABTS•+, hydroxyl, superoxide และ FRAP และการยอมรับด้านประสาทสัมผัสด้านรสชาติ วิเคราะห์สภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีทางสถิติ response surface methodology (RSM) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารเสริมรสจากกากมะเขือเทศโดยใช้เอนไซม์ร่วมกับเทคนิค UAE คือ ปริมาณโบรมิเลนร้อยละ 15 เวลา ร่วมกับการสกัดด้วย UAE 30 นาที มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH•, ABTS•+, hydroxyl, superoxide และ FRAP สูงเท่ากับร้อยละ 70.18, 84.82, 97.38, 21.94 และ 0.154 mM Fe²⁺/mg ตามลำดับ มีคะแนนด้านรสอูมามิสูง และการยอมรับโดยรวมอยู่ในเกณฑ์สูง มีค่าเท่ากับ 3.4 และ 3.3 ตามลำดับ พบปริมาณกรดกลูตามิกเท่ากับ 37,656.63 mg/100g นอกจากนี้พบว่าสารสกัดเสริมรสจากมะเขือเทศมีกลิ่นรสที่เป็นลักษณะของมะเขือเทศ ได้แก่ hexanal และ 2-isobutylthiazole เจือจางลงพบสาร gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, syringic acid, ferulic acid, 2-hydroxycinnamic acid, rutin และ naringin เป็นองค์ประกอบหลักในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ซึ่งพบในปริมาณเท่ากับ 540.63, 28.56, 232.02, 375.41, 26.92, 7.68, 65.85 และ 5247.86 mg/100g ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดเสริมรสจากมะเขือเทศนี้ไปทดสอบในระดับเซลล์พบว่า ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cell) ที่ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 31.25 µg/mL โดยมีค่าความเป็นต่อเซลล์ IC₅₀ เท่ากับ 220.7 µg/mL มีความสามารถในการ

การต้านการอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจ (RAW264.7) ได้ ยับยั้งการเกิดไนตริกออกไซด์ (NO) 22.64 $\mu\text{mol/L}$ ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งยับยั้งการเกิด NO ได้ประมาณร้อยละ 30 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบอย่างเดียวยด้วย lipopolysaccharide (LPS) มีความสามารถในการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ (cytokine) ชนิด Interleukin-6 (IL-6) ได้เท่ากับ 799.06 pg/mL แต่ไม่มีผลต่อการหลั่งไซโตไคน์ tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารเสริมรสจากมะเขือเทศมีการออกฤทธิ์ในการลดการอักเสบภายในเซลล์ได้โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ จากนั้นสารเสริมรสที่สกัดได้จากสภาวะที่เหมาะสมไปประยุกต์ใช้เป็นสารเสริมรสรสชาติต้มยำ โดยแปรค่าอัตราส่วนในสูตรผงปรุงรส ทดสอบการยอมรับด้านประสาทสัมผัสด้านรสชาติด้วยผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน พบว่าอัตราส่วนร้อยละ 30 เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในสูตรผงปรุงรส เนื่องจากให้คะแนนด้านรสชาติอูมามิและการยอมรับโดยรวมที่สูง และไม่เข้มข้นมากเกินไปจนระดับการรับได้ของผู้ทดสอบ จากการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่าสารเสริมรสที่สกัดได้จากกากมะเขือเทศด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง สามารถพัฒนาต่อยอดไปเป็นสารปรุงรสเชิงหน้าที่ สำหรับผู้บริโภคที่ต้องการเสริมรสชาติอร่อยจากสารสกัดจากธรรมชาติ และให้ประโยชน์แก่ร่างกาย ในด้านฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และการต้านการอักเสบ

(มีจำนวนทั้งสิ้น 113 หน้า)

คำสำคัญ : มะเขือเทศ การสกัดด้วยเอนไซม์ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง สารต้านอนุมูลอิสระ รสอูมามิ และการต้านการอักเสบ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Name : Miss Pacharaporn Putthangkul
Thesis Title : Extraction of functional flavoring agent from tomato
pomace by enzyme- assisted ultrasonic extraction
Major Field : Industrial Chemistry
King Mongkut's University of Technology North
Bangkok
Thesis Advisor : Assistant Professor Chanikan Sonklin, Ph.D.
Academic Year : 2024

ABSTRACT

This research was aimed to extract the functional flavor enhancer from tomato pomace using enzyme-ultrasonic assisted extraction (enz + UAE) for enhancing umami taste (tasty) combined with antioxidant activity. The optimal condition of tomato extract was determined through statistical analysis using Response Surface Methodology (RSM), focusing on parameters as enzyme content and extraction time, which were treated as independent variables. Key criteria evaluated included yield, protein content, glutamic amino acid content, total phenolic compounds, total flavonoid content, antioxidant activity (DPPH•, ABTS•+, hydroxyl, superoxide and FRAP) and sensory analysis score. The optimum condition was investigated to be 15% of bromelain concentration and extraction time for 30 min by ultrasound. Under these combination condition, high scores achieved for all criteria, with antioxidant activities measured as 70.18% (DPPH•), 84.82% (ABTS•+), 97.38% (hydroxyl radical), 21.94% (superoxide radical) and 0.154 mM Fe²⁺/mg (FRAP). The umami and overall acceptance scores were 3.4 and 3.3, respectively. The glutamic acid was detected 37,656.63 mg/100g. Additionally, the extraction process reduced the predominant tomato odorant. The hexanal and 2-isobutylthiazol which were defined by GC-MS. gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, syringic acid, ferulic acid, 2-hydroxycinnamic acid, rutin and naringin were main phenolic compounds found, with concentrations of 540.63,

28.56, 232.02, 375.41, 26.92, 7.68, 65.85 and 5247.86 mg/100g, respectively. In cytology experiments, the tomato extracted had non-toxicity in normal cell (Vero cell) at maximum concentration of 31.25 $\mu\text{g/mL}$ and IC_{50} of 220.7 $\mu\text{g/mL}$. The tomato extracted exhibited anti-inflammatory activity in macrophage cell (RAW264.7) by suppressing NO released as 22.64 $\mu\text{mol/L}$ at 100 $\mu\text{g/mL}$. The treatment demonstrated a significant efficacy, leading to a 30% reduction in NO levels in cells treated by lipopolysaccharide (LPS). It also served as an anti-inflammatory cytokine, responding directly to Interleukin-6 (IL-6) with 799.06 pg/mL , whereas it did not affect tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha). Results confirmed that the tomato extract acted to anti-inflammatory without toxicity. The extract, derived from the optimal condition, was formulated as a flavor enhancer for Tom-Yam powder. The 30% tomato extract achieving high score in umami and overall acceptance. There for, the tomato extract passing the enzyme ultrasonic assisted extraction process may be developed as functional flavoring agent, providing desirable taste and health benefits.

(Total 113 Pages)

Keywords: Tomato, enzyme-ultrasonic assisted extraction, antioxidant, umami taste and anti-inflammatory

Advisor

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยการสนับสนุนจาก ผศ.ดร. ชนิกันต์ ช่อนกลิ่น อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่สละเวลาให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะ รวมถึงการตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ของวิทยานิพนธ์ จนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบขอบคุณเป็นอย่างสูง ขอขอบคุณภาควิชาเคมีอุตสาหกรรม ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ที่สนับสนุนสถานที่ทดลอง สารเคมี และเครื่องมือวิเคราะห์จนทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ขอขอบคุณคณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่สนับสนุนสถานที่ทดลอง สารเคมี และเครื่องมือวิเคราะห์จนทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณครอบครัวและทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องที่ไม่ได้กล่าวถึง ที่คอยให้กำลังใจและให้การสนับสนุนตลอดมาจนสำเร็จการศึกษา

พชรพร พุทธิงกูร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ.....	ฅ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	๗
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ปัญหาและที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 มะเขือเทศ.....	5
2.1.1 สายพันธุ์มะเขือเทศพื้นเมือง	5
2.1.2 องค์ประกอบทางเคมีของมะเขือเทศ.....	6
2.2 เทคนิคการสกัด.....	13
2.2.1 การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์.....	13
2.2.2 การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic assisted extraction, UAE)	18
2.3 กลไกการทำงานของกรดกลูตามิกด้านการเสริมรสชาติ.....	21
2.4 กลไกการทำงานของกรดกลูตามิกด้านการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	24

2.5 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ.....	25
2.5.1 DPPH• radical scavenging activity	25
2.5.2 ABTS•+ radical scavenging activity	27
2.5.3 Hydroxyl radical scavenging activity	29
2.5.4 Superoxide radical scavenging activity.....	29
2.5.5 Ferric reducing antioxidant power (FRAP)	30
2.6 การอักเสบ	30
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	32
3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	32
3.2 สารเคมี.....	32
3.3 วิธีการศึกษาและการทดลอง.....	33
3.3.1 การเตรียมตัวอย่างจากมะเขือเทศและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี	33
3.3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารเสริมรสชาติเชิงสุขภาพจากมะเขือเทศโดยใช้ โบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง.....	33
3.3.3 วิธีวิเคราะห์ปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้ (yield).....	34
3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดย วิธี Bradford protein assay.....	34
3.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูตามิก.....	35
3.3.6 วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compounds)	35
3.3.7 วิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid compounds)	35
3.3.8 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารฟีนอลิก (phenolic compounds)	36
3.3.9 การทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติ.....	36
3.3.10 วิเคราะห์องค์ประกอบสารให้กลิ่นรส (volatile compounds).....	37
3.3.11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) ของจากมะเขือเทศ	38
3.3.12 วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	38
3.3.13 การหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง.....	41

3.3.14 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ	41
3.3.15 การทดสอบความสามารถด้านอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมโครฟาจ	42
3.3.16 การทดสอบ IL-6 และ TNF-alpha	42
3.3.17 การศึกษาการประยุกต์ใช้สารเสริมรสที่สกัดได้จากมะเขือเทศโดยใช้โบรมิเลนร่วมกับ กลิ่นเสียงความถี่สูง จากสภาวะที่ดีที่สุด	43
3.3.18 การวิเคราะห์ทางสถิติ	44
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	45
4.1 องค์ประกอบทางเคมีของกากมะเขือเทศ	45
4.2 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยโบรมิเลนร่วมกับกลิ่นเสียงความถี่สูง	46
4.3 ปริมาณร้อยละผลได้ของสารสกัดจากกากมะเขือเทศ	47
4.4 ปริมาณโปรตีนโดย วิธี Bradford protein assay	47
4.5 ปริมาณกรดกลูตามิก	49
4.6 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด	50
4.7 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด.....	51
4.8 ชนิดและปริมาณสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์.....	52
4.9 การยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสด้านการรับรสชาติ.....	55
4.10 วิเคราะห์องค์ประกอบสารให้กลิ่นรส (Volatile compound)	57
4.11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) ของกากมะเขือเทศ	61
4.12 วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารเสริมรสจากกากมะเขือเทศ	62
4.12.1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH•.....	62
4.12.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย ABTS•+	64
4.12.3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Hydroxyl radical scavenging activity	65
4.12.4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Superoxide radical scavenging activity.....	66

4.12.5 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP).....	67
4.13 การหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง.....	69
4.14 ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ.....	76
4.15 ความสามารถต้านอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ.....	77
4.16 ผลของสารสกัดมะเขือเทศที่มีผลต่อไซโตไคน์ IL-6 และ TNF-alpha	79
4.17 การประยุกต์ใช้สารเสริมรสที่สกัดได้จากมะเขือเทศโดยใช้โพรมิเตอร์ร่วมกับกลิ่นเสียงความถี่สูงจากสภาวะที่ดีที่สุดในการผลิตภัณท์น้ำดื่ม.....	80
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	82
บรรณานุกรม	83
ภาคผนวก	95
ประวัติผู้เขียน.....	113

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2- 1 ปริมาณกรดกลูตามิกสูงที่สุดในอาหารประเภทผัก	7
ตารางที่ 2- 2 ปริมาณไลโคปีนในมะเขือเทศและผลิตภัณฑ์มะเขือเทศ	10
ตารางที่ 2- 3 คุณค่าทางโภชนาการของมะเขือเทศสีแดงสด ต่อ 100 กรัม.....	11
ตารางที่ 2- 4 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของผักชนิดต่าง ๆ	12
ตารางที่ 4- 1 ร้อยละขององค์ประกอบทางเคมีของกากมะเขือเทศ.....	45
ตารางที่ 4- 2 ชนิดและปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากมะเขือเทศ	54
ตารางที่ 4- 3 ตารางแสดงชนิดของสารให้กลิ่นรสในสารสกัดมะเขือเทศ.....	59
ตารางที่ 4- 4 ตารางแสดงค่าโมเดล รีเกรสชั่น.....	69
ตารางที่ 4- 5 OBSERVED AND PREDICTED VALUES OF THE CONFIRMATION EXPERIMENTS	75

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 2- 1 โครงสร้างโมเลกุลของกรดกลูตามิก.....	7
ภาพที่ 2- 2 โครงสร้างโมเลกุลของกรดแอสพาร์ติก.....	8
ภาพที่ 2- 3 โครงสร้างโมเลกุลของแคโรทีนอยด์.....	9
ภาพที่ 2- 4 โครงสร้างโมเลกุลของไลโคปีน.....	10
ภาพที่ 2- 5 โครงสร้างโมเลกุลของกรดแกลลิก.....	12
ภาพที่ 2- 6 การตัดสายโปรตีนโดยใช้เอนไซม์.....	15
ภาพที่ 2- 7 กลไกการทำงานของโบรมิเลน.....	17
ภาพที่ 2- 8 เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (ULTRASONIC PROCESSOR).....	18
ภาพที่ 2- 9 การเกิดฟองอากาศในตัวกลางเนื่องจากคลื่นอัลตราโซนิก.....	19
ภาพที่ 2- 10 ตุ่มรับรสในช่องปาก (TASTE BUD).....	22
ภาพที่ 2- 11 แผนผังแสดงการส่งสัญญาณการรับรสชาติระหว่างลิ้นและสมอง.....	23
ภาพที่ 2- 12 DPPH• RADICAL และ DPPH• STABLE.....	26
ภาพที่ 2- 13 FORMATION OF STABLE ABTS•+ RADICAL FROM ABTS•+ WITH POTASSIUM PERSULFATE.....	28
ภาพที่ 2- 14 FORMATION OF ABTS•+ FROM STABLE ABTS•+ RADICAL WITH ANTIOXIDANT MATERIAL.....	28
ภาพที่ 4- 1 ร้อยละผลได้ของสารสกัดจากกากมะเขือเทศ.....	47
ภาพที่ 4- 2 ปริมาณโปรตีนของสารสกัดจากกากมะเขือเทศ.....	48
ภาพที่ 4- 3 ปริมาณกรดกลูตามิกของสารสกัดจากกากมะเขือเทศ.....	49
ภาพที่ 4- 4 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากกากมะเขือเทศ.....	51
ภาพที่ 4- 5 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากกากมะเขือเทศ.....	52
ภาพที่ 4- 6 คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของกากมะเขือเทศ.....	56
ภาพที่ 4- 7 แผนที่ความร้อนแสดงความสัมพันธ์ของสภาวะการสกัดด้วยเอนไซม์ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงต่อปริมาณสารให้กลิ่นรสในสารสกัดจากกากมะเขือเทศ.....	60
ภาพที่ 4- 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	62
ภาพที่ 4- 9 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH•.....	63
ภาพที่ 4- 10 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS•+.....	64
ภาพที่ 4- 11 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ HYDROXYL.....	66

ภาพที่ 4- 12 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ SUPEROXIDE	67
ภาพที่ 4- 13 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP	68
ภาพที่ 4- 14 ภาพแสดงพื้นที่ผิวตอบสนอง (RSM)	74
ภาพที่ 4- 15 ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (VERO CELL) ของสารสกัดมะเขือเทศ	76
ภาพที่ 4- 16 ผลการทดสอบความสามารถต้านอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจของสารสกัดมะเขือเทศ	78
ภาพที่ 4- 17 ผลของสารสกัดมะเขือเทศที่มีผลต่อ IL-6 และ TNF-ALPHA	79
ภาพที่ 4- 18 ลักษณะของผงแห้งของสารสกัดจากมะเขือเทศที่ใช้เป็นสารเสริมรสเชิงสุขภาพ.....	80
ภาพที่ 4- 19 อัตราส่วนของผงปรุงรสอูมิมาในน้ำต้มยำ.....	81
ภาพที่ 4- 20 คะแนนการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสด้านรสชาติของน้ำต้มยำที่ปรุงแต่งด้วยสารสกัดมะเขือเทศจากมะเขือเทศ.....	81



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ปัญหาและที่มาของงานวิจัย

เนื่องจากการพัฒนาทางการแพทย์ที่ก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้อายุเฉลี่ยของคนไทยเพิ่มมากขึ้น จึงทำให้โครงสร้างประชากรไทยเปลี่ยนแปลงไปอย่างรวดเร็ว โดยสัดส่วนของประชากรวัยสูงอายุ (มากกว่า 60 ปี) โดยประชากรผู้สูงอายุในปี 2565 นั้นมีมากถึง 12,116,199 คน คิดเป็น 18.3% ของประชากรทั้งหมด ทำให้ประเทศไทยถูกจัดอยู่ในสถานะที่เรียกว่าสถานะประชากรสูงอายุ หรือสังคมผู้สูงอายุ [1] ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการเตรียมการในด้านต่าง ๆ โดยเฉพาะด้านสุขภาพ ซึ่งการบริโภคอาหารที่มีประโยชน์เป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้ผู้สูงอายุมีสุขภาพแข็งแรงและมีชีวิตยืนยาวได้ ทำให้ลดภาระค่าใช้จ่ายด้านยารักษาโรคมามากขึ้น แต่เนื่องด้วยผู้สูงอายุมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่เสื่อมลง จึงทำให้การดูดซึมอาหารไม่ดี อีกทั้งการรับรู้ด้านประสาทรับรสและกลิ่นทำงานได้ไม่ดี ไม่มีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะความไวต่อการรับรสหวานและเค็มลดลงอย่างมาก ผู้สูงอายุจึงมักชอบอาหารหวานและเค็มจัดซึ่งเป็นโทษต่อสุขภาพ เมื่อรับประทานอาหารสุขภาพซึ่งส่วนมากมีรสชาติอ่อน รสหวานเค็ม ส่งผลให้ผู้สูงอายุมีความอยากอาหารลดลง ผู้สูงอายุจึงไม่สามารถรับประทานได้ตามสัดส่วนที่ควรบริโภค ทำให้ได้รับสารอาหารไม่ครบถ้วน เนื่องด้วยการรับรสน้อยลงผู้สูงอายุส่วนใหญ่จึงชอบรับประทานอาหารที่มีรสเค็มจัดหวานจัด จำพวกแป้งและน้ำตาล ทำให้เกิดปัญหาเรื่องโรคอ้วน โรคไตหรือขาดสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกาย ก่อให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพในระยะยาว

ปัจจุบันนอกจากการคำนึงถึงสุขอนามัย กลิ่นรสเป็นปัจจัยสำคัญในการเลือกซื้ออาหารของผู้บริโภค ดังนั้นอุตสาหกรรมอาหารจึงมุ่งเน้นความสำคัญให้กับกลิ่นรสเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งรสอร่อย หรือที่รู้จักกันดีในคำว่าอูมามิ (umami) สารที่ทำให้เกิดรสอูมามิ คือ กลูตาเมต (glutamate) หรือกรดกลูตามิก (glutamic acid) ส่วนโมโนโซเดียมกลูตาเมตหรือผงชูรสที่เติมในอาหารนั้นผลิตได้จากมันสำปะหลังโดยกระบวนการหมักและการทำปฏิกิริยาด้วยสารเคมี ซึ่งอาจมีผลข้างเคียงต่อผู้บริโภค [2] ในธรรมชาติพบกลูตาเมตในส่วนที่เป็นโปรตีน เนื่องจากกลูตาเมตสามารถจับกับกรดอะมิโนอื่น ๆ เกิดเป็นโครงสร้างของโปรตีน [3] นอกจากนี้กรดกลูตามิกและแอสพาร์ติก (aspartic acid) ยังเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดรสอูมามิเช่นกัน [4] โดยพบได้ในเมลอน มันฝรั่ง และมะเขือเทศ [5] ในขณะเดียวกันมีงานวิจัยว่ามะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* L.) เป็นแหล่งสารอาหารและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี [6] ส่วนมากมักใช้มะเขือเทศในการนำไปผลิตเป็นมะเขือเทศแปรรูป น้ำมะเขือเทศ และ ซอสมะเขือเทศ [7] ทำให้มีกากมะเขือเทศเหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก ส่วนใหญ่นำมาใช้เป็นอาหารสัตว์หรือนำไปทิ้งในหลุมฝังกลบ [8] แต่ในกากมะเขือเทศยังมี ไฟเบอร์

59.03% น้ำตาลทั้งหมด 25.73% โปรตีน 19.27% เพคติน 7.55% ไขมันทั้งหมด 5.85% และแร่ธาตุ 3.92% [9] นอกจากนี้ กากมะเขือเทศยังมีสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และกรดอะมิโนต่าง ๆ [10] แต่เนื่องจากกรดอะมิโนเหล่านั้นไม่สามารถให้รสอูมามิได้เมื่ออยู่ในรูปของโปรตีน แต่แสดงความสามารถในการให้รสอูมามิเมื่ออยู่ในรูปของกรดอะมิโนอิสระหรือเปปไทด์สายสั้น ๆ โดยการไฮโดรไลซ์ด้วยกระบวนการทางเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) มีงานวิจัยพบว่าการสกัดด้วยเอนไซม์สามารถสกัดกรดกลูตามิกจากมะเขือเทศได้สูงถึง 292 มก./100ก. [11] และยังมีการใช้เอนไซม์ปาเปนในการสกัด พบกรดกลูตามิกเท่ากับ 727.60 $\mu\text{g/mL}$ [12] นอกจากนี้ยังมีอีกหนึ่งเทคนิคในการสกัดคือการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง ultrasound assisted extraction (UAE) เป็นวิธีที่ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์หรือน้ำในการสกัดสารสำคัญจากตัวอย่าง [13] เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า cavitation คือกระบวนการที่เกิดขึ้นในตัวกลาง เมื่อสารละลายที่ได้รับ คลื่นเสียงความถี่สูง (คลื่นอัลตราโซนิก หรือเรียกว่า คลื่นเสียงความถี่สูง) ทำให้เกิดฟองอากาศในตัวกลาง ทำให้เกิดแรงกลและส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมีและทางกายภาพได้ โดยเมื่อโครงสร้างของของเหลวที่ได้รับพลังงานจากคลื่นอัลตราโซนิก จะเกิดการถูกบีบอัด (compress) และคลายตัว (stretch) ซ้ำไปมาเป็นจำนวนหลายพันรอบ ทำให้เกิดฟองอากาศขึ้น และ ฟองอากาศที่เกิดขึ้นภายในของเหลวนี้ รับแรงสั่นที่เกิดจากคลื่นอัลตราโซนิกเป็นระยะ ๆ ทำให้เกิด การอัดขยาย ๆ เป็นผลให้ฟองอากาศมีขนาดใหญ่ขึ้น จนทำให้เซลล์แตก ส่งผลให้สารต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์สามารถออกมาได้ งานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า เมื่อสกัดกรดกลูตามิกจากพืชชนิดต่าง ๆ พบกรดกลูตามิกในอะโวคาโด แอปเปิล องุ่น กีวี หัวหอม เห็ด มันฝรั่ง และมะเขือเทศ เท่ากับ 18, 4, 5, 5, 51, 42, 10 และ 246 มก./100 ก. ตามลำดับ [14] และยังมีการสกัดกรดกลูตามิกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงพบว่ามีปริมาณกรดกลูตามิกสูงถึง 0.12 mg และยังพบสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด $2.84 \pm 0.11 \text{ mg GAE/g}$ และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด $2.11 \pm 0.14 \text{ mg RE/g}$ ส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ $58.67 \pm 2.42 \mu\text{mol Trolox/g}$ [15] มีรายงานการสกัดไลโคปีนจากกากมะเขือเทศ พบปริมาณไลโคปีนมากถึง 4.12 เท่า [16] และสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากผลไม้วงศ์เบอร์รี่ด้วยวิธีการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง พบสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ $32.17 \pm 0.46 \text{ mg/g}$ คิดเป็น 1.29–1.44 เท่า เมื่อเทียบกับวิธีการสกัดแบบปกติ โดยเมื่อใช้ UAE ในการสกัดสกุโลฐาน้ำเต้าพบว่า มีกรดคลอโรจีนิก ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกสูงถึง 26.68 mg/g [17] แสดงให้เห็นว่า UAE ช่วยในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกออกมาได้ในปริมาณที่สูง และมะเขือเทศยังมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง [18] มีรายงานอีกว่าผลของ naringin และ naringenin ซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์ ในมะเขือเทศช่วยลดการก่อตัวของลิ่มเลือดที่บวมน้ำได้ ซึ่งบ่งชี้ถึงฤทธิ์ด้านการอักเสบในลิ่มเลือดใหญ่ของหนูทดลอง [19] และสามารถปกป้องเซลล์จากความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และป้องกันเซลล์จากความเป็นพิษที่เหนียวแน่น โดย H_2O_2 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ [20] จากการใช้เอนไซม์ร่วมกับวิธีการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง

งานวิจัยนี้มุ่งหวังว่าเทคนิคนี้ทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดกรดกลูตามิกสูงขึ้น นอกจากนี้ เทคนิค UAE เป็นเทคนิคที่ทำให้เซลล์แตก และทำให้สารละลายเข้าไปสกัดสารสำคัญออกมาได้ดีมากขึ้น เทคนิคนี้น่าจะสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสารสำคัญต่าง ๆ เช่น กรดอะมิโน สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์จากมะเขือเทศได้

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาการใช้เทคนิคในการสกัดที่เป็น green chemistry โดยการผสมผสานระหว่างการสกัดโดยใช้เอนไซม์ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enzyme ultrasound assisted extraction, Enz-UAE) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดกรดอะมิโนที่ให้รสชาติอร่อย และสารสำคัญชนิดต่าง ๆ ในกากมะเขือเทศเหลือทิ้ง ศึกษาสมบัติ หน้าที่สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ของสารสกัด ได้แก่ การต้านอนุมูลอิสระ การต้านการอักเสบ และประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ต้นแบบ เช่น ซอสปรุงรสสำเร็จรูป หรือผงปรุงรส เป็นต้น ซึ่งมุ่งเน้นหาส่วนผสมในอาหารฟังก์ชันแหล่งใหม่ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร และต่อยอดในอุตสาหกรรมอาหารให้เข้ากับเทรนด์ของ อาหารเชิงสุขภาพในอนาคต เพื่อส่งผลต่อรายได้และการเติบโตทางเศรษฐกิจของประเทศ

1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกากมะเขือเทศด้วย เทคนิคการสกัดโดยใช้เอนไซม์ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enzyme and ultrasound assisted extraction, Enz-UAE) ด้วยวิธี Response surface methodology (RSM)
2. เพื่อศึกษาความสามารถในการให้รสชาติของสารสกัดจากกากมะเขือเทศ และความสามารถ ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ
3. เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจาก มะเขือเทศ
4. เพื่อศึกษาปริมาณของกรดกลูตามิกในสารสกัดจากมะเขือเทศ
5. เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ และการต้านการอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาว

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. เตรียมตัวอย่างกากมะเขือเทศ โดยนำกากมะเขือเทศมาทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง freeze drier วิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ลักษณะที่ปรากฏ องค์ประกอบทางเคมี (AOAC,2000)
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารเสริมรสเชิงหน้าที่จากกากมะเขือเทศด้วยเทคนิค การสกัดโดยใช้เอนไซม์ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง

3. ศึกษาการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัส ด้วยวิธีวิธีทดสอบแบบ qualitative different test ให้คะแนนแบบ 5-point scoring test วางแผนการทดลองแบบ Randomized Completely Block Design (RCBD) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดย DMRT ด้วยโปรแกรม SAS, Version 9.0 (2004)
4. ศึกษาปริมาณกรดกลูตามิกด้วย High performance liquid chromatography (HPLC) [21]
5. ศึกษาชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) และสารฟลาโวนอยด์ (flavonoid compounds) ด้วยวิธี HPLC [22]
6. ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยทดสอบด้วยวิธี DPPH• radical scavenging activity, ABTS•+ radical scavenging activity, ferric reduce antioxidant power [23], hydroxyl radical scavenging activity และ superoxide radical scavenging activity [24]
7. การวิเคราะห์ในระดับเซลล์ โดยทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ [20] และศึกษาฤทธิ์ในการต้านอักเสบ [25]
8. นำไปประยุกต์เป็นผลิตภัณฑ์เสริมรสเชิงสุขภาพรูปแบบเครื่องปรุงรสสำเร็จรูป (รสต้มยำ)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกรดกลูตามิกและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกากมะเขือเทศด้วยการเทคนิคผสมผสานระหว่างการสกัดโดยใช้เอนไซม์ร่วมกับ คลื่นเสียงความถี่สูง
2. เป็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่าให้กากมะเขือเทศเหลือทิ้งและช่วยลดมลพิษสิ่งแวดล้อม
3. สามารถนำกรดกลูตามิกที่สกัดได้ไปประยุกต์เป็นผลิตภัณฑ์เสริมรสเชิงสุขภาพรูปแบบเครื่องปรุงรสสำเร็จรูป (รสต้มยำ) ได้
4. เป็นแนวทางในการผลิตเครื่องปรุงรสสำเร็จรูป (รสต้มยำ) สำหรับผู้ที่บริโภคมังสวิรัต

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะเขือเทศ

มะเขือเทศ (Tomato) เป็นพืชวงศ์มะเขือ มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Lycopersicon esculentum* Mill. จัดอยู่ใน อาณาจักร *Plantae* อาณาจักรย่อย *Tracheobionta* หมวด *Magnoliophyta* ชั้น *Magnoliopsida* ชั้นย่อย *Asteridae* อันดับ *Solanales* วงศ์ *Solanaceae* สกุล *Solanum* สปีชีส์ *S. lycopersicum* สรรพคุณตามตำรายาไทยระบุว่า ใบ ใช้รักษาหน้าเกรียมเนื่องจากถูกแดดเผา ผล ใช้เป็นยาระบาย ช่วยให้เจริญอาหาร แก้กษหายน้ำ แก้ไฟไหม้ น้ำร้อนลวก ช่วยย่อยอาหาร และใช้พอกเลือด น้ำมะเขือเทศที่คั้นใหม่ ๆ สามารถใช้ทำความสะอาดผิว ทำให้ผิวนุ่มเนียน จึงนิยมนำมะเขือเทศมาพอกหน้า ส่วนใหญ่มักจะนำมะเขือเทศไปผลิตเป็นน้ำมะเขือเทศ และซอสมะเขือเทศ [9] และปัจจุบันก็มีการใช้น้ำมะเขือเทศเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางด้วย เนื่องจากในมะเขือเทศมีกรดอินทรีย์ น้ำตาล วิตามิน และสารสำคัญในกลุ่มแคโรทีนอยด์ ทำให้มะเขือเทศมีความโดดเด่นเหนือพืชผักอื่น ๆ

2.1.1 สายพันธุ์มะเขือเทศพื้นเมือง

มะเขือเทศพันธุ์พื้นเมืองมีความหลากหลายในด้านลักษณะปรากฏ สีสัน ที่ขึ้นอยู่กับแหล่งปลูก สภาพอากาศ ซึ่งมะเขือเทศพันธุ์พื้นเมืองในภาคเหนือตอนบน แบ่งออกได้เป็น 5 พันธุ์ คือ พันธุ์พื้นเมืองเบอร์ 1 พันธุ์พื้นเมืองเบอร์ 2 พันธุ์สีดำ พันธุ์อีเปอ และพันธุ์เพชรชมพู ทั้งหมด 5 สายพันธุ์พบว่า

มะเขือเทศพันธุ์พื้นเมืองเบอร์ 1 เป็นพันธุ์รวบรวมมาจากเกษตรกรที่อยู่ในอำเภอดอยสะเก็ด ลักษณะพันธุ์มีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ต้นแข็งแรง ให้ผลผลิตสูง ผลดิบมีไหลผลเป็นสีเขียว ผลสุกสีแดงทั้งผล ไม่จำเป็นต้องทำค้างยกเว้นในช่วงฤดูฝน เป็นพันธุ์ที่เหมาะสมในการปลูกฤดูร้อนเพราะมีใบดก ผลมักจะอยู่ใต้ใบ แต่สามารถปลูกได้ทุกฤดู ช่อผลมี 5-8 ผล มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 3.8-4.0 องศาบริกซ์ จำนวนเมล็ด 84-155 เมล็ด ต่อผล ขนาดผลกว้าง 3.47-3.90 เซนติเมตร สูง 3.75-4.35 เซนติเมตร น้ำหนัก 20.00-22.22 กรัมต่อผล จำนวนผลสด 45-50 ผลต่อกิโลกรัม ผลผลิต 3,999 กิโลกรัมต่อไร่

มะเขือเทศพันธุ์พื้นเมืองเบอร์ 2 เป็นพันธุ์รวบรวมมาจากบ้านวังเลียบ จังหวัดลำปาง เป็นพันธุ์ที่มีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ต้นแข็งแรง ให้ผลผลิตสูง เหมาะสำหรับการปลูกในฤดูฝน มีใบน้อยทนทานต่อโรค ทรงพุ่มสม่ำเสมอ ไม่ต้องทำค้าง ไม่ต้องตัดแต่ง และสามารถปลูกได้ทุกฤดู ให้ผลผลิตสูง ผลดิบมีสีเขียวอ่อนค่อนข้างขาว ส่วนมากทรงพุ่มโปร่งเห็นผลได้ชัดเจนผลสุกสีแดงทั้งผล

มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 4.0-5.0 องศาบริกซ์ จำนวนเมล็ด 92-110 เมล็ดต่อผล ขนาดผลกว้าง 3.50 เซนติเมตร สูง 3.50 เซนติเมตร น้ำหนัก 17.55-20.00 กรัมต่อผล จำนวนผลสด 50-57 ผลต่อกิโลกรัม ผลผลิต 3,785 กิโลกรัมต่อไร่

มะเขือเทศพันธุ์สีดา มีลักษณะต้นเป็นทรงพุ่มกิ่งเลื้อยเมื่อสุกมีสีชมพูมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 3.5-4.0 องศาบริกซ์ จำนวนเมล็ด 55-114 เมล็ดต่อผล ขนาดผลกว้าง 3.50 เซนติเมตร สูง 4.20 เซนติเมตร น้ำหนัก 20.00-28.00 กรัมต่อผล จำนวนผลสด 37-50 ผลต่อกิโลกรัม ผลผลิต 3,200 กิโลกรัมต่อไร่

มะเขือเทศพันธุ์อีป้อ มีลักษณะต้นเป็นทรงพุ่มกิ่งเลื้อย เมื่อสุกมีสีส้ม มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 3.5-3.8 องศาบริกซ์ จำนวนเมล็ด 42-55 เมล็ดต่อผล ขนาดผลกว้าง 2.2 เซนติเมตร สูง 2.3 เซนติเมตร น้ำหนัก 5.0-8.0 กรัมต่อผล จำนวนผลสด 125-200 ผลต่อกิโลกรัม ผลผลิต 2,800 กิโลกรัมต่อไร่

มะเขือเทศพันธุ์เพชรชมพู มีลักษณะการเจริญเป็นแบบระหว่างทอดยอดและ ไม่ทอดยอด น้ำหนักผลเฉลี่ยประมาณ 41-60 กรัม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.1-5.0 เซนติเมตร ความยาวประมาณ 2.1-5.0 เซนติเมตร ผลแก่มีสีแดง รูปร่างเป็นแบบกลมสูง อายุเก็บเกี่ยวมากกว่า 70 วัน

2.1.2 องค์ประกอบทางเคมีของมะเขือเทศ

ในมะเขือเทศมีกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็นที่ร่างกายไม่สามารถผลิตได้และมะเขือเทศยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) เช่น เบต้าแคโรทีน อัลฟาแคโรทีน และไลโคปีน เป็นต้น ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) [4] โดยทั่วไปปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีของมะเขือเทศจะแตกต่างกันตามพันธุ์ พื้นที่เพาะปลูก สภาพภูมิอากาศ การดูแลรักษา และแร่ธาตุในดิน

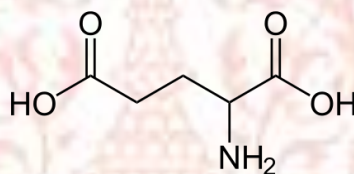
2.1.2.1 กรดอะมิโน

ผลของมะเขือเทศสุกจะเปลี่ยนเป็นสีแดง และมีปริมาณกรดอะมิโนที่เพิ่มขึ้นทำให้มะเขือเทศสุกมีความหวานมากขึ้น ซึ่งกรดอะมิโนกลูตาเมตและแอสพาร์เตตมีหน้าที่รับผิดชอบต่อรสชาติของมะเขือเทศและอัตราส่วนของพวกมันมีความสำคัญ เมื่อมีกรดอะมิโนกลูตาเมตและแอสพาร์เตตในอัตราส่วน 4:1 มะเขือเทศจะมีรสชาติเหมือนมะเขือเทศมากที่สุด กล่าวโดยสรุปมะเขือเทศที่รับประทานจะมีรสหวานกว่าและมีกรดอะมิโนสูงกว่าจึงมีรสชาติที่อร่อยยิ่งขึ้น [26] ซึ่งกรดกลูตามิกมีรายงานว่าป็นกรดอะมิโนให้รสอูมามิ (umami taste) เหมือนกับสารโมโนโซเดียมกลูตาเมต (monosodium glutamate-like) [27] และยังเป็นสารตั้งต้นที่ร่างกายนำไปผลิตเป็นสาร GABA (gamma-

aminobutyric acid) ที่เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้ง (inhibitory neurotransmitter) อีกด้วย

2.1.2.2 กรดกลูตามิก

กรดกลูตามิก (ภาพที่ 2-1) จัดอยู่ในกลุ่มกรดอะมิโนไม่จำเป็น แต่มีความสำคัญต่อร่างกาย โดยทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทที่ออกฤทธิ์แบบกระตุ้น มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเรียนรู้และจดจำของสมอง มีหน้าที่หลักคือ เป็นเชื้อเพลิงให้กับสมอง มีความสามารถในการจัดการกับแอมโมเนียส่วนเกินซึ่งจะยับยั้งการทำงานของชั้นสูงของสมอง อีกทั้งยังช่วยเปลี่ยนแอมโมเนียให้เป็นกลูตามีน เนื่องจากกลูตามีนทำให้ระดับของกรดกลูตามิกสูงขึ้นได้มาก หากร่างกายได้รับกลูตามีนจากอาหารได้น้อย จะส่งผลให้สมองขาดกรดกลูตามิกได้ ซึ่งในมะเขือเทศพบว่ามีปริมาณกรดกลูตามิกสูงที่สุดในอาหารประเภทผัก โดยมีปริมาณ 246 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม [26] (ตารางที่ 2-1)



ภาพที่ 2- 1 โครงสร้างโมเลกุลของกรดกลูตามิก

ที่มา : <https://www.chemblink.com/moreProducts/more6899-05-4.htm>

ตารางที่ 2- 1 ปริมาณกรดกลูตามิกสูงที่สุดในอาหารประเภทผัก

ผัก	ปริมาณกรดกลูตามิก (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)
กะหล่ำปลี	50
ผักโขม	48
มะเขือเทศ	246
หน่อไม้ฝรั่ง	49
ถั่วเขียว	106
เห็ด	42

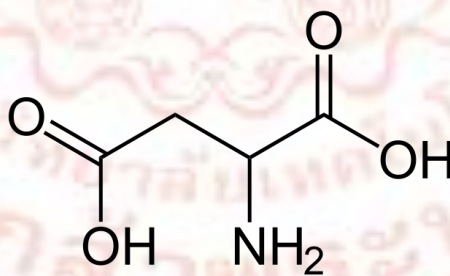
ที่มา : Ninomiya (1998)

นอกจากมะเขือเทศจะมีกรดกลูตามิกเป็นกรดอะมิโนที่พบมากที่สุด ในมะเขือเทศแล้ว ในมะเขือเทศยังมีกรดอะมิโนที่จำเป็นที่ร่างกายไม่สามารถผลิตได้อีกด้วย และมะเขือเทศยังมีสารออก

ฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) เช่น เบต้าแคโรทีน อัลฟาแคโรทีน และไลโคปีน เป็นต้น ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) [28]

2.1.2.3 กรดแอสพาร์ติก

กรดแอสพาร์ติก (ภาพที่ 2-2) เป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของกรดอะมิโนไม่จำเป็น ร่างกายสามารถสังเคราะห์ขึ้นมาเองได้ ถ้าร่างกายขาดกรดแอสพาร์ติกก็จะทำให้ร่างกายมีความต้านทานต่อความเหนื่อยล้าลดลง ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดอาการเหนื่อยล้าได้ง่ายขึ้น ไม่ว่าจะทำกิจกรรมหรือออกกำลังกายก็ตาม โดยแหล่งอาหารที่ผสมกรดอะมิโนชนิดนี้ได้แก่อาหารจำพวกที่อุดมไปด้วยโปรตีนต่าง ๆ เช่น เนื้อสัตว์ เนื้อไก่ เนื้อปลา และยังพบได้ในผลไม้เช่น เป็นต้น กรดแอสพาร์ติกมีส่วนสำคัญในการเพิ่มความทนทานต่อความอ่อนล้าของร่างกาย ถ้าหากนักกีฬาได้เกลือแอสพาร์ติก ก็จะช่วยเพิ่มความแข็งแรงและความแข็งแกร่งให้อึดมากยิ่งขึ้น ซึ่งประโยชน์ของกรดแอสพาร์ติกจะช่วยส่งเสริมกระบวนการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตให้เป็นพลังงานภายในเซลล์ ช่วยเป็นส่วนสำคัญของแอสพาร์แตม (aspartame) ซึ่งเป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาล ซึ่งให้แคลอรีต่ำ ช่วยในการขับแอมโมเนียที่เป็นสารอันตรายออกจากร่างกายเพราะการที่แอมโมเนียเข้าสู่เส้นเลือดนั้น กลายเป็นสารที่มีพิษสูงมาก ช่วยปกป้องระบบประสาทส่วนกลาง มีบทบาทในการช่วยผลิตฮอร์โมน และการทำงานของระบบประสาท และกรดแอสพาร์ติกมีส่วนสำคัญในการสังเคราะห์แอนติบอดี ซึ่งมีหน้าที่ช่วยตรวจจับและช่วยทำลายฤทธิ์สิ่งแปลกปลอมในร่างกาย อย่างเช่นแบคทีเรียและเชื้อไวรัสต่าง ๆ



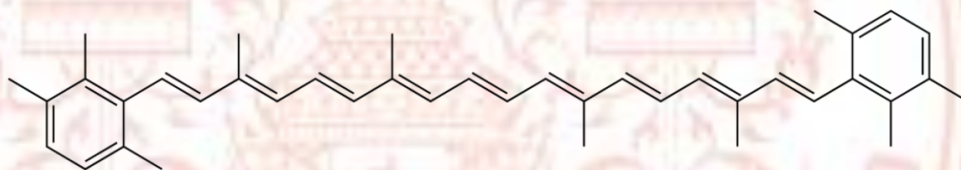
ภาพที่ 2- 2 โครงสร้างโมเลกุลของกรดแอสพาร์ติก

ที่มา : <https://th.depositphotos.com/13260280/stock-illustration-amino-acid-aspartic-acid-structural.html>

2.1.2.4 แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์ (ภาพที่ 2-3) เป็นอนุพันธ์ของไขมัน ไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ในตัวทำละลายไขมัน เช่น อะซิโตน (acetone) แอลกอฮอล์ (alcohol) ไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether) และ

คลอโรฟอร์ม (chloroform) เป็นต้น โดยแคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุในผักและผลไม้สีแดง ส้ม และเหลือง เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่ช่วยต้านโรคมะเร็งและโรคหัวใจ รงควัตถุของแคโรทีนอยด์ (carotenoid) นั้นมีมากกว่า 600 ชนิดในอาหาร แต่มีเพียง 6 ชนิดที่ร่างกายนำมาใช้ในกระแสเลือดหรือเนื้อเยื่อ แคโรทีนอยด์ที่รู้จักกันดีคือ เบตาแคโรทีน (beta-carotene) นอกจากนั้นได้แก่ อัลฟาแคโรทีน (alpha-carotene) คริปโตแซนทิน (cryptoxanthin) ไลโคปีน (lycopene) ลูเทอิน (lutein) และซีแซนทิน (zeaxanthin) โดยแคโรทีนอยด์พบได้ในผักผลไม้หลายชนิด อัลฟาแคโรทีนมีในแครอทและฟักทอง ไลโคปีนมีในผลไม้สีแดง เช่น ฝรั่ง แตงโม เกรปฟรุ้ตแดง และมีมากเป็นพิเศษในมะเขือเทศสุก ลูเทอินและซีแซนทินมีมากในผักสีเขียวเข้ม ฟักทอง และพริกแดง คริปโตแซนทินมีมากในมะม่วง ส้ม และพีช ซึ่งแคโรทีนอยด์นั้นช่วยป้องกันมะเร็งบางชนิดโดยยับยั้งการเติบโตผิดปกติของเซลล์ ไลโคปีนนั้นสามารถสกัดการเติบโตของมะเร็งต่อมลูกหมาก ซึ่งมีงานวิจัยพบว่าผู้ชายที่กินอาหารที่มีมะเขือเทศเป็นหลักสัปดาห์ละ 10 ส่วนหรือมากกว่า จะลดความเสี่ยงต่อมะเร็งต่อมลูกหมากลงร้อยละ 45 และการเสริมแคโรทีนอยด์ร่วมกับ วิตามินอี จะเสริมฤทธิ์กันในการปกป้องเซลล์ตับจากอนุมูลอิสระ และลดการเกิดมะเร็งตับในคนไข้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีได้ถึงร้อยละ 50



ภาพที่ 2- 3 โครงสร้างโมเลกุลของแคโรทีนอยด์

ที่มา : <https://en.wikipedia.org/wiki/Carotenoid>

2.1.2.5 ไลโคปีน

ไลโคปีนเป็นรงควัตถุสีแดงที่พบตามธรรมชาติเป็นหนึ่งในสารประกอบของกลุ่มแคโรทีนอยด์ (พบในปัจจุบันประมาณ 600 กรัม) ในส่วนคุณสมบัติของไลโคปีนเป็นสารที่ไม่ชอบน้ำ (lipophilic) จึงไม่สามารถละลายน้ำหรือละลายได้น้อย แต่สามารถละลายได้ดีในน้ำมัน ซึ่งมีความสามารถในการละลายประมาณ 0.2 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้องนอกจากนี้ไลโคปีนยังสามารถละลายได้ดีใน ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์ เอทิลเอเทอร์ เอทิลอะซิเตต คลอโรฟอร์ม และ อะซิโตน ไลโคปีนจะพบได้ในผักผลไม้บางชนิดที่มีสีแดงส้ม อาทิเช่น มะเขือเทศ ฟักข้าว มะละกอ แตงโม พริกหยวก โกจิเบอร์รี่ เกรปฟรุ้ต และฝรั่งพันธุ์สีชมพู เป็นต้น ดังนั้นอย่างที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าแหล่งอาหารในธรรมชาติที่มีสารไลโคปีนมากที่สุดนั้นก็คือ มะเขือเทศ โดยจะพบไลโคปีนในปริมาณตั้งแต่ 0.88 – 4.20 กรัม ใน

2.1.2.6 วิตามิน

เป็นสารอินทรีย์ที่มีความจำเป็นต่อร่างกาย โดยเป็นตัวช่วยในการทำให้ระบบต่าง ๆ ภายในร่างกายเกิดความสมดุลขึ้น ตลอดจนเสริมสร้างการเจริญเติบโตของร่างกาย และเสริมสร้างสุขภาพที่ดีภายในร่างกายขึ้น ที่สำคัญคือร่างกายของเราไม่สามารถผลิตหรือสังเคราะห์วิตามินขึ้นได้เอง จึงจำเป็นต้องได้รับสารอาหารจากอาหารที่เรารับประทานเข้าไปในแต่ละมื้อ หรือการได้รับผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเข้าไปเพื่อทดแทนวิตามินที่ร่างกายเราขาดไป โดยวิตามินมีมากมายหลากหลายประเภท แต่โดยหลัก ๆ แล้ววิตามินจะแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ วิตามินที่ละลายในน้ำ เช่น วิตามินซี และวิตามินบีทุกชนิด วิตามินที่ไม่ละลายในน้ำแต่ละลายในไขมัน เช่น วิตามินเอ วิตามินดี วิตามินอี และวิตามินเค เป็นต้น ซึ่งในมะเขือเทศอุดมไปด้วยวิตามินหลายชนิดที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น วิตามินซี วิตามินเอ วิตามินเค วิตามินบี 1 วิตามินบี 3 และวิตามินบี 6 เป็นต้น (ตารางที่ 2-3) โดยมะเขือเทศขนาดปานกลางนั้นจะมีปริมาณของวิตามินซีครึ่งหนึ่งของส้มโอทั้งลูก และมะเขือเทศหนึ่งผลมีปริมาณวิตามินเอที่ร่างกายต้องการจำนวน 1 ใน 3 ของวิตามินเอที่ร่างกายต้องการต่อวัน

ตารางที่ 2- 3 คุณค่าทางโภชนาการของมะเขือเทศสีแดงสด ต่อ 100 กรัม

วิตามิน	ปริมาณ
วิตามินเอ	42 ไมโครกรัม
วิตามินบี 1	0.037 มิลลิกรัม
วิตามินบี 3	0.594 มิลลิกรัม
วิตามินบี 6	0.08 มิลลิกรัม
วิตามินซี	14 มิลลิกรัม
วิตามินอี	0.54 มิลลิกรัม
วิตามินเค	7.9 ไมโครกรัม

ที่มา : USDA Nutrient database

2.1.2.7 สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

สารประกอบฟีนอลิก เป็นสารที่พบในพืชหลายชนิด เช่น กะหล่ำปลี แครอท หัวหอมใหญ่ มะเขือเทศ เป็นต้น (ตารางที่ 2-4) สารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

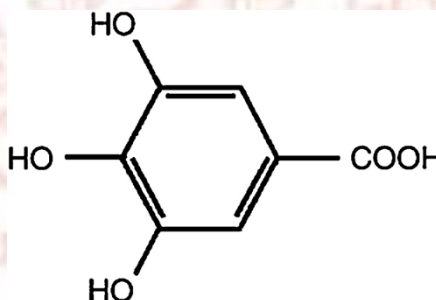
(antioxidant) สามารถละลายในน้ำได้ดีและช่วยป้องกันโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจขาดเลือดและมะเร็ง โดยสารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ (free radical) และ ไอออนของโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่น ๆ

ตารางที่ 2- 4 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของผักชนิดต่าง ๆ

ชนิดตัวอย่าง	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ทั้งหมด ($\mu\text{g GAE/g sample}$)	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ ทั้งหมด ($\mu\text{g CE/g sample}$)
กะหล่ำปลี	340.78	11.40
มะเขือเทศ	242.58	17.80
แครอท	158.68	14.55
หัวหอมใหญ่	650.50	10.08

ที่มา : จิตภา (2022)

โดยในมะเขือเทศมักจะพบกรดแกลลิก กรดคลอโรจีนิก มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ [22] กรดคาเฟอิก ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอักเสบ และกรดเฟอรูลิก นอกจากนี้ในมะเขือเทศยังมีสารประเภทฟลาโวนอยด์ เช่น เควอซิทิน รูติน [23] แคมเฟอรอล และนารินจีนินซึ่งมีหน้าที่ในการต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบ [30]



ภาพที่ 2- 5 โครงสร้างโมเลกุลของกรดแกลลิก

ที่มา : https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-gallic-acid-3-4-5-trihydroxybenzoic-acid_fig2_295678543

2.2 เทคนิคการสกัด

ในการสกัดกรดอะมิโนและสารสำคัญจากพืช มี 2 วิธี คือ 1) วิธีทางเคมี โดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย เช่น แอลกอฮอล์ กรดและด่าง เป็นต้น แต่วิธีทางเคมีนั้นก่อให้เกิดการปนเปื้อนจากสารเคมีและทำให้โปรตีนบางชนิดสูญเสียความสามารถเชิงหน้าที่ (functional properties) อีกวิธีที่นิยมคือ 2) วิธีการทางกายภาพ โดยใช้เอนไซม์ข้อดีของการใช้เอนไซม์ คือ เป็นสภาวะการย่อยที่ไม่รุนแรง (mild process condition) ย่อยต่อการกำหนดและควบคุมปฏิกิริยาได้ และลดการใช้สารเคมี นอกจากนี้วิธีการทางกายภาพอีกวิธีหนึ่ง ซึ่งเป็นเทคโนโลยีใหม่ ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมและมีประสิทธิภาพในการสกัดสารทางชีวภาพสูง ได้แก่ เทคนิคการสกัดโดยคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasound assisted extraction) หรือ UAE ซึ่งมีความสามารถสกัดทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ออกมาจากตัวอย่างที่เป็นของแข็งได้ทั้งหมด สามารถลดเวลา ลดการใช้พลังงานและการใช้ตัวทำละลายในการสกัด พลังงานจากการอัลตราซาวด์สำหรับการสกัดนอกจากช่วยให้การผสมมีประสิทธิภาพมากขึ้น ยังทำให้การถ่ายเทพลังงานได้เร็วขึ้น ลดระดับอุณหภูมิและเวลาการสกัด และมีการตอบสนองต่อการควบคุมการสกัดด้วยกระบวนการได้เร็วขึ้น

2.2.1 การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ทำได้โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสตัดพันธะเพปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนอิสระ และเพปไทด์ที่สั้นลงการย่อยสลายโปรตีนด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือ เอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นสูง จึงไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณมาก และสามารถย่อยสลายโปรตีนได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรง นอกจากนี้การใช้เอนไซม์มีอัตราการย่อยสลายโปรตีนค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กรดหรือด่าง แต่การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสอาจทำให้เกิดสารประกอบที่มีรสขมได้เนื่องจากการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่มีหมู่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic group) ในโมเลกุลของโปรตีนเช่น Isoleucine, Phenylalanine, Tryptophan, Tyrosine และ Valine แต่เมื่อมีการควบคุมระดับการย่อยสลายโปรตีนแล้วสารประกอบที่ให้รสขมนี้เกิดน้อยลง เพราะสายเพปไทด์ที่เกิดขึ้น มีลำดับกรดอะมิโนในสายที่ไม่ก่อให้เกิดรสขม จึงสามารถควบคุมกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ได้ด้วยการควบคุมระดับการย่อยสลายโปรตีน (Degree of hydrolysis) [31]

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ประเภทไฮโดรเลส (Hydrolase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะเพปไทด์ของโปรตีน โดยจะตัดพันธะเพปไทด์ของพอลิเพปไทด์ได้เป็นเพปไทด์และกรดอะมิโนอิสระ นอกจากนี้เอนไซม์โปรติเอสสามารถแบ่งเป็นประเภทต่าง ๆ ได้หลายแบบ เช่น แบ่งตามลักษณะการตัดสายยาวของพอลิเพปไทด์ ได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1) เอกซ์โซโปรติเอส (Exoprotease) หรือ เอกซ์โซเปปติเดส (Exopeptidase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเพปไทด์ด้านปลายโซ่ของโมเลกุลถ้าเป็นการตัดพันธะทางปลายด้านกลุ่มอะมิโน เรียกว่า aminopeptidase ขณะที่การตัดพันธะทางปลายด้านกลุ่มคาร์บอกซิล เรียกว่า carboxypeptidase

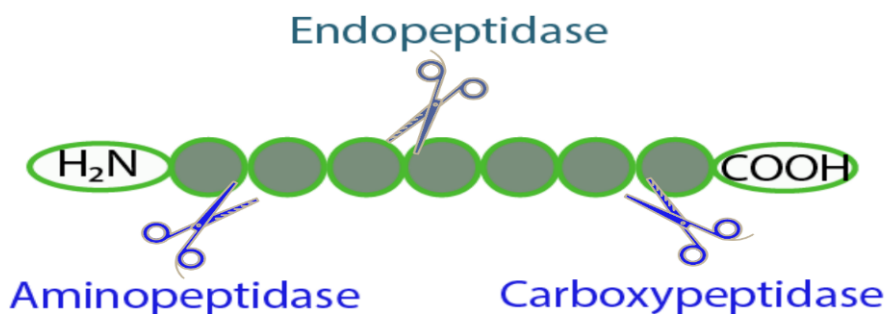
2) เอ็นโดโปรติเอส (Endoprotease) หรือ เอ็นโดเปปติเดส (Endopeptidase) (ภาพที่ 2-5) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเพปไทด์อย่างอิสระภายในโซ่โมเลกุลของโปรตีนได้เป็นเพปไทด์สายสั้น ๆ เอ็นโดเปปติเดสมีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนสูง เนื่องจากมีความจำเพาะต่อสับสเตรตที่เป็นเพปไทด์โมเลกุลใหญ่หลายชนิด ทำให้สามารถย่อยโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว สามารถแบ่งชนิดตามกลไกการทำงานได้เป็น 4 ประเภท ดังนี้

1) Serine protease เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็น Alkali protease มี pH ที่เหมาะสมในช่วง pH 7.0 – 11.0 เป็นพวกเอนโดเปปติเดสมีอนุมูลซีรีล (Seryl residue) และหมู่อิมิดาโซล (Imidazole) อยู่ทีบริเวณเร่งถูกยับยั้งโดย DEP (Di-isopropyl-phosphofluoride) ซึ่งทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของอนุมูลซีรีลในบริเวณเร่งของเอนไซม์ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ Elastase, Thrombin, และ Trypsin เป็นต้น

2) Sulfhydryl protease หรือ cysteine protease เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็น neutral protease มี pH ที่เหมาะสมในช่วง 6.0 -7.5 เป็นพวกเอนโดเปปติเดสมีอนุมูลซัลไฟดริลอยู่ทีบริเวณเร่งถูกยับยั้งโดยสารที่เรียกว่า sulfhydryl reagents ซึ่งจะทำให้อนุมูลซัลไฟดริลทีบริเวณเร่งได้รับความกระทบกระเทือนและอาจสูญเสียแอกติวิตีไปในที่สุด เอนไซม์กลุ่มนี้จะเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์บางชนิดตัวอย่างเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ bromelain และ papain เป็นต้น

3) Metal-containing protease เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็น neutral protease มี pH ที่เหมาะสมคือ pH 7.8 เป็นพวกเอ็กโซเปปติเดส เอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็นโปรติเอสที่มีอออนและโลหะรวมอยู่ในโมเลกุลเอนไซม์หรือรวมในปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน โดยจะอยู่ในลักษณะโคแฟกเตอร์ ถูกยับยั้งด้วยสารจับอออนของโลหะ (Metal chelating agent) เช่น 1,10-phenanthroline และ EDTA เป็นต้น ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ Carboxypeptidase A, Carboxypeptidase B, Carnosinase และ Prolidase เป็นต้น

4) Aspartic protease เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็น carboxyl protease และ Acid protease มี pH ที่เหมาะสมในช่วง 2-4 มีหมู่คาร์บอกซิลจากอนุมูลกรดแอสปาดิก 2 อนุมูลอยู่ในบริเวณเร่งถูกยับยั้งโดย Pepstatin เอนไซม์ส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ตัวอย่างเอนไซม์กลุ่มนี้เช่น Pepsin และ Rennin เป็นต้น



ภาพที่ 2- 6 การตัดสายโปรตีนโดยใช้เอนไซม์

ที่มา : <https://www.goldbio.com/articles/>

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

1. อุณหภูมิ เอนไซม์จะทำงานได้ดีจะต้องอยู่ในอุณหภูมิที่เหมาะสม
2. pH เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา หาก pH ไม่เหมาะสมจะทำให้เอนไซม์ทำหน้าที่ไม่เต็มที่
3. ความเข้มข้นของเอนไซม์ หากเพิ่มความเข้มข้นจะช่วยเร่งปฏิกิริยาให้เกิดเร็วขึ้น แต่ถ้ามากเกินไปอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะมีค่าคงที่
4. ปริมาณสารตั้งต้น มีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ เมื่อเพิ่มสับสเตรต อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้น แต่เมื่อยิ่งเพิ่มปริมาณของสับสเตรตมากเกินไป อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะไม่เกิดเร็วขึ้น เมื่อระดับหนึ่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะคงที่เนื่องจากไม่ได้เพิ่มปริมาณของเอนไซม์

ดังนั้นการใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ในการสกัดสารสกัดจากพืชมากมาย เนื่องจากการสกัดสารด้วยวิธีทางชีวภาพด้วยการใช้เอนไซม์ จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรต มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค มีต้นทุนต่ำกว่าการใช้สารเคมี และไม่มีตัวทำละลายเหลือตกค้างอยู่ในสารที่สกัด จากการศึกษาการสกัดไลโคปีน จากผงมะเขือเทศ TPI โดยใช้เอนไซม์ทางการค้า 2 ชนิด (Enz A และ Enz B ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์เพคติเนส, เซลลูเลส และเฮมิเซลลูเลส) โดยศึกษาระยะเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ 5 ระดับ (30, 40, 50, 60 และ 90 นาที) และการสกัดร่วมกับสารทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด (เอทิลอะซีเตต เอทานอล และไดเอทิลอีเทอร์) พบว่าการใช้เอนไซม์ Enz A ที่ระยะเวลาการย่อย 50 นาที ร่วมกับเอทิลอะซีเตต ได้ปริมาณผลผลิตไลโคปีนสูงที่สุด โดยการสกัดไลโคปีนจากผงมะเขือเทศ TPI ได้ ไลโคปีน 50.3 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม [32]

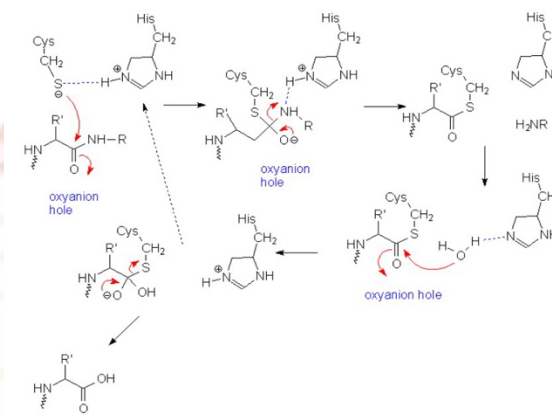
เมื่อนำเนื้อมะเขือเทศไปย่อยด้วยเอนไซม์ เพคติเนสและเซลลูเลสที่ระดับแตกต่างกันคือความเข้มข้น ร้อยละ 0.1 0.2 หรือ 0.3 นาน 1 2 หรือ 3 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิ 50°C หลังจากครบเวลาที่กำหนด หยุดการทำงานของเอนไซม์ด้วยการต้มในอ่างน้ำร้อนที่ อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที ทำให้เย็นทันทีตรวจสอบปริมาณผลผลิตที่ได้ทั้งหมด ค่าสีปริมาณ ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และ ปริมาณไลโคปีน พบว่าเนื้อมะเขือเทศที่ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส มีค่าสี a^* และ b^* และปริมาณไลโคปีนสูงกว่าเนื้อมะเขือเทศ ย่อยด้วยเอนไซม์เพคติเนสทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เพคติเนสมีสมบัติในการย่อยสลายสารเพคตินที่หุ้มเซลล์เนื้อมะเขือเทศออก ส่วนเอนไซม์เซลลูเลสมีสมบัติในการย่อยสลายเซลล์เนื้อมะเขือเทศทำให้ไลโคปีนที่แทรกอยู่ในเซลล์ เคลื่อนที่ออกมาได้มากกว่า [29]

2.2.1.1 โบรมิเลน

โบรมิเลน เป็นเอนไซม์ในกลุ่มของซิสทีอินซึ่งเป็น endopeptidases เช่นเดียวกับปาเปน ทำงานได้ดีในช่วง pH เท่ากับ 6.0-7.5 มี optimum pH activity ที่ 6-7.5 ถูกยับยั้งด้วย sulfhydryl reagents หรืออีกนัยหนึ่งมี -SH ในบริเวณเร่งปฏิกิริยา เป็น endopeptidase โบรมิเลน เป็นเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลซ์สับสเตรทได้กว้าง (broad specificity) แต่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีขึ้นเมื่อกรดอะมิโนเรียงตัวกันด้วย Z-Arg-Arg-|-NHMe (7-amino-4-methylcoumarin) และมีจุดไอโซอิเล็กตริกที่พีเอช เท่ากับ 9.55 ผลิตได้จากแกนของสับปะรด (pineapple stem) เริ่มรู้จักโบรมิเลนในปี ค.ศ. 1876 และเริ่มมีการนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ในปี ค.ศ. 1957 หลังจาก Heinicke (1957) ได้ค้นพบว่าเอนไซม์โบรมิเลนผลิตได้จำนวนมากจากแกนของสับปะรด และสามารถผลิตออกมาในระดับอุตสาหกรรมได้ โบรมิเลนมีประโยชน์หลายประการในทางการแพทย์ เช่น การป้องกันไม่ให้เกล็ดเลือดจับตัวในหลอดเลือด ซึ่งทำให้ไม่เกิดหัวใจขาดเลือด ป้องกันการอักเสบต่อต้านการเกิดมะเร็ง ช่วยให้อาหารอื่น ๆ ที่ใช้ร่วมด้วยสามารถดูดซึมได้ดี ละลายมูกต่าง ๆ ไม่ให้จับตัวข้นขึ้น แรงให้แผลหายเร็ว และช่วยให้ระบบไหลเวียนโลหิตดีขึ้น

โบรมิเลนมีกลุ่มไฮดรอกซิล (-SH) ของซิสทีอิน (cysteine residue) และอิมิดาโซล (imidazole) หรือหมู่คาร์บอกซิลของฮิสทีดิน (histidine residue) อยู่ที่ยบริเวณ active site (ภาพที่ 2-6) ซึ่งหมู่คาร์บอกซิลทำหน้าที่เป็น general acid ส่วนหมู่อิมิดาโซลทำหน้าที่เป็น general base กลไกการทำปฏิกิริยาอธิบายได้คือ หมู่อิมิดาโซลดึง H^+ ของหมู่ -SH- มีผลให้ S ในหมู่ -SH เข้าทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอนิล (-CO-) ในซับสเตรทได้ง่ายและรวดเร็วเกิดเป็น ES complex จากนั้นหมู่ -SH ทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ เกิดการหลุดของ acyl (R) เกิดเป็น acyl-enzyme ในรูปของ thiol ester (ES-CO-R) ขั้นตอนนี้เรียกว่า acylation จากนั้น ES-CO-R เข้าสู่ deacylation โดยหมู่อิมิดาโซลซึ่งทำหน้าที่เป็นเบส แยก H^+ ออกจากน้ำทำให้ OH^- ของน้ำเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอนิลใน acyl-enzyme มีผลให้เกิดการ

หลุดของหมู่ acyl คือ HO-OC-R และเอนไซม์ (E.SH) กลับคืนสู่สภาวะปกติ ซึ่งจุดตัดพันธะเพปไทด์ของโบรมิเลน คือบริเวณ ไลซีน อะลานีน ไทโรซีน และไกลซีน [33] การที่โบรมิเลนมีความสามารถในการตัดจำเพาะที่กว้าง จึงมีการนำโบรมิเลนมาใช้ในการย่อยสลายโปรตีนเพื่อประโยชน์ในเชิงหน้าที่



ภาพที่ 2- 7 กลไกการทำงานของโบรมิเลน

ที่มา : Hale และคณะ (2005)

มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากแมงกะพรุนสายพันธุ์ ลอดช่อง (*Lobonema smithii*) โดยการไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลนและศึกษาคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ โดยแปรปริมาณโบรมิเลน (ร้อยละ 5, 10 และ 15 ของน้ำหนักตัวอย่าง) และระยะเวลาในการย่อย (3, 6, 12 และ 18 ชั่วโมง) พบว่า เมื่อปริมาณของโบรมิเลนและระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้นมีผลทำให้ระดับการย่อยสลายของโปรตีนสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 0-3 ชั่วโมง จากนั้นระดับการย่อยสลายจะย่อยสลายเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ และจะเริ่มคงที่ ซึ่งที่ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาการย่อย 18 ชั่วโมง มีค่าระดับการย่อยสลายสูงสุดเท่ากับร้อยละ 59.66 เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเซตพบว่า มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระสูงสุดเท่ากับ 287.20 มิลลิกรัม ต่อกรัมตัวอย่าง กรดอะมิโนที่มีปริมาณสูงสุด ได้แก่ ไกลซีน กรดกลูตามิก และกรดแอสพาร์ติก มีปริมาณ เท่ากับ 46.90, 35.80 และ 33.80 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง [34]

มีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเห็ดด้วยโบรมิเลนเพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส จากเห็ด 3 ชนิด คือ เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม และเห็ดหอม พบว่า eb-MPHs ทุกชนิด ที่การใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 20, 15, 10 และ 5 ที่เวลาการย่อย 24 ชั่วโมง มีค่าระดับการย่อยสูงสุด เท่ากับ 80.4, 85.3 และ 79.5 ตามลำดับ กรดอะมิโน 17 ชนิด โดยพบกรดกลูตามิกมากที่สุดเท่ากับ 2048.2, 932.5 และ 514.5 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ [35]

2.2.2 การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic assisted extraction, UAE)

คลื่นเหนือเสียง คือ คลื่นเสียงที่มีความถี่อยู่ในช่วง 16 kHz ถึง 1 GHz มนุษย์ไม่สามารถได้ยินได้ การสั่นด้วยเทคนิคอัลตราโซนิกสามารถทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์ถูกปลดปล่อยออกมาจากตัวอย่างได้คลื่นเหนือเสียงที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์จะมี 2 ช่วงความถี่ คือ

- 1) ช่วงความถี่สูง (1 – 10 MHz) นำมาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยและการรักษาทางการแพทย์ เช่น การตรวจอัลตราซาวด์ทารกในครรภ์มารดา
- 2) ช่วงความถี่ต่ำ (20 – 100 kHz) นำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ เช่น อุปกรณ์ทำความสะอาด กระบวนการแตกเซลล์ การเร่งปฏิกิริยา เป็นต้น

การสกัดสารด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic assisted extraction, UAE) เป็นวิธีที่ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงหรืออัลตราโซนิก (ultrasonic) (ภาพที่ 2-7) ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์หรือน้ำในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากวัตถุดิบ เครื่องมือดังกล่าวจะปล่อยคลื่นเสียงความถี่สูงออกมาในตัวพาซึ่งในที่นี้คือน้ำหรือตัวทำละลายอินทรีย์กระบวนการดังกล่าวจะทำให้เกิดฟองก๊าซซึ่งเกิดการหดตัวและขยายตัวเป็นวัฏจักร เมื่อฟองก๊าซขยายตัวจะดึงสารที่อยู่ภายในวัสดุออกมาละลายในตัวทำละลาย และในขณะที่ฟองก๊าซแตกออกจะเกิดความดันและความร้อนอย่างมากในบริเวณนั้นซึ่งจะมีผลทำให้เนื้อเยื่อของวัสดุฉีกขาด ด้วยอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการสกัดละลายในตัวทำละลายได้ดีขึ้น [36] และปรากฏการณ์ดังกล่าวเรียกว่า คาวิเทชัน (Cavitation)



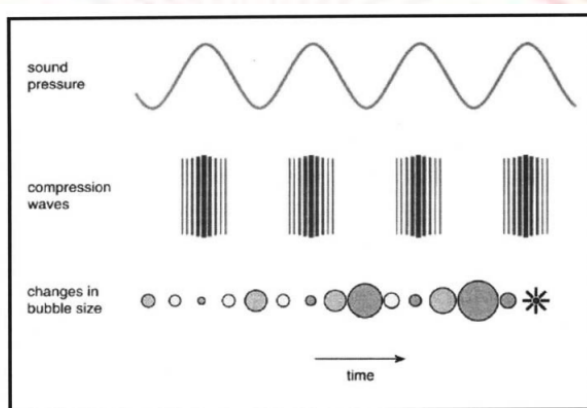
ภาพที่ 2- 8 เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic processor)

ที่มา : <https://www.dksh.com/th-th/products/ins/elma-ultrasonic-cleaners-elmasonic-s>

2.2.2.1 คาวิเทชัน (Cavitation)

ปรากฏการณ์คาวิเทชัน หมายถึง กระบวนการที่เกิดขึ้นในตัวกลาง เมื่อสารละลายที่ได้รับคลื่นเสียงความถี่สูง (คลื่นอัลตราโซนิก หรือเรียกว่า คลื่นเสียงความถี่สูง) ทำให้เกิดฟองอากาศใน

ตัวกลาง ทำให้เกิดแรงกลและส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมีและทางกายภาพได้ โดยสามารถอธิบายได้ว่าเมื่อโครงสร้างของของเหลวที่ได้รับพลังงานจากคลื่นอัลตราโซนิก จะเกิดการถูกบีบอัด (compress) และคลายตัว (stretch) ซ้ำไปมาเป็นจำนวนหลายพันรอบ ทำให้เกิดฟองอากาศขึ้น และฟองอากาศที่เกิดขึ้นภายในของเหลวนี้นี้ รับแรงสั่นที่เกิดจากคลื่นอัลตราโซนิกเป็นระยะ ๆ ทำให้เกิดการอืดขยาย ๆ เป็นผลให้ฟองอากาศมีขนาดใหญ่ขึ้น และเกิดการแตกของฟองอากาศ จนทำให้เซลล์แตก (ภาพที่ 2-8) ส่งผลให้สารต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์สามารถออกมาได้ [37]



ภาพที่ 2- 9 การเกิดฟองอากาศในตัวกลางเนื่องจากคลื่นอัลตราโซนิก

ที่มา : Suslick (1994)

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเกิดควิเทชัน

1) แก๊สและอนุภาคของแข็งอยู่ในตัวกลางของเหลว การที่มีแก๊สหรืออนุภาคของแข็งอยู่ในตัวกลางของเหลวจะทำให้ค่าแรงตึงผิวของของเหลวลดลง ทำให้ความรุนแรงเนื่องจากการยุบตัวของควิเทชันที่เกิดขึ้นมีค่าลดลง เนื่องจากแก๊สจะทำหน้าที่รับแรงกระแทกของการเปลี่ยนแปลงแรงดันอย่างรวดเร็ว และเนื่องจากแก๊สไม่สามารถแพร่ออกจากควิเทชันได้ในช่วงเวลายุบตัวอันสั้น การยุบตัวจึงไม่สามารถเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ รวมทั้งยังทำให้อุณหภูมิและความดันสูงสุดที่เกิดขึ้นจากการยุบตัวของควิเทชันมีค่าลดลง

2) ความดันภายในของเหลว การเพิ่มความดันภายในของเหลวส่งผลทำให้ฟองอากาศบางส่วนยุบตัวลงจนละลายเข้าไปในของเหลว จำนวนฟองอากาศจึงมีน้อยลง นอกจากนี้ยังทำให้ฟองอากาศที่ติดอยู่ที่ผิวของแข็งมีขนาดเล็กลง และมีลักษณะโค้งเว้าเข้าข้างใน ทำให้ต้องใช้ความดันของคลื่นสูงมากขึ้นเพื่อที่จะเอาชนะแรงตึงผิวของของเหลวและให้ฟองอากาศเหล่านี้หลุดออกมาเป็นควิเทชันต่อไปได้ อย่างไรก็ตาม การเพิ่มความดันภายในของเหลวจะทำให้ความรุนแรงเนื่องจากการยุบตัวของควิเทชันมีมากขึ้น

3) ความหนืดของของเหลว ของเหลวที่มีค่าความหนืดสูงจะทำให้เกิดควิเทชันได้ยากกว่าของเหลวที่มีค่าความหนืดต่ำกว่า เนื่องจากในกระบวนการเกิดควิเทชัน ค่าความดันของเสียงในช่วงขยายจะต้องเอาชนะแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของของเหลว ค่าแรงดึงดูดนี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อของเหลวมีความหนืดมากขึ้น

4) ความถี่ของคลื่นเสียง การเพิ่มความถี่ของคลื่นเสียง ซึ่งหมายถึงการลดช่วงเวลาของความดันขยายจะทำให้การเกิดควิเทชันยากขึ้น ดังนั้นค่าแอมพลิจูดของคลื่นเสียงที่ต้องใช้เพื่อให้เกิดฟองที่มีความถี่สูง จะต้องมีความถี่สูงขึ้น นอกจากนี้ความแรงของการยุบตัวของควิเทชันที่เกิดขึ้นที่ความถี่สูง เวลาของแต่ละรอบคลื่นจะมีความถี่ลดลง ดังนั้นอาจไม่เพียงพอให้ควิเทชันยุบตัวได้อย่างสมบูรณ์

5) อุณหภูมิ โดยทั่วไปการเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้ความหนืดของของเหลวมีค่าลดลง และค่าความดันไอจะเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดควิเทชันได้ง่ายขึ้น

6) ความเข้มของคลื่นเสียงความถี่สูง การเพิ่มความเข้มของคลื่นเสียงความถี่สูง จะทำให้ความดันและอุณหภูมิสูงขึ้น อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มของคลื่นเสียงความถี่สูงมีขีดจำกัดเนื่องจากขนาดของฟองอากาศที่ใหญ่ขึ้นอยู่กับแอมพลิจูดของคลื่นเสียงด้วย ถ้าขนาดของแอมพลิจูดสูงมากเกินไปอาจทำให้ขนาดของควิเทชันมีขนาดใหญ่มาก ทำให้ต้องการเวลาในการยุบตัวสูงขึ้น จึงอาจทำให้ควิเทชันไม่สามารถยุบตัวได้อย่างสมบูรณ์ในช่วงเวลาความดันขยายของคลื่น 1 รอบ ดังนั้นจึงทำให้ความแรงจากการยุบตัวของควิเทชันน้อยลง

จากการศึกษาพบว่าการสกัดคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic assisted extraction, UAE) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดแคโรทีนอยด์จากแมนดาริน อีพิการ์ เพื่อใช้เป็นสารสีธรรมชาติในเบเกอรี่ พบสภาวะที่เหมาะสม คือ สภาวะการสกัดที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 60 นาที โดยมีอัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว 0.0004 กรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสามารถสกัดแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 140.70 ± 2.66 มิลลิกรัม β -carotene ต่อตัวอย่างแห้ง 100 กรัม และสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่ได้ เป็นสารสีธรรมชาติที่มีศักยภาพ สามารถลดการใช้สารทาร์ทราซีนในเค้กและขนมปังได้ ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลผลิตพลอยได้จากผลไม้กำลังเป็นความต้องการทั่วโลกเพื่อผลิตสารปรุงแต่งจากธรรมชาติเพื่อลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม [38]

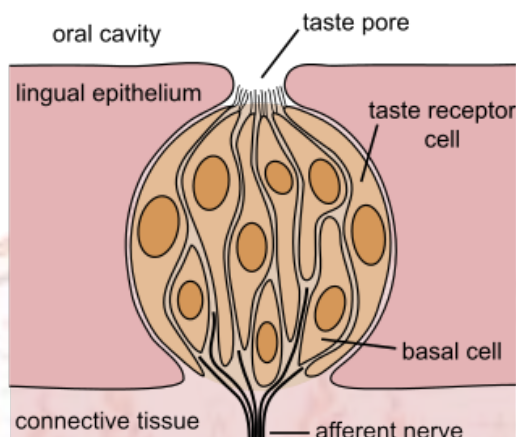
การเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดแบบธรรมดาเปรียบเทียบกับ การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic assisted extraction, UAE) สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากเปลือกอาราคาแดง พบว่า การสกัดด้วย UAE ที่ 40 กิโลเฮิร์ตซ์ 154 วัตต์ และ 90 นาที มีระดับแอนโธไซยานินเพิ่มขึ้นร้อยละ 12 และเวลาการสกัดลดลงร้อยละ 25 เมื่อเทียบกับการสกัดแบบธรรมดาในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกพบฟลาโวนอยด์และแคโรทีนอยด์ เมื่อสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic assisted extraction, UAE) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาราคาแดงอุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์นอกเหนือจากการเป็นเม็ดสีธรรมชาติที่ใช้ในอาหาร [39]

ศึกษาการสกัด betalains จากเปลือก quinoa ด้วยการวิธีการสกัดคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic assisted extraction, UAE) พบว่าเปลือก quinoa ที่มี Betacyanins ถูกสกัดอย่างเหมาะสมที่แอมพลิจูด 0.7 ที่ 0.6 รอบ และเวลาการสกัด 9.2 วินาที ได้ betalains 96.477 มิลลิกรัมต่อเปลือก quinoa 100 กรัม และ เปลือก quinoa ที่มี betaxanthins ถูกสกัดอย่างเหมาะสมที่แอมพลิจูด 0.9 ที่ 0.7 รอบ และเวลาการสกัด 40 วินาที ได้ betalains 201.01 มิลลิกรัมต่อเปลือก quinoa 100 กรัม เนื่องจากเปลือก quinoa เป็นแหล่ง betalains ที่ดีจึงนิยมผลิตเป็นส่วนผสมสำหรับอุตสาหกรรมอาหารและยา [40]

การศึกษาและพัฒนาการสกัดด้วย UAE ให้เหมาะสมกับการสกัดสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบ *Croton heliotropiifolius* โดยสารสกัดที่ได้ประกอบด้วย คาเทชิน กรดแกลลิก เควอซิติน กรตวานิลลิก กรดเอลลาจิก กรดทรานส์ซินนามิก กรดพาราคูมาริก กรดชิริงิก กรดเฟอรูลิกและกรดคลอโรเจนิก มีการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการปรับเปอร์เซ็นต์ของปริมาตรตัวทำละลาย อุณหภูมิ และเวลาในการสกัด โดยพบสภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้ตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 37.5 โดยปริมาตร ปริมาตร 11.4 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 54.8°C เป็นเวลา 39.5 นาที ในอ่าง Ultrasonic ซึ่งการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธีคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic assisted extraction, UAE) นี้เป็นวิธีที่ง่ายต่อการปฏิบัติและเป็นไปตามหลักการของเทคโนโลยีเคมีสีเขียว (Green chemical technology) [41]

2.3 กลไกการทำงานของกรดกลูตามิกด้านการเสริมรสชาติ

รสชาติ ถือเป็นประสาทสัมผัสหนึ่งในห้า เกิดจากความรู้สึที่ได้จากหน่วยรับรส เมื่อสารเคมีในปากก่อปฏิกิริยาเคมีกับเซลล์รับรสที่อยู่บริเวณลิ้น และการกระตุ้นที่ประสาทไทรเจมินัล ซึ่งทำให้รู้เนื้ออาหาร ความเจ็บปวด และอุณหภูมิ ซึ่งจะเป็นตัวกำหนดความอร่อย [42] อีกทั้งรสชาติยังทำให้มนุษย์สามารถแยกแยะอาหารที่ปลอดภัยและเป็นอันตราย และประเมินคุณค่าทางโภชนาการได้ โดยเอนไซม์ย่อยอาหารในน้ำลายจะเริ่มย่อยอาหารให้เป็นสารเคมีพื้นฐาน ทำให้ตุ่มรับรสที่ลิ้นตรวจจับรสชาติได้ และที่บริเวณลิ้นจะเต็มไปด้วยปุ่มลิ้นเล็ก ๆ เป็นพุ่ม ๆ ซึ่งมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า แต่ละปุ่มจะมีตุ่มรับรส (taste bud) (ภาพที่ 2-9) เป็นร้อย ๆ ที่ด้านหน้าและด้านหลังของลิ้น และยังอยู่ที่เพดาน ข้าง ๆ และหลังปาก และในลำคออีกด้วย ตุ่มรับรสแต่ละตุ่มจะมีเซลล์รับรส 40-60 เซลล์ และหน่วยรับรสที่เป็นจุดเริ่มการรู้รสชาติก็จะอยู่ที่เยื่อหุ้มของเซลล์รับรส



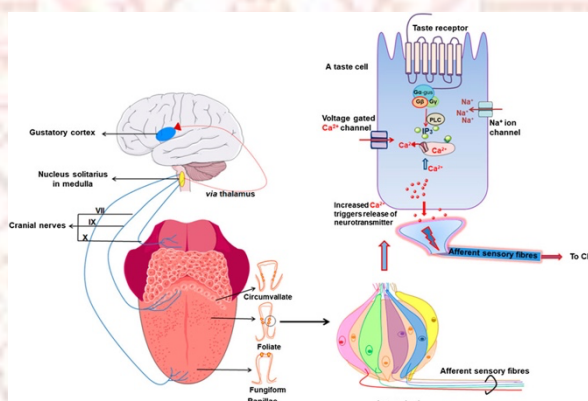
ภาพที่ 2- 10 ตุ่มรับรสในช่องปาก (taste bud)

ที่มา : Daniel และคณะ (2009)

โดยรสชาติ 5 อย่างที่หน่วยรับรสสามารถรู้ได้นั้น ประกอบไปด้วยรสเค็ม รสหวาน รสขม รสเปรี้ยว และรสอูมามิ ซึ่งเป็นคำภาษาญี่ปุ่นซึ่งสามารถแปลว่า "รสอร่อย" เป็นรสชาติพื้นฐานอย่างหนึ่งในอาหารชาวตะวันออกของชนชาติอื่น ๆ ที่มีหลักผสมอาหารให้ได้รสชาติที่กลมกล่อม ซึ่งกลไกการรับรู้รสจะเริ่มตั้งแต่สารที่มีรสทำปฏิกิริยากับน้ำลายซึ่งท่วมตุ่มรับรสที่อยู่บนโครงสร้างต่าง ๆ เช่นปุ่มลิ้น ทำให้โมเลกุลรสมิโอกาสทำปฏิกิริยากับหน่วยรับรสที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์รับรสซึ่งอยู่รวมตัวกันที่ตุ่มรับรส โดยรสหวาน รสอูมามิ และรสขม จะเริ่มจากการจับกันของโมเลกุลกับ G protein-coupled receptors ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์รับรส ส่วนรสเค็มและรสหวาน จะรู้ได้เมื่อโลหะแอลคาไลหรือไอออนไฮโดรเจน ไหลเข้าไปในเซลล์รับรส ในที่สุดเซลล์รับรสก็จะลดชั่วแล้วส่งสัญญาณกลืนผ่านใยประสาทรับรู้สึไปยังระบบประสาทกลาง สมองก็จะประมวลผลข้อมูลทำให้รู้รส [43]

โดยสารให้รสชาติอาหารที่นิยมใช้ส่วนใหญ่นิยมใช้สารที่ให้รสชาติอาหารธรรมชาติประเภทของสารที่ใช้จัดอยู่ในกลุ่มกรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบของโปรตีนนั่นเอง กรดอะมิโนแต่ละตัวจะมีรสชาติเฉพาะแตกต่างกันไป ซึ่งกรดกลูตามิก (Glutamic acid) เป็นกรดอะมิโนชนิดที่พบมากที่สุดโปรตีนตามธรรมชาติ เป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่มีความสัมพันธ์กับการรับรสอูมามิและเป็นองค์ประกอบสำคัญของโปรตีนทั่วไป เช่น โปรตีนในเนื้อสัตว์ โปรตีนในนม และโปรตีนในพืช โดยกรดกลูตามิกจะจับอยู่กับกรดอะมิโนตัวอื่น ๆ เกิดเป็นโครงสร้างของโปรตีน โดยกรดกลูตามิกที่อยู่ในรูปของโปรตีนจะไม่มีกลิ่นรสและไม่มีคุณสมบัติทำให้เกิดรสอูมามิในอาหารได้ แต่เมื่อเกิดการย่อยสลาย

ของโปรตีน เช่น เกิดกระบวนการหมัก การบ่ม การสุกงอมของผักและผลไม้ การทำให้สุกด้วยความร้อน จะทำให้กรดกลูตามิกในโปรตีนเกิดการสลายแยกตัวออกมาเป็นกรดกลูตามิกอิสระ ซึ่งเป็นตัวที่ทำให้เกิดรสอูมามิในอาหารได้ [27] โดยจะมีกลไกคือจะมีเซลล์รับรสอูมามิที่ตอบสนองต่อการตกกลูตามิกอิสระ ในลักษณะเดียวกับที่เซลล์รับรสหวานตอบสนองต่อน้ำตาล คือ กรดกลูตามิกอิสระ จะจับกับ G protein-coupled receptor คือ T1R1/T1R3 ซึ่งจะเริ่มการทำงานของจีโปรตีนที่คู่กัน ซึ่งในที่สุดก็เริ่มการทำงานของ isoform ของ phospholipase C คือ $PLC\beta_2$ ซึ่งทำให้ inositol triphosphate (IP_3) เพิ่มขึ้น ทำให้หน่วยเก็บในเซลล์ปล่อย Ca^{2+} แล้วเปิดช่อง TRPM5 (calcium-activated non-selective cation channel) ซึ่งทำให้เซลล์ลดชั่วอาศัยไอออน Na^+ ที่ไหลเข้าช่อง แล้วนำไปสู่การหลั่งสารสื่อประสาทที่ฐานของเซลล์ในที่สุด จากนั้นส่งสัญญาณของระบบประสาท (ภาพที่ 2-10) และในเซลล์ประสาทจะทำหน้าที่ตรวจว่ามีกรดกลูตามิก หรือไม่ หากพบกรดกลูตามิกในอาหารแม้เพียงเล็กน้อยจะทำให้เกิดรสอูมามิเด่นขึ้นมาเหนือรสอื่น ๆ ดังนั้นเมื่อเรารับประทานอาหารที่มีองค์ประกอบของกรดกลูตามิกเข้าไปก็จะสามารถทำให้รับรู้ถึงรสอูมามิได้ [42]



ภาพที่ 2- 11 แผนผังแสดงการส่งสัญญาณการรับรสชาติระหว่างลิ้นและสมอง
ที่มา : Dale และคณะ (2008)

เมื่อปี 1980 Rifkin และคณะพบว่า G protein-coupled receptor ไม่ได้ถูกกระตุ้นโดยกรดกลูตามิก เพียงอย่างเดียวเท่านั้น เพื่อที่ตอบสนองการเป็นจุดเด่นของรสอูมามิ แต่การกระตุ้นนี้ได้รับการสนับสนุนอย่างมากเมื่อมี 5'-ribonucleotides, (inosine 5' monophosphate; IMP) โดยเมื่อนำ IMP มารวมกันกับอาหารที่มีกรดกลูตามิกกลูอิสระจะทำให้รสอูมามิมีความเข้มข้นมากขึ้น

มีรายงานวิจัยพบว่ากรดกลูตามิกมีรสชาติคล้ายเนื้อสัตว์โดยมีรสเปรี้ยว รสหวาน รสเค็ม รสขม และรวมถึงรสอูมามิปะปนกัน แต่แสดงรสอูมามิเด่นมากที่สุดซึ่งในการเสริมรสนั้นกรดกลูตามิกจะกระตุ้นประสาทในปากและลำคอทำให้รู้สึกอร่อยขึ้นเมื่อรับประทานอาหาร โดยกรดกลูตามิกจะช่วยเสริมรสชาติได้ดีในอาหารจำพวกอาหารคาว นอกจากนี้กรดกลูตามิกยังสามารถทำให้ความรู้สึก

ทางด้านรสชาติบางอย่างลดลง เช่น ลดความฉุนของหัวหอม และกลิ่นดินในผัก และอาหารที่กรดกลูตามิกไม่ช่วยให้รสชาติดีขึ้นคือ อาหารจำพวกของหวานต่าง ๆ เค้ก ผลไม้ นมและเนย [44]

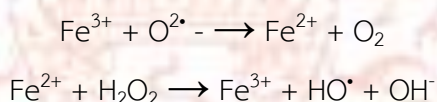
และมีอีกรายงานวิจัยพบว่ารสชาติหนึ่ง ๆ ของอาหารเกิดจากการใช้สารให้รสชาติแต่ละชนิด ในอุตสาหกรรมอาหารจึงนิยมใช้สารให้รสชาติ อาหารมากกว่าหนึ่งชนิดผสมกันเพื่อทำให้อาหารมีรสชาติอร่อย ในอาหารเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้น โดยกรณีใช้กรดอะมิโนกลูตินิกหรือโมโนโซเดียมกลูตาเมต ร่วมกับ AMP หรือ GMP หรือ IMP ทำให้ความเข้มข้นของรสชาติอร่อยมีมากขึ้น โดยเฉพาะอาหารประเภท ซุปต่าง ๆ และมีผลการวิจัยทางสรีรวิทยา จิตวิทยา ชีวเคมีและประสาทวิทยา พบว่าปัจจัยที่สำคัญที่สุดที่มีผลโดยตรงต่อผู้บริโภค คือ รสชาติ [45]

2.4 กลไกการทำงานของกรดกลูตามิกด้านการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (Free Radical) คือ โมเลกุลหรืออะตอมที่ไม่เสถียรเนื่องจากขาด อิเลคตรอน ซึ่งโดยปกติในร่างกายของเรามีโมเลกุลหรืออะตอมที่มีอิเล็กตรอนอยู่เป็นจำนวนคู่ ในกรณีที่มีร่างกายมีการสูญเสียอิเล็กตรอนจากการถูกอนุมูลอิสระแย่งจับ จะทำให้โมเลกุลของเซลล์ในร่างกายไม่เสถียร ขาดความสมดุล ซึ่งส่งผลทำให้เซลล์ร่างกายเสียหายได้ ซึ่งอนุมูลอิสระเกิดจากมลพิษในอากาศ โอโซน ไนโตรออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ ฝุ่น ควันบุหรี่ อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว แสงแดด ความร้อน รังสีแกมมา และรวมไปถึงอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์อนุมูลไฮดรอกซิล อนุมูลเปอร์ออกซี ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และลิปิดเปอร์ออกซี ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้น โดยปกติอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างขึ้นเหล่านี้จะถูกควบคุมโดยการที่เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยกลไกที่หลากหลาย เช่น การดักจับอนุมูลอิสระ การจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสร้างอนุมูลอิสระ โดยสารต้านอนุมูลอิสระทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เอนไซม์ เช่น วิตามินซี วิตามินอีและวิตามินเอ บีต้า-แคโรทีน กรดอะมิโน เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส กลูตาไทโอน เป็นต้น ซึ่งเมื่ออนุมูลอิสระเข้าไปทำลายเซลล์ เมื่อร่างกายไม่สามารถผลิตหรือได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเพียงพอที่จะไปยับยั้งหรือไปจับอนุมูลอิสระได้ภายในเซลล์ของร่างกาย ผลคือจะทำให้เซลล์เกิดความเสียหายและนำไปสู่การเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด แก่ก่อนวัย ต้อกระจก และโรคอื่น ๆ เช่น อนุมูลอิสระไปทำลายผนังหลอดเลือดแดง และเมื่อมีไขมันไปสะสมอยู่ในบริเวณหลอดเลือดแดงที่ถูกทำลาย จะทำให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดในที่สุด แต่ถ้าเราได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเพียงพอ สารต้านอนุมูลอิสระเข้าไปป้องกันหรือแย่งที่จับกับอนุมูลอิสระ และนำอนุมูลอิสระเหล่านั้นไปทิ้งนอกเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่ถูกทำลาย โดยกลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระจะมีหลายรูปแบบ เช่น free radicals scavenging โดยสารที่ผ่านกลไกนี้ได้แก่ butylated hydroxyl anisole (BHA) และ วิตามินอี (alpha-tocopherol) กลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids phenolic acid) ที่ยับยั้งการทำงานของ

ของ lipoxygenase ซึ่งไปจับกับโลหะของเหล็กที่ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ของเอนไซม์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังอาศัยกลไกการจับกับโลหะหนักที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันเพื่อสร้างอนุมูลอิสระ (metal chelation) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) มีสารที่ผ่านกลไกนี้ เช่น carotenoids กลไกอื่น ๆ เช่น หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain breaking) และการเสริมฤทธิ์ (synergism) เป็นต้น [46]

ซึ่งกลไกการทำงานในการต้านอนุมูลอิสระคืออนุมูลอิสระที่อะตอมหรือโมเลกุลที่ประกอบด้วยอิเล็กตรอนจำนวนคี่ peroxyl radical พร้อมทั้งจะจับกับโมเลกุลอื่นโดยฉับพลัน ซึ่งอนุมูลอิสระอาจเกิดได้จากขบวนการเมตาบอลิซึมภายในร่างกาย ขบวนการ phagocytosis โดยนิวโทรฟิลล์ โมโนไซต์ แมคโครเฟจ การหายใจในไมโทคอนเดรีย ขบวนการทำลายสารพิษ (xenobiotic detoxification) เช่น ในขบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอน ถ้ามีการรับเพียงอิเล็กตรอนในปฏิกิริยารีดอกซ์ของ O_2 ไปเป็น H_2O จะเกิดอนุมูล superoxide radical หรือ superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) ขึ้น เมื่อ $O_2^{\cdot-}$ รับ H^+ จะได้อนุมูลไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxyl radical, $HO_2^{\cdot}$) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ $HO_2^{\cdot}$ อีกอนุมูลหนึ่งเกิดเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) สามารถเกิด dismutation โดยมี Fe^{3+} เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเกิดเป็น hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระซึ่งมีปฏิกิริยาที่ว่องไวสูงมาก



การเกิด Fenton reaction ของโลหะหนัก

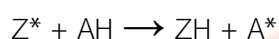
2.5 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ

2.5.1 DPPH• radical scavenging activity

หลักการและกลไก

วิธีนี้ได้รับการพัฒนาโดย Blois เมื่อปี 1958 เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในลักษณะเดียวกันโดยใช้ α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl ที่เสถียร ซึ่งการทดสอบนี้เป็นการวัดความสามารถในการขจัดสารต้านอนุมูลอิสระที่มีต่อกันโดยอิเล็กตรอนที่ไม่เสถียรของอะตอมไนโตรเจนใน DPPH• จะรับอะตอมไฮโดรเจนจากสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่ง DPPH• ที่มีลักษณะเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรอาศัยการแยกส่วนของอิเล็กตรอนสำรองไว้เหนือโมเลกุล (ภาพที่ 2-11) เพื่อให้โมเลกุลไม่ลดขนาดลง เช่นเดียวกับอนุมูลอิสระอื่น ๆ

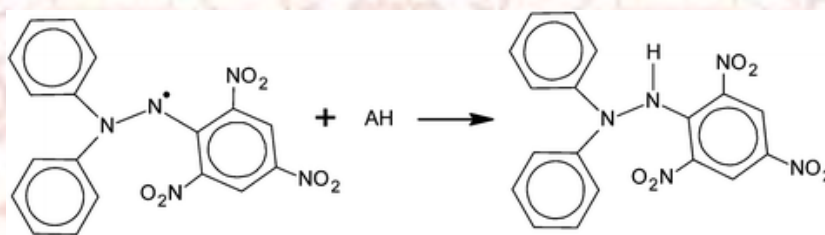
โดย DPPH• ที่เป็น radical (ภาพที่ 2-11) เมื่ออยู่ในตัวทำละลายเมทานอล สารละลายนี้มีสีม่วง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่มีความยาวคลื่น 515-517 นาโนเมตร และเมื่อผสมสารละลาย DPPH• กับสารที่สามารถให้อะตอมไฮโดรเจนได้ จะทำให้เกิดการรีดิวซ์และทำให้สีของสารละลายสีม่วงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ดังสมการ



โดย Z^* แทนอนุมูลของ DPPH•

AH แทนโมเลกุลที่สามารถให้อะตอมไฮโดรเจน

อนุมูลของ DPPH• ได้รับอะตอมไฮโดรเจนและถูกควบคุมโดยปริมาณสัมพันธ์ ดังนั้นจากสมการจึงมีเป้าหมายเพื่อให้เชื่อมโยงกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในระบบออกซิไดซ์ เช่น การออกซิเดชันของสารที่ไม่อิ่มตัว โดยโมเลกุล Z^* จะเป็นตัวแทนของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในระบบ ซึ่งจะถูกยับยั้งโดยสาร AH หรือโมเลกุลที่สามารถให้อะตอมไฮโดรเจน [47]



ภาพที่ 2- 12 DPPH• radical และ DPPH• stable

ที่มา : https://www.researchgate.net/figure/DPPH•-free-radical-and-its-reduced-form_fig1_286247350

ข้อดี ของวิธีนี้มีข้อดี คือ ง่าย ใช้เครื่องมือสามัญที่มีทั่วไป นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านอนุมูลจากธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีการดูดกลืนแสงในย่านเดียวกัน

ข้อเสีย ของวิธีนี้คือ อนุมูล DPPH• มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้นอกจากนี้ โครงสร้างทางเคมีของ DPPH• ที่แสดงจะเห็นว่าอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตร ทำให้สารต้านอนุมูลที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาขจัดอนุมูลหรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริง ทั้ง ๆ ที่ สารต้านอนุมูลนั้นมีฤทธิ์ดีในการขจัดอนุมูลเปอร์ออกซี นอกจากนี้สารรีดิวซ์สามารถทำให้ สี DPPH• จางลงได้อีกด้วย

ปี 2019 Zheng และคณะ ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนจากถั่วดำที่ไฮโดรไลซ์ด้วย เอนไซม์ bromelain และใช้วิธี DPPH• วัดความสามารถในการกำจัดอนุมูล ซึ่งได้ค่า DPPH• ด้วย IC_{50} ต่ำสุดที่ 21.11 ไมโครกรัมมิลลิลิตร โดยมีขั้นตอนการทดลองคือ เจือจางโปรตีนไฮโดรไลส 2 เท่าจากที่เตรียมได้ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ที่มี DPPH• 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปล่อยให้ผสมให้อยู่ในความมืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่า การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร [48]

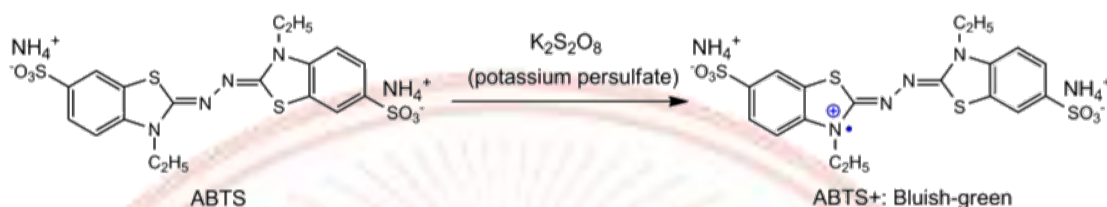
ปี 2021 Tilahun และคณะ ศึกษากระบวนการบรรจุภัณฑ์ของมะเขือเทศราชินีเพื่อยาวระยะเวลา การจำหน่ายและรักษาสัมบัติการต้านอนุมูลอิสระเพื่อความพึงพอใจของผู้บริโภค ซึ่งมีการใช้วิธี DPPH• วัดความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ซึ่งจากการทดลองพบว่าการยับยั้ง DPPH• ร้อยละ 87.73 โดยมีขั้นตอนหรือวิธีการทำคือ นำสารสกัดมะเขือเทศ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมกับเมทานอล-DPPH• ปริมาตร 3.2 มิลลิลิตร และเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นวัดค่า การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร [49]

ปี 2018 Mahieddine และคณะ วิเคราะห์ปริมาณของฟีนอล ฟลาโวนอยด์ โพลีฟีนอล และ ประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH• จากมะเขือเทศ ที่ผ่านการอบด้วยไมโครเวฟ ที่เวลา 30 และ 300 วินาที พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH• มีค่า IC_{50} ที่ 1.69, 1.50, 1.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งขั้นตอนและวิธีการทดลองคือ นำตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธี ethanol extract มาปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายเมทานอล DPPH• 0.4 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 900 ไมโครลิตร นำมาเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร [50]

2.5.2 ABTS•+ radical scavenging activity

ABTS•+ assay หรือ 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) มีสูตร โมเลกุล $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$ เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดของ ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ ได้แก่ พริกสารสกัดจากพืช โพลีฟีนอล กรดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และ อื่น ๆ โดยมีหลักการคือจะใช้สาร 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS•+ มาทำเป็นอนุมูลอิสระซึ่งถูกออกซิไดซ์ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ให้กลายเป็น ABTS•+ ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีสีฟ้า-เขียว (ภาพที่ 2-12) โดยจะดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นสูงสุดหลายค่า ได้แก่ 645, 734, และ 815 นาโนเมตร แต่นิยมวัดค่าความยาวคลื่นที่ 734 นาโนเมตร ซึ่งเกิดจากการ ที่อะตอมไนโตรเจนของ ABTS•+ สูญเสียอิเล็กตรอน เมื่อเติม Trolox หรือ สารต้านอนุมูลอิสระให้ ไฮโดรเจน ทำให้อะตอมไนโตรเจนจับกับไฮโดรเจน สารละลายเปลี่ยนสีและการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 734 นาโนเมตรลดลง ซึ่งการลดลงของ ABTS•+ จะสังเกตได้จากการจางลงของสีเขียวใน

สารละลาย (ภาพที่ 2-13) โดยวิธีนี้สามารถหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วย $\text{ABTS}^{\bullet+}$



ภาพที่ 2- 13 Formation of stable $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radical from ABTS with potassium persulfate

ที่มา : Fan Xiao (2020)



ภาพที่ 2- 14 Formation of $\text{ABTS}^{\bullet+}$ from stable $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radical with antioxidant material

ที่มา : Fan Xiao (2020)

ข้อดีของวิธีนี้มีข้อดี คือ ใช้ทดสอบได้หลายช่วง pH ไวต่อสารละลายที่เป็นกรด และเกิดปฏิกิริยาไวกว่า DPPH $^{\bullet}$ ข้อเสีย ของวิธีนี้คือสารมีราคาแพง [51]

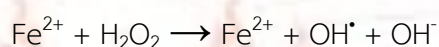
มีการศึกษาการเปรียบเทียบการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟและคลื่นเสียงความถี่สูงพบว่า เมื่อใช้คลื่นเสียงความถี่สูง ให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระ $\text{ABTS}^{\bullet+}$ สูงกว่า การสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ เท่ากับ 8.37 SC50 mg/mL [52]

ในปี 2022 Luana และคณะ ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนจากมะเขือเทศกระป๋อง ผลของการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH $^{\bullet}$ $\text{ABTS}^{\bullet+}$ FRAP ได้ 36-89.5%, 13.5-53.7% และ 40.4-80.5% ตามลำดับ

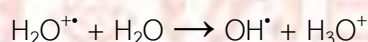
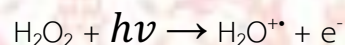
2.5.3 Hydroxyl radical scavenging activity

Hydroxyl radical ($\text{OH}^\cdot$) เป็นอนุมูลอิสระที่ว่องไวมาก สามารถจับโมเลกุลที่สำคัญในร่างกายโดยการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่อย่างต่อเนื่อง สิ่งมีชีวิตสามารถสร้าง $\text{OH}^\cdot$ radical โดย 2 กลไกได้แก่

ก. ปฏิกิริยาของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) แม้ว่าเกลือของโลหะทรานซิชันทั่วไปทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ได้ $\text{OH}^\cdot$ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า Fenton reaction ดังสมการ



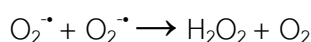
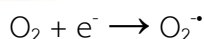
การแตกตัวของน้ำ เนื่องจากการถูกแสงหรือรังสี ดังสมการ



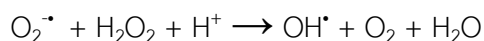
ในการศึกษาความสามารถในการยับยั้ง $\text{OH}^\cdot$ radical ของสารตัวอย่างต้องทำการสังเคราะห์ Hydroxyl radical จากน้ำตาล deoxyribose เมื่อเติมสาร Thiobarbituric acid (TBA) และน้ำตาล Trichloroacetic acid จะเกิดเป็นสีชมพู เมื่อเติมสารที่ต้องการทดสอบที่มีความสามารถในการยับยั้ง $\text{OH}^\cdot$ radical จะทำให้สีชมพูของสารละลายจางลง โดยสามารถตรวจสอบได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

2.5.4 Superoxide radical scavenging activity

Superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) เป็นอนุมูลเริ่มแรกที่เกิดขึ้นในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและเป็นตัวเริ่มต้นที่ทำให้อนุมูลอิสระตัวอื่น ๆ อีกมากมายจากการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ นอกจากจะทำให้อนุมูลอิสระมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นและฤทธิ์และความแรงของอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาลูกโซ่เป็นอันตรายสูงขึ้นด้วย ซึ่งการเกิด $\text{O}_2^{\cdot-}$ เป็นดังสมการ



เมื่อ $\text{O}_2^{\cdot-}$ ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 จะทำให้เกิด $\text{OH}^\cdot$ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า Haber-Weiss reaction ดังสมการ



โดยอนุมูล $\text{O}_2^{\cdot-}$ ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับสาร Nitroblue tetrazolium (NBT) ซึ่งมีสีเหลืองซึ่งปฏิกิริยาระหว่าง $\text{O}_2^{\cdot-}$ กับสาร NBT ผลิตผลิตภัณฑ์เป็นสาร diformazan (DF) ที่มีน้ำเงิน และความสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 560 นาโนเมตร

2.5.5 Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

FRAP assay เป็นการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการรับอิเล็กตรอนอิสระ (reducing agent) โดยอาศัยคุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ในปฏิกิริยา redox-linked colorimetric method โดยที่ ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) complex จะถูกรีดิวซ์ด้วยสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้ ทำให้เกิด Fe^{2+} -TPTZ complex (10 นาที) ซึ่งมีสีน้ำเงินเข้มดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร จึง สามารถใช้วัด total reducing power ของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้ Fe^{3+} เปลี่ยนเป็น Fe^{2+} ได้

ข้อดี ของวิธีนี้มีข้อดี คือ เกิดปฏิกิริยาไว ไม่แพง และง่ายต่อการทดสอบ ข้อเสีย ของวิธีนี้คือ ไม่สามารถวัดการขนส่งโปรตอน (hydrogen transfer) ของสารต้านอนุมูลอิสระได้ เช่น SH group (thiol) และไม่สามารถวัดกลไกทางชีวภาพของร่างกายได้ [51]

มีรายงานวิจัยพบว่าวิธี Ferric reducing antioxidant power เป็นวิธีทดสอบการต้านอนุมูลอิสระที่มักใช้ทดสอบกับอาหาร และยังพบว่าสารสกัดจากมะเขือเทศสามารถต้านอนุมูลอิสระ TEAC และ FRAP ได้

2.6 การอักเสบ

กระบวนการอักเสบเป็นปฏิกิริยาของเซลล์เนื้อเยื่อของร่างกาย ที่ตอบสนองต่อสิ่งรบกวน มีผลต่อการทำงานของอวัยวะในร่างกาย ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นน้อยหรือมากขึ้นอยู่กับชนิดและความรุนแรงของสิ่งรบกวน ความต้านทาน รวมถึงความผิดปกติของแต่ละบุคคลด้วย การอักเสบทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่หลอดเลือด ส่งผลให้สารภายในหลอดเลือดรั่วซึมสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์ เม็ดเลือดขาวจึงเคลื่อนเข้าสู่บริเวณที่อักเสบ มีผลให้ไลโซโซมแตกและปลดปล่อยเอนไซม์หลายชนิดเพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอมในเซลล์ อาการที่แสดงถึงการอักเสบคือ ปวด บวม แดง และร้อน สาเหตุดังกล่าวอาจเกิดจาก inflammatory mediator และ pro inflammatory cytokine เช่น Nitric oxide (NO) ที่ถูกปลดปล่อยออกมากระตุ้นปลายประสาททำให้รู้สึกปวด มีการเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของ

ผนังหลอดเลือด ทำให้เกิดอาการบวม มีการเปลี่ยนแปลงของการไหลเวียนเลือดในเส้นเลือดฝอย ทำให้บริเวณที่เกิดการอักเสบมีลักษณะแดง และรู้สึกร้อนที่ผิว [53]

ไนตริกออกไซด์มีคุณสมบัติเป็นสารสื่อกลางในกระบวนการอักเสบ โดยมีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อน ($\text{N}=\text{O}$) เซลล์ที่สามารถสร้าง NO ได้ ได้แก่ เซลล์บุผนังหลอดเลือด, macrophage และ neuron โดย NO จะทำปฏิกิริยากับ superoxide ion เกิดเป็นสาร peroxynitrite ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีความว่องไวต่อปฏิกิริยาสูงมาก สามารถทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์บริเวณที่มีการอักเสบ [54]

Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) ถูกผลิตโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันหลายชนิดใน monocyte และ macrophage ที่ถูกกระตุ้นโดยสิ่งแปลกปลอมหรือระบบภูมิคุ้มกัน lymphocyte ทั้งชนิดบีและที รวมทั้งไฟโบรบลาสต์ TNF-alpha จัดเป็นสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (proinflammatory cytokine) มีฤทธิ์กระตุ้นการผลิตไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบชนิดอื่น ๆ และสารตัวกลางในกระบวนการอักเสบหลายชนิด เช่น interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8) และ granulocytemonocyte colony stimulating factor (GM-CSF) [55]

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. กากมะเขือเทศ
2. โบรมิเลน จากบริษัท K-Much Industry Company Limited
3. ชุดกรองแบบลดความดัน ยี่ห้อ HCT รุ่น 180/125 ประเทศเยอรมัน
4. กระดาษกรอง เบอร์ 1
5. เทอร์โมมิเตอร์ ยี่ห้อ Alla รุ่น LTH-55000T110 ประเทศฝรั่งเศส
6. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ยี่ห้อ Buchi รุ่น B-480 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
7. ตู้อบ (hot air oven) ยี่ห้อ Binder รุ่น ED Series ประเทศเยอรมัน
8. เครื่องคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic assisted extraction) ยี่ห้อ Elma รุ่น E100H ประเทศเยอรมัน
9. เครื่อง microplate reader ยี่ห้อ TECAN รุ่น Infinite M200)
10. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ยี่ห้อ METTLER TOLEDO
11. เครื่องชั่ง ยี่ห้อ Ohaus รุ่น PA323C ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. เครื่องปั่นแยกแรงเหวี่ยงสูงแบบควบคุมอุณหภูมิได้ (high speed refrigerated centrifuge) ยี่ห้อ Hettich รุ่น Universal 320 ประเทศเยอรมัน
13. ชุดเครื่องมือสกัดไขมันแบบ Soxhlet ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น EV6A II/16 ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. เตาเผาถ่าน (furnace) ยี่ห้อ Branstead รุ่น F6010 ประเทศสหรัฐอเมริกา
15. เครื่อง High pressure liquid chromatography (HPLC) ยี่ห้อ Agilent ประเทศสหรัฐอเมริกา
16. เครื่อง GC-MS ยี่ห้อ Agilent ประเทศสหรัฐอเมริกา
17. เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น ปีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ ขวดปรับปริมาตร และอื่น ๆ

3.2 สารเคมี

sodium hydroxide (Ar grade), sodium chloride (Ar grade), 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)-hydrazin-1-yl (Ar grade), Ethanol (Ar grade), Trolox (Ar grade), Potassium

persulphate (Ar grade), Sodium phosphate buffer (pH 7.4), 1,10 phenanthroline (Ar grade), Ferrous sulfate (Ar grade), Hydrogen peroxide (Ar grade), Tris- HCl buffer (pH 8.3), EDTA (Ar grade), Pyrogallol (Ar grade), Hydrochloric acid (Ar grade), Acetate buffer (pH 3.6), TPTZ (Ar grade), Iron chloride hexahydrate (Ar grade), Ferrous sulphate Heptahydrate (Ar grade), 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (Ar grade), สารเคมีอื่น ๆ

3.3 วิธีการศึกษาและการทดลอง

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างกากมะเขือเทศและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

นำกากมะเขือเทศ มาทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drier) เพื่อให้ได้กากมะเขือเทศแห้ง จากนั้นนำกากที่แห้งแล้วบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น ร่อนผ่านตระแกรงขนาด 40 เมช และเก็บไว้ในตู้คุมอุณหภูมิ -20°C เพื่อทดลองในขั้นตอนต่อไป วิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ลักษณะปรากฏ และองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า และคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีของ AOAC (2000) (ภาคผนวก ก) และหาปริมาณกรดกลูตามิกในกากมะเขือเทศ โดยใช้เครื่อง HPLC ชนิดคอลัมน์ RP-18 GP ($250 \times 4.6 \times 5 \mu\text{m}$) ใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็น 10 มิลลิโมลาร์ $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{H}_3\text{PO}_4$ (ค่าความเป็นกรดต่าง 2.55) และ อะซิโตรไนไตรล์ (acetonitrile) โดยใช้อัตราส่วน 95:5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร อุณหภูมิ 30°C ความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร [56] โดยใช้สารแอลกลูตามิกเป็นสารมาตรฐาน

3.3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารเสริมรสชาติเชิงสุขภาพจากมะเขือเทศโดยใช้โบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (Enzyme and ultrasonic assisted extraction, Enz-UAE)

นำผงกากมะเขือเทศแห้งที่เตรียมไว้จากข้อ 3.3.1 จำนวน 2 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (ความดัน 15-20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 25 นาที) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เป็น 6.0 นำไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 50°C เตรียมสารละลายโบรมิเลนแปรความเข้มข้นร้อยละ 0, 5, 10, และ 15 โดยน้ำหนัก เอนไซม์ต่อกากมะเขือเทศ ใส่ลงในขวดที่เตรียมกากมะเขือเทศไว้ จากนั้นนำไปทำการย่อยสลายร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง โดยการใส่ลงในเครื่อง Ultrasonic bath ที่ความถี่ 400W แปรค่าเวลาในการสกัดเป็น 0, 15, 30 และ 45 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ $50 \pm 5^{\circ}\text{C}$ เพื่อควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยความร้อน

ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95°C เป็นเวลา 15 นาที นำตัวอย่างที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ภายใต้สภาวะสุญญากาศ เพื่อแยกเอาส่วนตะกอนออก เก็บส่วนใสที่ได้ เรียกสารสกัดที่ได้จากสภาวะดังกล่าวว่า สารเสริมรสจากกากมะเขือเทศ (สารสกัดจากมะเขือเทศ) โดยใช้โบรมิเลนร่วมกับคลีนเสียงความถี่สูง (Enz+UAE) เปรียบเทียบกับสภาวะการสกัดโดยใช้โบรมิเลนเพียงอย่างเดียว (Enz) และใช้คลีนเสียงความถี่สูงเพียงอย่างเดียว (UAE) จากนั้น นำสารสกัดที่ได้จากทุกสภาวะไปทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) และเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20°C เพื่อวิเคราะห์ปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้ (yield) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน วิเคราะห์ปริมาณกรดกลูตามิก วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ 5 วิธี ได้แก่ DPPH• radical-scavenging activity, ABTS•+ radical-scavenging activity, hydroxyl-scavenging activity, superoxide-scavenging activity, ferric reducing antioxidant power วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ วิเคราะห์องค์ประกอบการให้กลิ่นรส ศึกษาการยอมรับด้านประสาทสัมผัสทางด้านรสชาติอูมามิ (Umami) (ด้วย 5 point scoring test จำนวนผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน 15 คน) วิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ และวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ

3.3.3 วิธีวิเคราะห์ปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้ (yield)

วิเคราะห์ปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัดเสริมรสจากกากมะเขือเทศด้วยสภาวะการใช้โบรมิเลนร่วมกับคลีนเสียงความถี่สูง (Enz+UAE) โดยการนำผงตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้งด้วยการทำแห้งแบบเยือกแข็งของแต่ละสภาวะการย่อยสลายมาชั่งน้ำหนัก และคำนวณน้ำหนักของผงแห้งที่ได้ต่อน้ำหนักผงกากมะเขือเทศตั้งต้น ดังสมการด้านล่าง

$$\text{ปริมาณร้อยละผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของสารสกัด}}{\text{น้ำหนักผงกากมะเขือเทศเริ่มต้น}} \times 100$$

3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดย วิธี Bradford protein assay

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสกัดโดยดัดแปลงจากวิธีของ [57] โดยเตรียม Bovine Serum Albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นของ โปรตีนระหว่าง 50-1000 mg/L ละลายตัวอย่างด้วยน้ำ DI เติมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 20 μL และ Bradford dye reagent ปริมาตร 200 μL ลง ใน 96 well plate จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที วิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) คำนวณความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างวิเคราะห์

3.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูตามิก

ศึกษาปริมาณกรดกลูตามิกด้วยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) ตามวิธีของ [56] โดยตกตะกอนสารละลายตัวอย่างด้วยกรด sulfosalicylic acid เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 g เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใส จากนั้นปรับ pH เป็น 2 กรองผ่านชุดกรองขนาด 0.45 μm และหลังจากการ pre-column derivatizing ด้วย phthalic dicarboxaldehyde (OPA) นำตัวอย่างฉีดเข้าเครื่อง HPLC ซึ่งเป็นชนิด reversed-phase HPLC (PEEK column, 4.6 $\times$ 150 mm, 7 μm , 10% crosslink) วิเคราะห์กรดอะมิโนที่ได้เทียบกับ กรดอะมิโนมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.6 วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compounds)

นำสารสกัดมะเจือเทศมาวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ตามวิธีของ [58] โดยผสม ตัวอย่างแต่ละสภาวะการสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับ 10% folin-ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม 7.5% โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 90 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer (Thermo scientific, Evolution 60S, USA) คำนวณปริมาณสารฟีนอลิกจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 25 - 150 มิลลิกรัมต่อลิตร คำนวณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของตัวอย่างในเทอมของมิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อ น้ำหนักตัวอย่าง 100 กรัม (Gallic acid equivalent; GAE) ตัวอย่าง blank ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง และทำการทดลองเช่นเดียวกับตัวอย่าง

3.3.7 วิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid compounds)

วิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยวิธี aluminum chloride colorimetric method เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเคอซีทิน (Quercetin) ดัดแปลง วิธีการทดลองจาก [59] โดยเตรียมสารมาตรฐานเคอซีทินที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ในสารละลาย 80% เอทานอล และสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ทำการทดลองโดยนำ 95% เอทานอลปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร 10% อลูมิเนียมคลอไรด์ (aluminum chloride) (m/v) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร 1 โมลต่อลิตร โพแทสเซียมอะซิเตท (potassium acetate) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน ตามด้วยสารมาตรฐานหรือ สารสกัด ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำมาวัด

ค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer แสดงค่าเป็นปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของตัวอย่างในเทอมของมิลลิกรัมแควอซีตินต่อน้ำหนักตัวอย่าง 100 กรัม (Quercetin equivalent; QE)

3.3.8 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารฟีนอลิก (phenolic compounds)

ศึกษาชนิดและปริมาณสารฟีนอลิกของสารให้กลิ่นรสของกากมะเขือเทศและสารสกัดมะเขือเทศทุกสภาวะด้วยเครื่อง HPLC คอลัมน์ Mightysil C18 column (150 × 4.6) particle เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 5 ไมครอน (Kanto chemical, Japan) ใช้สภาวะในการแยกแบบ gradient ด้วยสารละลาย 0.1 M TFA ในน้ำ (A) กับ อะซิโตรไนไตรล์ (B) โดยที่เวลา 0 – 5 นาที ความเข้มข้น B เท่ากับ 5%, เวลา 5 – 25 นาทีความเข้มข้น B เท่ากับ 5 - 95%, เวลา 25 – 35 นาทีความเข้มข้น B เท่ากับ 95%, เวลา 35 – 35.1 นาทีความเข้มข้น B เท่ากับ 95 - 5% และเวลา 35.1 – 45 นาทีความเข้มข้น B เท่ากับ 5% ฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร อุณหภูมิ 60°C ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐาน ได้แก่ gallic acid, chlorogenic acid, caffein, (+) catechin, catechin (retinol), vanillic acid, caffeic acid, syringic acid, epicatechin, vanillin, p-coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid, catechol, 2-hydroxycinnamic acid, salicylic acid, trans-cinnamic acid, rutin, naringin, myricetin, quercetin, naringenin, hesperetin, luteolin, kaempferol และ apigenin

3.3.9 การทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติ

วิเคราะห์การยอมรับด้านประสาทสัมผัสด้านรสชาติ โดยนำตัวอย่างสารละลายเข้มข้นจากสภาวะการย่อยทุกสภาวะ นำไปประเมินการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นมะเขือเทศ กลิ่นตั๋ม ยำ กลิ่นคาว กลิ่นเปรี้ยว และรสชาติขม รสหวาน รสเค็ม รสเปรี้ยว รสอูมามิ และการยอมรับโดยรวม โดยใช้ผู้ทดสอบทั้งฝึกฝนจำนวน 15 คน ใช้วิธีทดสอบแบบ qualitative different test ให้คะแนนแบบ 5-point scoring test (ภาคผนวก ค) วางแผนการทดลองแบบ randomized completely block design (RCBD) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดย Duncan Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรม SAS, version 9.0 (2004)

3.3.10 วิเคราะห์องค์ประกอบสารให้กลิ่นรส (volatile compounds)

วิเคราะห์องค์ประกอบของสารให้กลิ่นรสของสารสกัดมะเขือเทศทุกสภาวะและกากมะเขือเทศด้วย Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) โดยการนำผงตัวอย่างละลายน้ำอัตราส่วนร้อยละ 5 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร วิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารหอมระเหยโดยใช้เทคนิค dynamic headspace solid-phase microextraction gas chromatography mass spectrometry (DHS-SPME-GC-MS) กำหนดโปรแกรมการวิเคราะห์ โดยเริ่มจากการอุ่นสารตัวอย่างที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดซับไอสารระเหยด้วยไฟเบอร์ 2cm-50/30 μ m DVB/CarboxenTM /PDMS StableFlexTM เป็นเวลา 20 นาที นำเข้าเครื่อง GC ใช้คอลัมน์ DB-WAX และก๊าซฮีเลียมเป็นตัวพาที่อัตราการไหลคงที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที injector อุณหภูมิ 240°C ให้ความเวลาในการชะสารระเหยออกจากไฟเบอร์เป็นเวลา 20 นาที ด้วยวิธี splitless โปรแกรมอุณหภูมิของ oven โดยเริ่มจากอุณหภูมิ 55°C คงไว้เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 180°C ด้วยอัตรา 5°C ต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และเพิ่มอุณหภูมิจาก 180 เป็น 200°C ด้วยอัตรา 8°C ต่อนาที คงไว้ที่อุณหภูมิ 200°C เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์สารระเหยด้วยเครื่อง MSD (scan range 33-350 amu) สภาวะเครื่อง 70 eV ที่อุณหภูมิ 230°C และแปลผลโดยเทียบกับ Wiley 275 และ NIST library ที่ % quality match ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 85 และเทียบกับสารละลายมาตรฐานอัลเคน (C₈-C₂₀ alkanes) ดังสมการ 1 และจากรายงานวิจัย คำนวณ % relative peak area ดังสมการ 2

$$RI = 100 \frac{[Rt(x) - Rt(z)]}{[Rt(z+1) - Rt(z)]} + 100z \quad (1)$$

โดย Rt(x) คือ retention time (นาที) ของสารตัวอย่างที่สนใจ

Rt(z) คือ retention time (นาที) ของ normal alkanes ก่อนสารตัวอย่าง

Rt(z+1) คือ retention time (นาที) ของ normal alkanes หลังสารตัวอย่าง

และ z คือ จำนวนของ carbon atoms

$$\% \text{ relative peak area} = \frac{\text{area (x)}}{\text{total area}} \times 100 \quad (2)$$

โดย area (x) คือ area ของ peak สารตัวอย่างที่สนใจ

total area คือ area รวมทั้งหมดของสารที่สนใจทั้งหมด

3.3.11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) ของกากมะเขือเทศ หลังจากย่อยด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง

เครื่อง Scanning Electron Microscope ยี่ห้อ FEI รุ่น QUANTA 450 โดยตั้งค่า SEM ที่ 15 kV โหมด HV ที่กำลังขยาย 100x, 1000x และ 2000x วิเคราะห์ลักษณะของกากมะเขือเทศหลังย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง

3.3.12 วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารเสริมรสจากกากมะเขือเทศ

3.3.12.1 การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH• radical scavenging activity

วิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยเตรียมสารเสริมรสจากกากมะเขือเทศที่ได้จากทุกสภาวะการสกัดที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมสารละลาย DPPH• ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ทำปฏิกิริยาโดยผสมสารตัวอย่างที่เตรียมไว้จำนวน 50 ไมโครลิตร กับสารละลาย DPPH• จำนวน 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (TECAN รุ่น Infinite M200) โดยดัดแปลงวิธีจาก [60] คำนวณความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH• ดังสมการ

$$\text{DPPH}\cdot \text{ radical scavenging activity (\%)} = \frac{A_{\text{Control}} - (A_{\text{Sample}})}{A_{\text{Control}}} \times 100$$

โดยที่ A_{Control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ control (น้ำกลั่น + DPPH•)

A_{Sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (ตัวอย่าง + DPPH•)

3.3.12.2 การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS•+ radical scavenging activity

เตรียมสารละลาย ABTS•+ โดยผสมสารละลาย 7 มิลลิโมลาร์ ABTS•+ กับสารละลาย 2.45 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตอัตราส่วน 2:1 บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง และเจือจางด้วยเอธานอลร้อยละ 95 จนสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ในช่วง 0.700 ± 0.030 นาโนเมตร จากนั้นวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS•+ โดยปิเปตตัวอย่างทดสอบปริมาตร 10 ไมโครลิตร กับสารละลาย ABTS•+ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใน 96-well polystyrene microplate

ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS•+ [61] ดังสมการ

$$\text{ABTS}\bullet\text{+ radical scavenging effect (\%)} = \frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}} \times 100$$

โดยที่ A_{Control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ control (น้ำกลั่น + ABTS•+)

A_{Sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (ตัวอย่าง + ABTS•+)

3.3.12.3 การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Hydroxyl radical scavenging activity

วิเคราะห์ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิล โดยดัดแปลงวิธีจาก [62, 63] นำสารตัวอย่างละลายในสารละลาย 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4 จากนั้นปิเปตสารตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ผสมกับ 3 มิลลิโวลาร์ 1, 10-phenantroline ปริมาณ 50 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย FeSO_4 ความเข้มข้น 3 mM จำนวน 50 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาด้วยการเติม 0.01% hydrogen peroxide (H_2O_2) 50 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 536 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (TECAN รุ่น Infinite M200) ในเวลาที่ 0 และวัดทุก ๆ 10 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37°C และเขย่าอย่างต่อเนื่อง ค่าร้อยละความสามารถในต้านอนุมูลอิสระคำนวณได้ดังสมการ กำหนดความเข้มข้นของตัวอย่างที่ทดสอบ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.0125, 0.025, 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือตามความเข้มข้นที่เหมาะสม

$$\text{Hydroxyl radical scavenging activity (\%)} = \frac{(\Delta A_{\text{min}}^{-1}(\text{blank}) - \Delta A_{\text{min}}^{-1}(\text{sample}))}{\Delta A_{\text{min}}^{-1}(\text{blank})} \times 100$$

โดยที่ ΔA คือ การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง

3.3.12.4 การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Superoxide radical scavenging activity

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี superoxide สามารถอธิบายได้โดย [63] ปิเปตสารตัวอย่าง 80 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลท ส่วนของ blank ให้ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ แทนสารตัวอย่าง ทำปฏิกิริยาโดยเติม pyrogallol 1.5 มิลลิโมลาร์ ที่อยู่ในสารละลาย HCl 10 มิลลิโมลาร์ จำนวน 40 ไมโครลิตร ติดตามค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาทันทีหลังจากเติมสาร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ในเวลาที่ 0 และวัดทุก ๆ 1 นาที เป็นเวลา 4 นาที คำนวณค่าร้อยละความสามารถในต้านอนุมูลอิสระดังสมการ กำหนดความเข้มข้นของตัวอย่างที่ทดสอบ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.0125, 0.025, 0.5, 1, และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือตามความเข้มข้นที่เหมาะสม

$$\text{Superoxide scavenging activity (\%)} = \frac{(\Delta A_{\text{min}}^{-1}(\text{blank}) - \Delta A_{\text{min}}^{-1}(\text{sample}))}{\Delta A_{\text{min}}^{-1}(\text{blank})} \times 100$$

โดยที่ ΔA คือ การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง

3.3.12.5 การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

วิเคราะห์ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ทำการเตรียมตัวอย่างสารละลาย FRAP โดยผสม acetate buffer 0.3 มิลลิโมลาร์ สารละลาย TPTZ 10 มิลลิโมลาร์ ในสารละลาย HCl ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 มิลลิโมลาร์ ที่อัตราส่วน 5:1:1 (โดยปริมาตร) เตรียมสารละลายตัวอย่างตามความเข้มข้นที่ต้องการโดยละลายในน้ำ DI บ่มตัวอย่างและสารละลาย FRAP ที่เตรียมไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ก่อนนำมาวิเคราะห์ จากนั้นทำการทำปฏิกิริยาใน 96-well microplate โดยผสมสารตัวอย่าง 40 ไมโครลิตร กับสารละลาย FRAP 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 593 โดยใช้ ด้วยเครื่อง microplate reader (TECAN รุ่น Infinite M200) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.03-0.9 มิลลิโมลต่อมิลลิลิตร) โดยแสดงค่าเป็นปริมาณมิลลิโมลของ Fe^{2+} ที่ถูกรีดิวซ์ ต่อกรัมสารตัวอย่าง [64]

3.3.13 การหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RSM)

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารเสริมรสจากกากมะเขือเทศ เมื่อทำการสกัดสารจากกากมะเขือเทศ โดยพิจารณาจากค่าร้อยละผลได้ ปริมาณกรดกลูตามิก ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH•, ABTS•+, hydroxyl, superoxide radical, FRAP การยอมรับด้านประสาทสัมผัสรสชาติดูมามี การยอมรับโดยรวม การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-square) และการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เพื่อนำมาสร้างสมการทำนาย ด้วยโปรแกรม IBM SPSS version 20, 2011

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2$$

เมื่อ Y คือ ค่าตัวแปรตาม

β_0 คือ ค่าคงที่สมการ

X_1 คือ ร้อยละความเข้มข้นเอนไซม์

X_2 คือ เวลาในการสกัดด้วย UAE (min)

เมื่อได้สมการการทำนาย จึงนำมาสร้างกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองของสารที่สกัดได้จากกากมะเขือเทศเทียบกับปัจจัยการสกัด โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ STATISTICA version 10, 2011 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์เชิงหน้าที่จากกากมะเขือเทศ จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความถูกต้องของแบบจำลองโดยแทนค่าที่ได้ลงในสมการทำนาย

3.3.14 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ โดยเลี้ยง vero cell (1×10^4 เซลล์ ต่อ หลุม) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี 10% FBS และยาปฏิชีวนะ ใน 96 well plate เลี้ยงเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีส่วนผสมของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สารละลายที่ใช้ในการละลายสารตัวอย่างถูกใช้เป็นสารละลายควบคุมเชิงลบ (negative control) และ 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO) (positive control) จะถูกใช้เป็นผลควบคุมเชิงบวกบ่มเซลล์พร้อมสารตัวอย่างและชุดควบคุมเป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นมาทดสอบความมีชีวิตพร้อมทั้งกำหนดค่า IC_{50} ด้วย ด้วยสารละลาย MTT โดยเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของสารละลาย MTT ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งพบผลึกสีม่วงเกิดขึ้น ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งก่อนละลายตะกอนด้วย DMSO ก่อนนำไป

วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร และวัดการดูดกลืนความยาวคลื่นมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร [65] ก่อนนำมาคำนวณหาอัตราการรอดชีวิตโดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\% \text{ survival rate} = \left(\frac{\text{Neg}_{\text{OD570-OD630}} - \text{Sample}_{\text{OD570-OD630}}}{\text{Neg}_{\text{OD570-OD630}} - \text{Pos}_{\text{OD570-OD630}}} \right) \times 100$$

3.3.15 การทดสอบความสามารถต้านอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ

ทำการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มี 10% FBS และยาปฏิชีวนะ หลังจากนั้นเลี้ยงเซลล์จำนวน 1×10^5 เซลล์ ต่อ หลุม ลงใน 96 well plate เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีส่วนผสมของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารละลายยา Dichofinac ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถูกใช้เป็นสารควบคุมเชิงบวกและสารละลายที่ใช้ในการละลายสารสกัดถูกใช้เป็นสารละลายควบคุมเชิงลบ บ่มเซลล์พร้อมสารสกัดและชุดควบคุมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บนำเลี้ยงเซลล์มาวัดปริมาณ NO ที่เกิดขึ้นโดยใช้ Griess reagent kit เปรียบเทียบกับแผนภูมิของสารมาตรฐาน NO เพื่อคำนวณหาค่าปริมาณของ NO ที่เกิดขึ้น และวิเคราะห์ค่าการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยสีย้อม Presto Blue โดยการเจือจางสีดังกล่าวด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วน 1:5 ก่อนเติมลงในแต่ละหลุมในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ซึ่งอัตราการรอดของเซลล์ต้องมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 80 ขึ้นไป [66]

3.3.16 การทดสอบ IL-6 และ TNF-alpha

การทดสอบการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ (cytokine) เพื่อดูทิศทางการยับยั้งสารที่ถูกปลดปล่อยจากเซลล์หลังเกิดการอักเสบ โดยศึกษาผลของสารสกัดมะเขือเทศที่ถูกกระตุ้นโดย LPS ต่อการหลั่ง IL-6 และ TNF-alpha วัดโดยวิธี ELISA เซลล์ RAW 264.7 เลี้ยงเซลล์จำนวน 3×10^5 เซลล์ ต่อ หลุม ลงใน 96 well plate เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีส่วนผสมของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนกระตุ้นด้วย Lipopolysaccharide (LPS) ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 25 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร ของสารละลายยา Dichofinac ถูกใช้เป็นสารควบคุมเชิงบวกและสารละลายที่ใช้ในการละลายสาร

สกัดจะถูกใช้เป็นสารละลายควบคุมเชิงลบ หลังจากนั้นนำเซลล์ไปตรวจหา IL-6 และ TNF-alpha ด้วยชุดทดสอบ ELISA [67]

3.3.17 การศึกษาการประยุกต์ใช้สารเสริมรสที่สกัดได้จากมะเขือเทศโดยใช้โบรมิเลนร่วมกับกลิ่นเสียงความถี่สูง จากสภาวะที่ดีที่สุด

ประยุกต์ใช้สารเสริมรสที่สกัดได้จากมะเขือเทศโดยใช้โบรมิเลนร่วมกับกลิ่นเสียงความถี่สูง จากสภาวะที่ดีที่สุด เพื่อใช้เป็นสารเสริมรสอูมามิในตั้มยำ ทดสอบการยอมรับด้านประสาทสัมผัสทางด้านรสอูมามิและการยอมรับโดยรวม

อัตราส่วนน้ำตั้มยำ

ส่วนผสมน้ำซุ๊ป

- น้ำเปล่า 1.5 ลิตร
- ซีอิ๊วไก่ 0.5 กิโลกรัม
- ข่า 100 กรัม
- ตะไคร้ 100 กรัม
- ใบมะกรูด 100 กรัม
- น้ำมะนาว 3 ช้อนโต๊ะ
- น้ำปลา 2 ช้อนโต๊ะ
- น้ำตาล 1/2 ช้อนโต๊ะ

ผสมส่วนผสมทั้งหมดลงไปแล้วต้มน้ำซุ๊ปด้วยไฟปานกลางค่อนข้างอ่อนเป็นเวลา 15 นาที

ผสมส่วนผสมทั้งหมดแล้วต้มจนได้น้ำซุ๊ป ผสมน้ำซุ๊ป 100 mL โดยการแปรอัตราส่วนร้อยละ 0, 10, 20, 30, และ 40 ต่อน้ำซุ๊ป จากนั้นทดสอบการยอมรับด้านประสาทสัมผัสทางด้านรสอูมามิ และการยอมรับโดยรวมกับผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 15 คน [68] ใช้วิธีทดสอบแบบ Qualitative different test ให้คะแนนแบบ 5-point scoring test วางแผนการทดลองแบบ Randomized Completely Block Design (RCBD) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดย DMRT ด้วยโปรแกรม SAS, (1997)

3.3.18 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองทั้งหมด (ยกเว้นการยอมรับทางประสามสัมพัสด้านรสชาติ) ทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ (n-3) วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดย the analysis of variance (ANOVA) และ Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ด้วยโปรแกรม SAS, version 9.0 (2002)



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 องค์ประกอบทางเคมีของกากมะเขือเทศ

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากมะเขือเทศ มีปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และเถ้าร้อยละ 16.53, 31.07, 2.40, 15.59 และ 16.03 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-1) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Aksoylu Özbek., et al. (2020). รายงานว่ากากมะเขือเทศ มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 32.69 [69] ส่วนงานวิจัยของ Mirzaei, A., et al. (2011). ได้รายงานว่าในมะเขือเทศ มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 26.40 ซึ่งปริมาณโปรตีนของกากมะเขือเทศที่วิเคราะห์ได้มีค่าของปริมาณโปรตีนต่างกันเล็กน้อย [70] โดยโปรตีนจากกากมะเขือเทศประกอบด้วยกรดอะมิโน คือ กรดแอสพาร์ติก กรดกลูตามิก เซอรีน ทรีโอนีน ไลซีน ฮิสติดีน อาจีนิน ไทโรซีน ฟีนิลอะลานีน เมไทโอนีน อะลานีน โพรลีน ลิวซีน ไอโซลูซีน และไกลซีน ซึ่งปริมาณกรดอะมิโนที่สกัดได้จากกากมะเขือเทศพบว่ามีปริมาณ กรดกลูตามิกสูงถึง 310.21 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง มีความชื้นเท่ากับร้อยละ 16.53 ± 0.68 ดังนั้นมะเขือเทศจึงจัดว่าเป็นผักที่อุดมไปด้วยกรดกลูตามิกที่สูง จึงมีความเหมาะสมสำหรับการนำมาประยุกต์เป็นสารเสริมรสต่อไป

ตารางที่ 4- 1 ร้อยละขององค์ประกอบทางเคมีของกากมะเขือเทศ

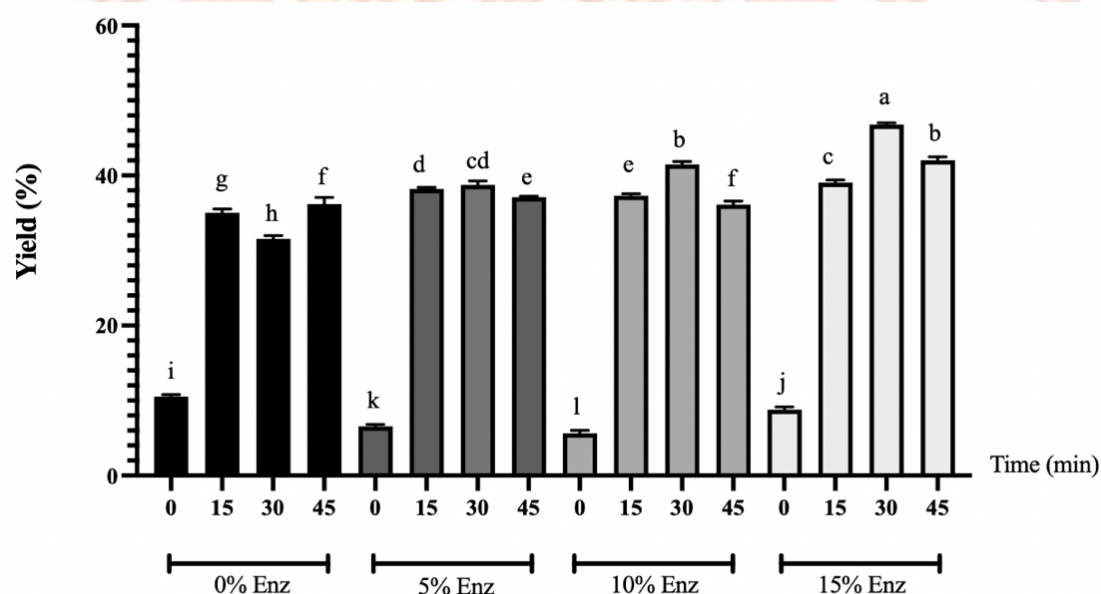
องค์ประกอบ	ปริมาณ (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)
โปรตีน	31.07 ± 0.77
ไขมัน	2.40 ± 0.56
เยื่อใย	15.59 ± 0.52
เถ้า	16.03 ± 0.72
คาร์โบไฮเดรต	34.92 ± 3.34

4.2 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง

จากผลการศึกษาสภาวะการสกัดสารสกัดจากมะเขือเทศด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (UAE) ที่สภาวะต่าง ๆ โดยแปรค่าปริมาณความเข้มข้นของโบรมิเลน 4 ระดับ ได้แก่ ร้อยละ 0, 5, 10 และ 15 โดยใช้น้ำหนักเอนไซม์ต่อกากมะเขือเทศ และแปรระยะเวลาในการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงหรือ ultrasonic bath ที่ความถี่ 400W 4 ระดับ คือ 0, 15, 30 และ 45 นาที (enz+UAE) กำหนดสภาวะในการย่อยสลายเท่ากับอุณหภูมิ 50°C ค่า pH เท่ากับ 6 เพื่อให้เหมาะสมกับการทำงานของโบรมิเลน [71] จากการวิเคราะห์ทางสถิติของตัวอย่างสารสกัดจากมะเขือเทศที่ได้จากทุกสภาวะ พบว่าความเข้มข้นของโบรมิเลน และระยะเวลาในการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงมีอิทธิพลร่วมระหว่างปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้ (yield) ปริมาณโปรตีน ปริมาณกรดกลูตามิก ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ องค์ประกอบการให้กลิ่นรส การยอมรับด้านประสาทสัมผัสทางด้านรสชาติอร่อย (umami) และความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ DPPH[•], ABTS^{•+}, hydroxyl, superoxide และ FRAP

4.3 ปริมาณร้อยละผลได้ของสารสกัดจากกากมะเขือเทศ

ผลการศึกษาปริมาณร้อยละผลได้ของสารสกัดจากกากมะเขือเทศ พบว่าปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาในการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงมีอิทธิพลร่วมกันต่อร้อยละผลได้ โดยที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 15 (โดยน้ำหนัก) และเวลาในการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง 30 นาที มีร้อยละผลผลิตสูงสุด เท่ากับ 46.79 ซึ่งแตกต่างกันเล็กน้อยกับความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 45 นาที ซึ่งมีร้อยละผลผลิต เท่ากับ 42.03 (ภาพที่ 4-1) เห็นว่าถึงแม้เวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นแต่ปริมาณร้อยละผลผลิตได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น อาจเกิดลักษณะการทำงานของเอนไซม์เกิดการยับยั้งจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (product inhibition) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เมื่อถึงช่วงระยะเวลาหนึ่งเอนไซม์ไม่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้น (substrate) ต่อไปได้ [72] ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้คงที่ ดังนั้นเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 30 นาที จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกากมะเขือเทศเพื่อให้ได้ร้อยละผลได้ที่ดีที่สุด



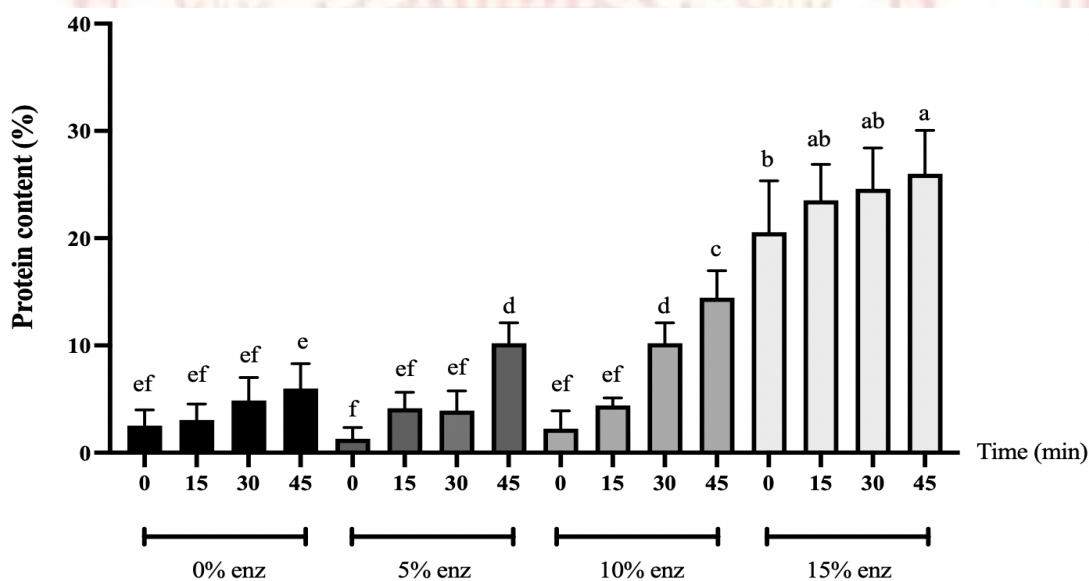
a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ภาพที่ 4- 1 ร้อยละผลได้ของสารสกัดจากกากมะเขือเทศด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง

4.4 ปริมาณโปรตีนโดย วิธี Bradford protein assay

ผลการศึกษาปริมาณโปรตีนในสารสกัดจากกากมะเขือเทศทุกสภาวะ พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาในการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงมีอิทธิพลร่วมกันต่อปริมาณโปรตีนที่พบในสารสกัดจากกากมะเขือเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งระยะเวลาในการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงมีอิทธิพล

ต่อปริมาณโปรตีนที่ถูกสกัดออกมา โดยที่สภาวะความเข้มข้นเดียวกันเมื่อระยะเวลาในการสกัดเพิ่มมากขึ้นปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4-2) ที่ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 15 พบปริมาณโปรตีนสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะการสกัดอื่นที่ใช้เอนไซม์แต่ต่างกันเป็นเวลาเท่ากัน ซึ่งที่เอนไซม์ร้อยละ 15 เมื่อเพิ่มเวลาสกัดเป็น 0, 15, 30 และ 45 นาที พบปริมาณโปรตีนร้อยละ 20.55, 23.51, 24.60 และ 26.01 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับสภาวะการสกัดที่ใช้ไม่ใช้เอนไซม์เลย คือที่สภาวะความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 0 เวลาในการสกัด 0, 15, 30 และ 45 นาที พบว่าได้ปริมาณโปรตีนร้อยละ 2.52, 3.06, 4.86 และ 5.97 ตามลำดับ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นเอนไซม์มากขึ้น ระยะเวลาในการสกัดมากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนเพิ่มมากขึ้น เนื่องมาจากโบรมิเลนซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ประเภทโปรติเอส มีความสามารถในการตัดจำเพาะที่กว้าง [71] ทำให้สามารถสกัดโปรตีนออกมาได้ เมื่อทำงานร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงที่มีปรากฏการณ์ควิเทชัน [73] ส่งผลให้โปรตีนที่มีมากในกากมะเขือเทศถูกปลดปล่อยออกมาได้มากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงในการสกัดโปรตีนจากสาหร่ายทะเล *Ascophyllum nodosum* พบว่าสามารถสกัดโปรตีนได้ร้อยละ 3.18 [74] แสดงให้เห็นว่าการเอนไซม์ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงสามารถสกัดโปรตีนออกมาได้มาก

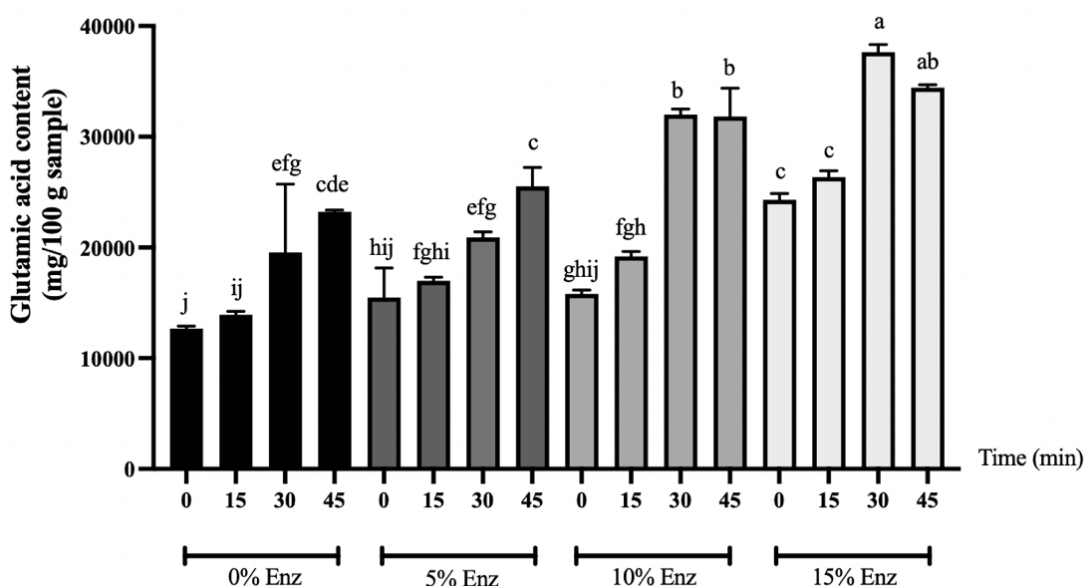


a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ภาพที่ 4- 2 ปริมาณโปรตีนของสารสกัดจากกากมะเขือเทศด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง

4.5 ปริมาณกรดกลูตามิก

ผลจากการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูตามิก พบว่าที่สภาวะความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 30 นาที พบกรดกลูตามิกมากที่สุด เท่ากับ 37.656 กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ซึ่งไม่แตกต่างกับที่ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 45 นาที เท่ากับ 34.438 กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง (ภาพที่ 4-3) เมื่อเพิ่มความเข้มข้น และระยะเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นพบว่ามีกรดกลูตามิกออกมามาก เมื่อเทียบกับความเข้มข้นน้อย เวลาในการสกัดน้อย ดังนั้นความเข้มข้นและระยะเวลาในการสกัดมีผลต่อปริมาณกรดกลูตามิกที่เกิดขึ้น เนื่องจากโบรมิเลน ซึ่งเป็นเอนไซม์โปรตีนสามารถตัดสายโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโน [75] ซึ่งจุดตัดพันธะเพปไทด์ของโบรมิเลน คือบริเวณไลซีน อะลานีน ไทโรซีน และไกลซีน [33] และการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงอาจทำให้เกิดปรากฏการณ์คาวีเทชัน ส่งผลให้ผนังเซลล์ถูกทำลาย โปรตีนและสารสำคัญต่าง ๆ จึงถูกสกัดออกมาได้มาก งานวิจัยของ Ali, et al. (2020). พบว่ากากมะเขือเทศมีปริมาณกรดกลูตามิก 10.13 กรัมต่อ 100 กรัมโปรตีน [76] และยังมีงานวิจัยพบว่า การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงสามารถสกัดกรดกลูตามิกจากสาหร่ายทะเล *Ascophyllum nodosum* พบว่ามีกรดกลูตามิก 0.008 กรัมต่อกรัมตัวอย่าง ดังนั้นเห็นได้ว่าเมื่อโบรมิเลนทำงานร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงอาจทำให้สกัดกรดกลูตามิกออกมาได้มากขึ้น และมากกว่ากากมะเขือเทศ

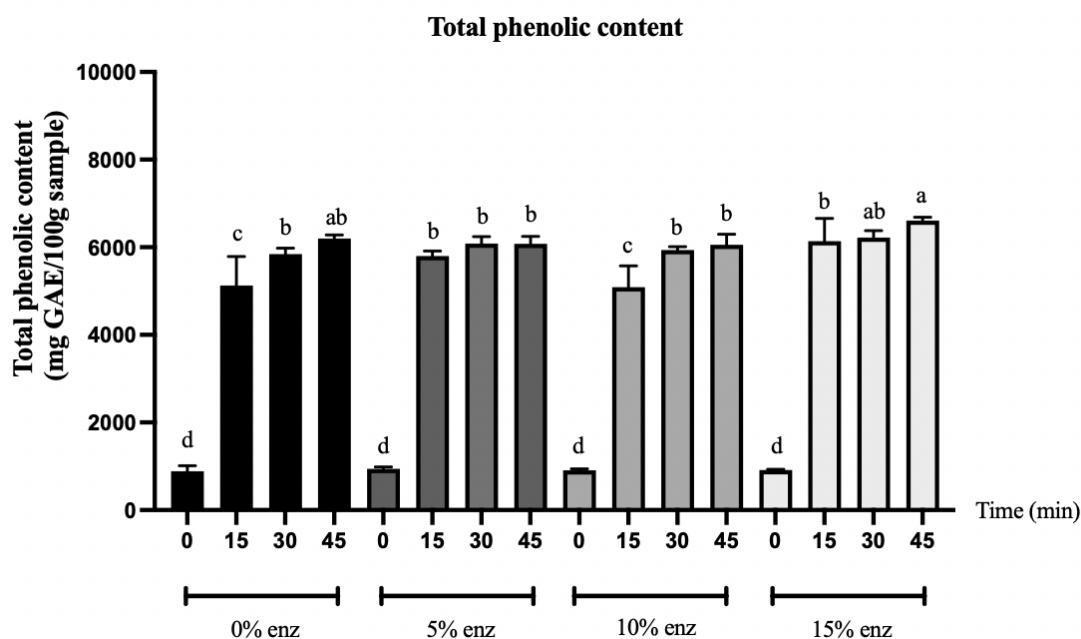


a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ภาพที่ 4- 3 ปริมาณกรดกลูตามิกของสารสกัดจากกากมะเขือเทศด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง

4.6 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

ผลการศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากกากมะเขือเทศ พบว่าการใช้โบรมิเลนในการสกัดไม่ส่งผลต่อการสกัดสารฟีนอลิกจากกากมะเขือเทศ แต่คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารฟีนอลิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 30 และ 45 นาที ให้ปริมาณฟีนอลิกออกมามากถึง 6608.33 และ 6223.28 mg GAE/100g ตามลำดับ ในขณะที่ที่เวลา 0 นาที เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์จาก 0 เป็นร้อยละ 5, 10 และ 15 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 886.52, 943.60, 913.30 และ 918.24 mg GAE/100g ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4-4) เนื่องมาจากที่เวลา 0 นาทีสารฟีนอลิกทั้งหมดอาจยังไม่ถูกปลดปล่อยออกมา และขณะที่เวลาในการสกัดเพิ่มมากขึ้น พบว่ามีสารฟีนอลิกออกมามากขึ้น ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากสารฟีนอลิกสามารถละลายน้ำได้ดี การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงและเพิ่มระยะเวลามากขึ้น ทำให้ปริมาณสารฟีนอลิกเพิ่มขึ้นด้วย สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานว่าคลื่นเสียงความถี่สูงสามารถสกัดการฟีนอลิกออกมาได้ [13] และสอดคล้องกับงานวิจัยพบว่าคลื่นเสียงความถี่สูงสามารถสกัดฟีนอลิกทั้งหมดจากดอกไม้ลูกโป่งได้เท่ากับ 284 mg GAE/100g [15] ในกรณีของโบรมิเลนซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอส ทำหน้าที่หลักในการย่อยโปรตีน ในขณะที่ทำการย่อยสลายโปรตีนออกมาจากกากมะเขือเทศ อาจทำให้เกิดการตัดโปรตีนที่ทำพันธะกับสารฟีนอลิกออกมาด้วยบางส่วนได้ ส่งผลให้ปริมาณสารฟีนอลิกเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามสารฟีนอลิกอยู่ที่ผนังเซลล์ โดยมีเอนไซม์ที่สามารถตัดเซลล์ูโลสซึ่งเป็นผนังเซลล์ได้ เช่น cellulase และ pectinase เป็นต้น มีงานวิจัยพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เพคติเนสที่อุณหภูมิ 50°C ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากคำแดง พบว่ามีฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 386.58 mg GAE/g DW [72] ดังนั้นเมื่อโบรมิเลนทำงานร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงที่ระยะเวลาเพิ่มขึ้นอาจทำให้ฟีนอลิกสูงขึ้น

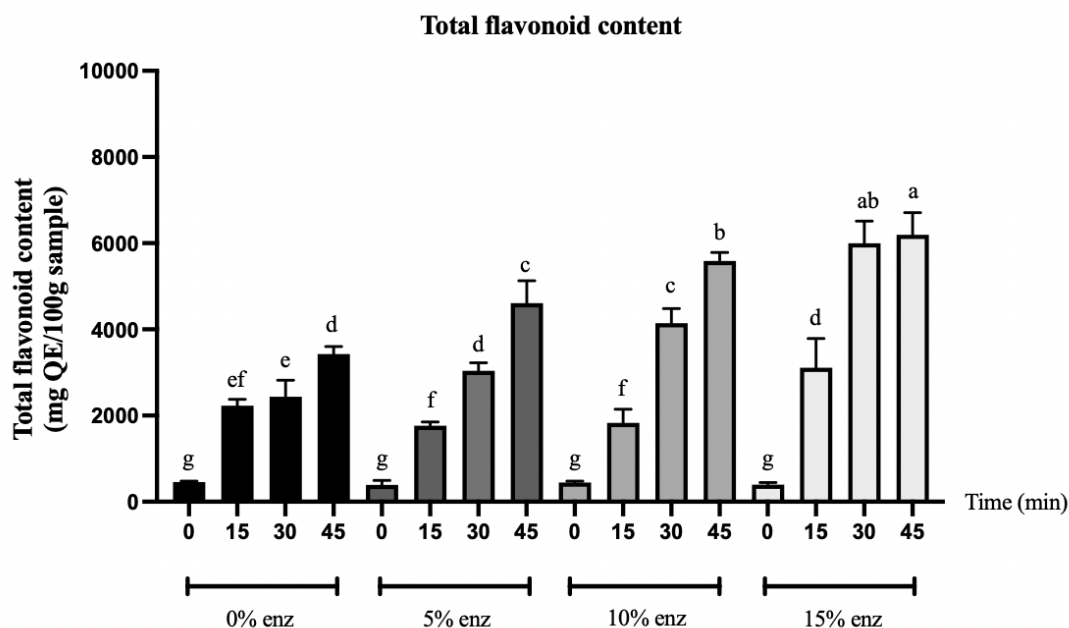


a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ภาพที่ 4- 4 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากกากมะเขือเทศด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง

4.7 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ผลจากการศึกษาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดพบว่าที่ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 30 และ 45 นาที ให้ปริมาณฟลาโวนอยด์ออกมามากถึง 5996.12 ± 422.43 และ 6195.14 ± 420.00 mg QE/100g ตามลำดับ (ภาพที่ 4-5) ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด มีงานวิจัยที่พบว่าคลื่นเสียงความถี่สูงสามารถสกัดสารฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากชุมเห็ดเทศได้เท่ากับ 26.91 ± 0.43 mg GAE/g DW และ 86.69 ± 1.67 mg QE/g DW ตามลำดับ [77] สอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่า สารสกัดจากดอกไม้ลูกโป่งที่ใช้เทคนิคการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับเทคนิคฟริชตราย พบว่า มีฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 2.11 mg RE/g [15] และมีงานวิจัยพบว่า มะเขือเทศแต่ละสายพันธุ์มีปริมาณฟลาโวนอยด์ไม่เท่ากัน โดยส่วนมาก ฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในมะเขือเทศทุกสายพันธุ์มักเป็น chalconaringenin, kaempferol 3-rutinoside และ quercetin 3-rutinoside (rutin) [78]



a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ภาพที่ 4- 5 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากกากมะเขือเทศด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง

4.8 ชนิดและปริมาณสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทุกสภาวะด้วยเทคนิค High performance Liquid Chromatography (HPLC) พบสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ 7 ชนิด คือ กรดแกลลิก กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดคูมาริก กรดไซรินจิก กรดเฟอร์ูลิก กรดไฮดรอกซีซินนามิก รุติน และนารินจิน โดยที่ความเข้มข้นเอนไซม์ 15% เวลาในการสกัด 45 นาที กรดแกลลิก กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดคูมาริก กรดไซรินจิก กรดเฟอร์ูลิก กรดไฮดรอกซีซินนามิก รุติน และนารินจินในปริมาณที่สูง เท่ากับ 540.63, 28.56, 232.02, 375.41, 26.92, 7.68, 65.85 และ 5247.86 mg/100g ตามลำดับ (ตารางที่ 4-2) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อระยะเวลาในการสกัดนานขึ้นจะมีประสิทธิภาพในการสกัดมากกว่าที่เวลาน้อย ๆ นอกจากนี้ ระยะเวลาในการสกัดมีผลต่อปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่พบโดยที่เวลาในการสกัด 15, 30 และ 45 นาที พบว่ามีปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นตามลำดับ พบกรดแกลลิกและรุตินในสภาวะเอนไซม์ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง ในทุกสภาวะการสกัด โดยเฉพาะสภาวะที่ใช้เวลาในการสกัด 30 และ 45 นาที แสดงให้เห็นว่าเวลาในการสกัดมีอิทธิพลมากกว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ ในการสกัดสารฟีนอลิกจากกากมะเขือเทศ มีงานวิจัยพบว่าการสกัด

สารสำคัญจากมะเขือเทศด้วยเทคนิค UAE ร่วมพบว่ามีกรดคลอโรจีนิก และรูตินออกมามาก [52] ซึ่งอาจส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกิดขึ้นในการทดลองต่อไป สอดคล้องกับการทดลองของ Vallverdú., et al. (2012) ที่พบว่าในมะเขือเทศมี ferulic acid, chlorogenic acid, caffeic acid และ rutin ซึ่งมีส่วนช่วยในการต้านอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ในการลดการอักเสบ [79] [23]

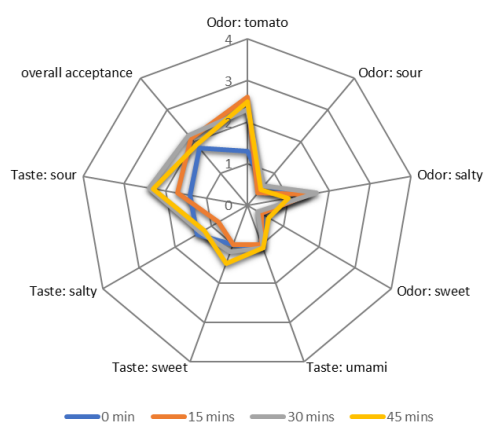


ตารางที่ 4-2 ชนิดและปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากมะเขือเทศ

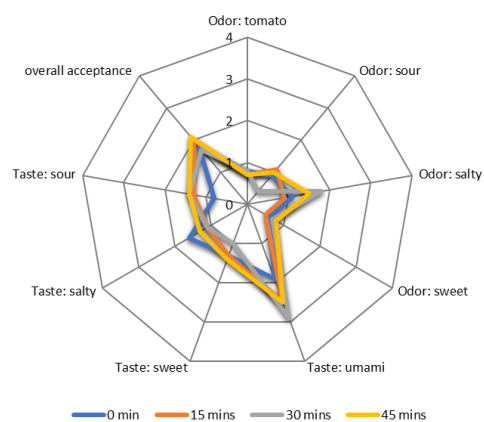
Compounds	Phenolic compounds and Flavonoid compounds (mg/100g)															
	0% Enz				5% Enz				10% Enz				15% Enz			
	0 min	15 min	30 min	45 min	0 min	15 min	30 min	45 min	0 min	15 min	30 min	45 min	0 min	15 min	30 min	45 min
Gallic acid	100.00	94.90	136.51	165.77	132.65	159.11	264.30	336.27	135.27	175.33	319.05	495.06	197.65	226.82	413.26	540.63
Chlorogenic acid	-	14.04	22.99	25.59	-	27.17	34.34	25.23	-	18.57	31.69	30.26	-	23.20	28.33	28.56
Caffeic acid	-	259.29	185.90	312.99	-	236.66	144.89	102.66	-	119.61	162.79	187.98	-	209.38	88.83	232.02
p-Coumaric acid	-	-	-	-	-	119.86	167.70	196.07	-	241.18	149.87	95.31	-	259.55	224.81	375.41
Ferulic acid	-	53.07	21.69	14.25	-	36.91	21.62	13.11	-	33.40	42.23	28.46	-	44.79	114.09	26.92
2-Hydroxycinnamic acid	-	4.78	2.19	15.08	-	5.20	3.37	3.34	-	3.09	3.92	2.50	-	5.37	6.84	7.68
Rutin	251.85	90.51	187.68	85.07	150.15	72.15	71.39	62.54	156.15	61.47	72.51	73.07	129.05	68.59	64.47	65.85
Naringin	-	3840.87	1451.44	2076.0	-	1889.78	1512.75	619.00	-	3025.49	4418.69	5324.50	-	1730.38	8256.49	5247.86

4.9 การยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสด้านการรับรสชาติ

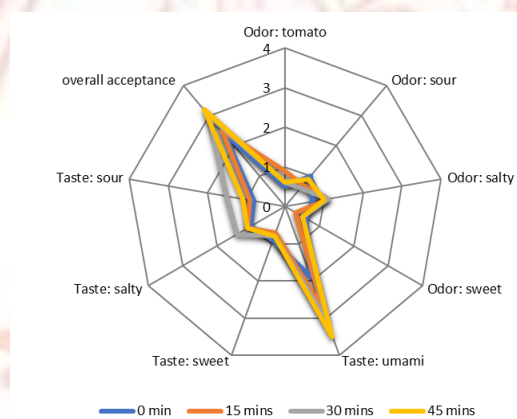
ผลจากการศึกษาการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสด้านการรับรสชาติของสารสกัดจากกากมะเขือเทศด้วยโบรมิเลนร่วมกับกลิ่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE) พบว่าสารสกัดจากทุกสภาวะที่สกัดด้วย enz + UAE มีลักษณะกลิ่นมะเขือเทศ กลิ่นตั้มยำ กลิ่นคาว กลิ่นเปรี้ยว และรสชาติขม รสหวาน รสเค็ม รสเปรี้ยว และรสอูมามิ โดยเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการสกัดมากขึ้น สารสกัดจากกากมะเขือเทศที่ได้ มีรสเปรี้ยวน้อยลง มีรสชาติอูมามิเพิ่มมากขึ้น และมีการยอมรับโดยรวมที่สูงขึ้น (ภาพที่ 4-6) โดยสภาวะเริ่มต้นที่สกัด enz + UAE ที่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 0 เวลาในการสกัด 0 นาที สารสกัดมีคะแนนด้านรสเปรี้ยว รสอูมามิ และการยอมรับโดยรวม เท่ากับ 1.4, 1.1 และ 1.8 ตามลำดับ สารสกัดจากกากมะเขือเทศที่ได้จากสภาวะการสกัดด้วย enz + UAE ที่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 30 นาที มีคะแนนด้านรสเปรี้ยว รสอูมามิ และการยอมรับโดยรวม เท่ากับ 0.9, 3.4 และ 3.3 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกับสภาวะการสกัดด้วย enz + UAE ที่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 45 นาที ซึ่งสอดคล้องกับผลของปริมาณร้อยละผลผลิตที่เมื่อปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาถึงจุด product inhibition การทำงานของเอนไซม์จะถูกจำกัด ส่งผลให้ไม่สามารถทำงานต่อได้ ทำให้เกิดขึ้นคงที่ ซึ่งจากผลการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสทั้งหมดทุกสภาวะการสกัด สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดจากกากมะเขือเทศด้วยโบรมิเลนร่วมกับกลิ่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE) ที่ปริมาณความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 30 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัด เนื่องจากสารสกัดที่ได้ให้คะแนนด้านรสชาติอูมามิ และการยอมรับโดยรวมสูง อีกทั้งมีคะแนนด้านกลิ่นเปรี้ยว รสเปรี้ยวต่ำ เมื่อเทียบกับสภาวะอื่น ๆ และจากกากมะเขือเทศเริ่มต้น สัมพันธ์กับปริมาณกรดกลูตามิก ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ให้รสอูมามิ หรือ รสอร่อย [42] และพบว่าที่ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 30 นาที มีปริมาณกรดกลูตามิกมากที่สุด เท่ากับ 37.65 g/100g จึงทำให้ที่สภาวะเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 30 นาที เป็นสภาวะที่ให้รสอูมามิหรือรสอร่อยมากที่สุด



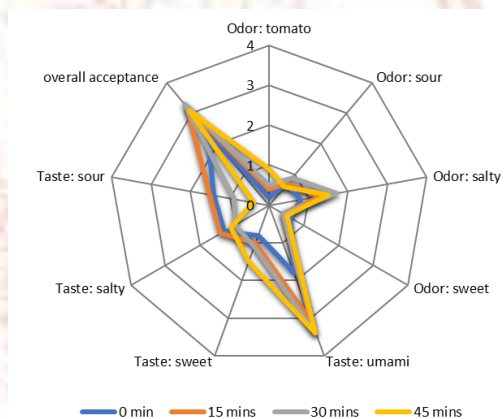
(a)



(b)



(c)



(d)

ภาพที่ 4- 6 คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของกากมะเขือเทศที่สกัดด้วยเอนไซม์ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE) ที่ความเข้มข้นเอนไซม์ (a) ร้อยละ 0 (b) ร้อยละ 5 (c) ร้อยละ 10 และ (d) ร้อยละ 15

4.10 วิเคราะห์องค์ประกอบสารให้กลิ่นรส (Volatile compound)

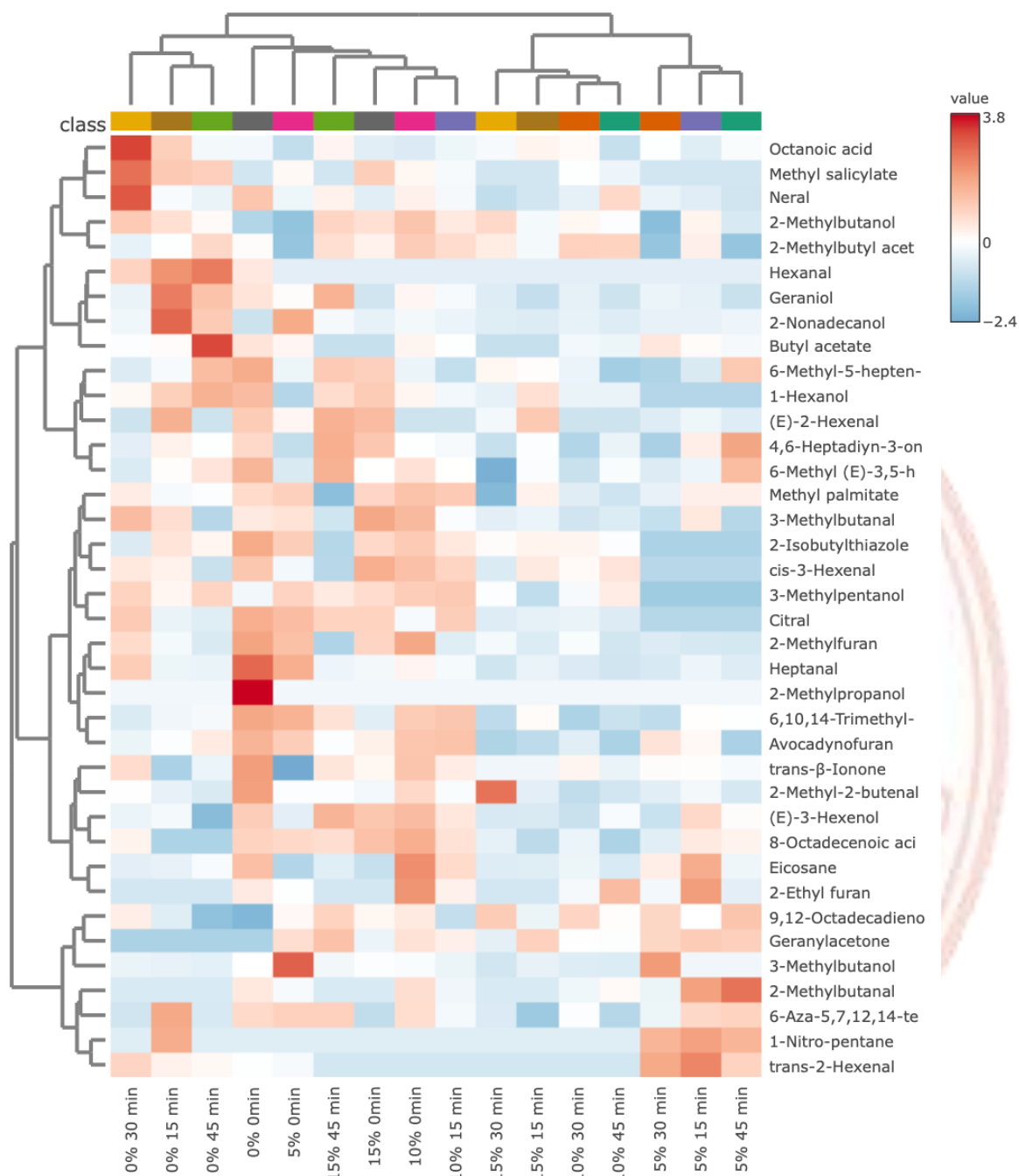
ผลจากการศึกษาองค์ประกอบสารให้กลิ่นรสพบว่าสารให้กลิ่นรสที่ได้จากทุกสภาวะ จำแนกองค์ประกอบของสารให้กลิ่นรสออกเป็น 9 กลุ่มที่แตกต่างกันตามหมู่ฟังก์ชัน ได้แก่ terpene, aldehyde, ester, furan, alcohol, alkane, thiazole, และ carboxylic acid (ตารางที่ 4-3) สารให้กลิ่นรสหลักที่พบในสารสกัดมะเขือเทศ ได้แก่ 1-nitro-pentane, 2-nonadecanol, methyl palmitate, 6-methyl (e)-3,5-heptadein-2-one, geranylacetone, avocadofuran, 6-aza-5,7,12,14-tetrathiapentacene, 9,12-octadecadienoic acid (z,z)-methyl ester, และ cis-3-hexenal ซึ่งมีค่า relative peak area เท่ากับร้อยละ 7.00, 6.58, 6.32, 5.95, 5.05, 4.64, 4.41, 4.40, และ 4.30 ตามลำดับ สาร cis-3-hexenal, hexanal, trans-2-hexenal และ acetone ให้กลิ่นรสหลักของกลิ่นมะเขือเทศ [80] มักพบในส่วนเปลือกชั้นในและเมล็ดของมะเขือเทศ [81] สาร 2-methylbutyl acetate เป็นสารที่พบมากในมะเขือเทศเช่นกัน [82] ดังนั้นการที่มีสารประกอบดังกล่าวมากในตัวอย่างกากมะเขือเทศเริ่มต้น สามารถเป็นตัวบ่งชี้ (key compounds) ได้ถึงการให้กลิ่นรสมะเขือเทศในตัวอย่างทดลอง และเมื่อติดตามสารที่เป็นตัวบ่งชี้กลิ่นมะเขือเทศในตัวอย่างของสารสกัดจากกากมะเขือเทศโดยใช้เอนไซม์ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง พบว่าสารให้กลิ่นรสส่วนมากที่พบในสารสกัดมะเขือเทศเจือจางลงเมื่อเทียบกับกากมะเขือเทศเริ่มต้น แสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์และคลื่นเสียงความถี่สูงในการสกัดไม่สามารถสกัดสารให้กลิ่นรสจากเนื้อเยื่อมะเขือเทศออกมาได้ โดยสารให้กลิ่นรสเหล่านี้อยู่ในเนื้อเยื่อในเปลือกชั้นใน [81] ที่เกิดจากการสร้างขึ้นมาโดยการสังเคราะห์ภายในเซลล์ โดยเกิดจากเมแทบอลิซึมของสารชีวเคมี เช่น อนุพันธ์ของกรดอะมิโน อนุพันธ์ของฟีนอลอะลานีน อนุพันธ์ของกรดไขมัน และอนุพันธ์ของแคโรทีนอยด์ และอยู่ในโครงสร้างของเซลลูโลส หรือโมเลกุลอื่น ๆ ภายในเปลือกชั้นใน ซึ่งโบรมิเลนไม่สามารถเข้าไปตัดได้ จากงานวิจัยก่อนหน้าพบสาร cis-3-hexenal, 1-nitro-peptene, 2-nonadecanol, 6-methyl-5-hepten-2-one, และ geranylacetone ในเปลือกชั้นในของมะเขือเทศ และมีระดับความเข้มข้นของกลิ่นที่สามารถรับรู้ได้ต่ำ (threshold) ดังนั้นสามารถรับรู้ถึงกลิ่นมะเขือเทศได้ที่ความเข้มข้นต่ำ ซึ่งเป็นข้อดีของการสกัดด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง ที่ค้นพบว่าการใช้เทคนิคนี้สามารถเจือจางสาร hexanal และ 2-isobutylthiazole ซึ่งเป็นกลิ่นเขียวของมะเขือเทศ [80] ที่เป็นกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ของผู้บริโภคที่ไม่นิยมรับประทานมะเขือเทศ เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของเอนไซม์ เวลาในการสกัด ต่อปริมาณของสารให้กลิ่นรสแต่ละชนิดด้วยวิธีทางสถิติ แสดงความสัมพันธ์เป็นแบบแผนที่ความร้อน (heat map) แสดงให้เห็นชัดเจนว่าเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ระยะเวลาในการสกัดมากขึ้น สีของแผนที่ความร้อนค่อย ๆ เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีฟ้า (ภาพที่ 4-7) โดยเฉพาะสาร hexanal และ 2-isobutylthiazole ซึ่งเป็นกลิ่นหลักของมะเขือเทศ [83] มีปริมาณลดลงอย่างชัดเจน

สอดคล้องกับผลการทดสอบประสาธน์สัมพันธ์ทางด้านกลิ่นและรสชาติที่พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ
โบรมิเลนและระยะเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น พบว่ากลิ่นเขียวและกลิ่นมะเขือเทศจางลง



ตารางที่ 4- 3 ตารางแสดงชนิดของสารให้กลิ่นรสในสารสกัดมะเขือเทศ

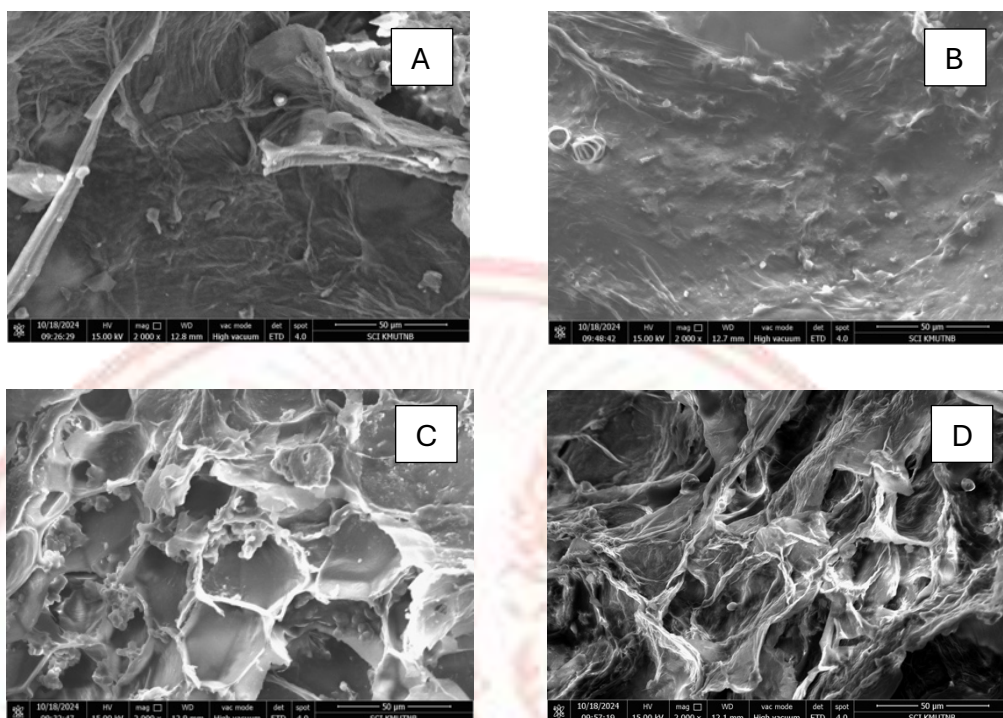
No	Volatile compounds	Odor description	R ^a	Tomato paste		Area (x10 ³)															
				Area	R ^a *	0% Enz				5% Enz				10% Enz				15% Enz			
						0 min	15 min	30 min	45 min	0 min	15 min	30 min	45 min	0 min	15 min	30 min	45 min	0 min	15 min	30 min	45 min
Terpenes																					
1	6-oxa-5,7,12,14-tetrahydropentalene	Fruit, promarginate	1613	19.10	4.41	12.60	14.20	10.10	10.30	12.90	12.70	10.90	12.80	12.50	11.10	11.30	9.39	9.69	8.75	10.40	12.90
2	Citral	Lemon	1750	11.10	2.55	15.90	5.53	13.00	4.67	14.40	-	-	-	6.70	12.60	5.55	4.39	12.00	4.55	12.00	
3	Geranylacetone	Sweet, floral, estery	1872	21.90	5.05	-	-	-	-	8.20	9.51	8.71	9.20	7.91	6.88	5.75	5.67	4.65	9.15	4.15	10.20
4	Geraniol	Rose, geranium	1959	4.30	0.99	3.41	5.26	2.53	4.09	2.94	2.45	2.54	1.97	3.06	2.74	2.44	2.03	2.10	1.88	2.34	4.41
Aldehydes																					
5	(E)-2-Hexenal	Apple, green leaf	1233	7.17	1.65	6.17	7.91	-	-	3.49	2.02	1.22	1.17	-	-	-	-	7.19	6.38	2.27	7.83
6	3-Methylbutanal	Malt	1290	13.80	3.18	6.17	6.56	7.71	3.45	6.40	6.23	3.82	3.41	7.78	5.33	4.17	4.49	8.36	4.94	4.68	4.13
7	2-Methylbutanal	Cocoa, almond, malt	1392	1.47	0.34	0.999	-	-	-	0.492	2.16	0.352	2.75	1.16	0.398	0.403	0.698	-	-	-	-
8	2-Methyl-2-butanol	Green, fruit	1510	2.90	0.67	3.45	2.26	2.48	2.13	2.44	2.36	2.21	2.10	2.87	2.42	1.92	2.07	2.35	2.22	3.81	2.43
9	cis-3-Hexenal	Leafy, green	1533	18.60	4.30	12.10	7.74	8.67	1.68	5.31	-	-	-	-	12.70	7.00	9.13	14.50	8.56	3.25	-
10	Hexenal	Grass, tallow, fat	1539	8.46	1.95	4.46	10.70	6.09	12.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	trans-2-Hexenal	Green, leafy	1572	11.20	2.58	1.18	1.59	2.40	1.41	1.02	4.42	3.63	2.48	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Heptanal	Fat, citrus, ancid	1641	6.63	1.53	8.55	3.44	5.68	3.33	6.70	3.47	2.81	3.02	4.33	3.69	2.91	2.60	3.61	3.35	2.58	3.47
13	Nonal	Lemon	1699	6.64	1.53	7.46	5.48	10.20	5.06	5.21	4.86	5.08	4.41	6.10	5.39	4.95	6.84	4.88	4.47	4.04	6.06
Esters																					
14	Butyl acetate	Pear	1522	5.82	1.34	4.14	3.00	2.63	10.60	3.25	3.02	4.01	2.38	3.32	2.73	2.24	2.05	-	-	-	-
15	2-Methylbutyl acetate	Fruit	1652	4.94	1.14	4.25	4.04	3.32	5.66	-	4.68	-	-	6.10	5.50	5.88	5.81	4.62	3.76	4.87	5.38
16	Methyl laurate	Fat, coconut	1816	1.68	0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Methyl salicylate	Peppermint	1865	1.22	0.28	2.26	8.96	16.00	8.46	4.44	-	-	-	-	4.82	3.35	3.91	2.69	8.50	-	-
18	Methyl palmitate	Oily, fatty	2436	27.40	6.32	10.30	7.44	9.15	7.74	11.00	8.93	6.68	8.94	11.90	11.40	6.27	5.27	10.60	8.82	1.32	1.74
19	8-Octadecenoic acid, methyl ester	-	2838	8.96	2.07	3.92	1.75	3.32	1.75	3.82	3.49	2.60	3.31	4.64	3.65	2.75	1.75	4.28	1.99	2.67	3.72
20	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z), methyl ester	-	2932	19.1	4.40	-	10.8	16.6	2.03	15.2	14.3	19.7	22.2	17.1	7.61	19.8	14.6	15.4	12.2	21.2	20.1
Furans																					
21	2-Methylfuran	Chocolate	1107	6.88	1.59	3.39	2.25	2.77	2.00	3.07	1.96	2.03	1.95	3.35	2.06	2.30	1.92	2.83	2.02	2.25	1.60
22	2-Ethyl furan	Rum, coffee and chocolate	1223	6.15	1.42	3.62	-	-	-	2.28	8.22	1.70	0.909	8.54	3.20	1.84	6.42	-	-	-	-
23	Acetophenone	-	2095	20.10	4.64	17.10	11.70	10.80	13.30	15.30	12.40	13.80	6.93	15.90	16.10	10.20	7.05	12.90	8.09	7.24	11.70
Alcohols																					
24	2-Methylpropanol	Alcoholic, grassy, sweet	1256	6.15	1.42	1.97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	1-Hexanol	flower, green, resin	1375	1.25	0.29	2.74	2.35	1.55	2.94	-	-	-	-	1.61	1.21	1.07	1.08	2.42	2.03	1.01	2.10
26	(E)-3-Hexanol	Moss, fresh, mushroom	1406	1.73	0.40	2.23	1.43	1.33	-	1.23	2.09	0.940	1.60	2.48	1.88	0.926	1.47	2.33	1.12	1.10	2.59
27	3-Methylbutanol	Whiskey, malt, burnt	1444	2.86	0.54	1.34	0.856	0.912	0.808	4.57	1.03	3.60	1.03	1.22	0.969	0.712	1.28	0.858	0.658	1.07	-
28	2-Methylbutanol	Malt, wine, onion	1456	6.80	1.57	1.32	3.49	3.99	2.92	0.754	3.04	0.603	2.02	4.14	3.28	2.98	2.73	3.49	2.59	3.65	3.72
29	3-Methylpentanol	Pungent	1567	15.70	3.62	3.52	4.55	6.15	6.14	6.19	-	-	-	6.47	6.65	3.76	4.96	5.79	1.58	5.10	-
30	2-Nonadecanol	Oily rather fruity	1907	28.50	6.58	-	9.59	1.81	5.23	6.94	1.46	1.44	1.70	1.93	1.58	1.42	1.01	1.42	0.977	1.09	2.02
Ketones																					
31	6-Methyl (E)-3,5-heptadien-2-one	Sweet, cinnamon, coconut	1351	6.51	1.50	7.68	6.06	5.31	6.63	5.28	5.68	5.36	7.52	6.68	6.03	4.97	5.90	6.03	5.93	3.51	7.76
32	4,6-Heptadien-3-one	-	1674	17.60	4.07	16.10	14.70	12.70	13.90	11.20	14.90	10.10	18.80	13.90	13.60	10.50	13.00	17.00	13.80	11.40	18.30
33	6-Methyl-5-hepten-2-one	Fruity, floral	1785	25.80	5.95	26.50	17.20	15.50	23.20	16.60	15.20	12.40	22.20	16.50	13.70	14.50	11.70	21.60	18.00	18.50	22.10
34	trans-β-ionone	Cedar wood	1959	9.32	2.15	8.16	2.09	5.93	4.03	-	4.72	4.77	4.39	6.81	5.31	5.00	3.99	4.95	4.18	4.18	5.56
35	6,10,14-Trimethyl-5,9,13-pentadecatrien-2-one	Intensely sweet, floral	2722	14.4	3.31	13.2	9.59	8.93	9.74	12.8	10.1	8.10	10.0	11.9	12.1	7.58	8.43	9.17	10.2	8.04	11.1
Alkanes																					
36	1-Nitro-pentane	Pleasant, fruity	1763	30.40	7.00	-	11.60	-	-	-	12.50	10.90	10.90	-	-	-	-	-	-	-	-
37	Eicosane	Allane	1899	10.70	2.47	19.20	6.93	6.46	8.96	21.0288	21.80	12.30	7.93	25.40	15.10	7.68	5.18	3.12	6.15	5.91	6.29
Thiazole																					
38	2-isobutylthiazole	Tomato leafy, green	1829	16.10	3.71	16.60	10.40	4.46	8.59	12.90	-	-	-	13.20	10.10	8.73	7.28	11.80	8.84	7.95	1.07
Carboxylic acid																					
39	Oxanoic acid	Sweet, cheese	2198	4.86	1.12	4.12	5.43	7.87	4.15	3.22	3.79	4.33	4.26	3.70	4.06	4.50	3.32	3.82	4.62	4.20	4.61



ภาพที่ 4- 7 แผนที่ความร้อนแสดงความสัมพันธ์ของสภาวะการสกัดด้วยเอนไซม์ร่วมกับคลื่นเสียง
ความถี่สูงต่อปริมาณสารให้กลิ่นรสในสารสกัดจากกากมะเขือเทศ

4.11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) ของกากมะเขือเทศหลังจากย่อยด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง

จากการวิเคราะห์การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกากมะเขือเทศแห้ง (TP) (ภาพที่ 4-8A) กากมะเขือเทศที่ย่อยด้วยเอนไซม์เพียงอย่างเดียว (Enz) (ภาพที่ 4-8B) และ กากมะเขือเทศที่ย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE) (ภาพที่ 4-8C) พบว่า ที่กำลังขยาย 2000x กากมะเขือเทศที่ย่อยด้วยเอนไซม์เพียงอย่างเดียว (Enz) มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่ต่างจากกากมะเขือเทศแห้ง (TP) แต่กากมะเขือเทศที่ย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงพบว่าที่ กำลังขยาย 2000x เห็นได้ชัดว่าเนื้อเยื่อของกากมะเขือเทศเกิดการถูกทำลาย มีลักษณะฉีกขาด เช่นเดียวกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงอย่างเดียว (ภาพที่ 4-8D) อาจเนื่องมาจากปรากฏการณ์คาวิเทชัน ทำให้สารสำคัญในกากมะเขือเทศถูกปลดปล่อยออกมาได้มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ [84] ที่รายงานว่ากากมะเขือเทศที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงทำให้โครงสร้างมีความเป็นรูพรุนมากขึ้น และพบว่าเมล็ดมะเขือเทศที่ถูกสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงทำให้โครงสร้างมีความเป็นรูพรุนและทำให้สารประกอบฟีนอลิกออกมามากขึ้น [85] ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในหัวข้อก่อนหน้าที่แสดงถึงอิทธิพลของเวลาในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก แต่ผลการศึกษ ปริมาณกรดกลูตามิกยังไม่มีรายงานมาก่อน แต่จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้ในหัวข้อก่อนหน้าพบว่าปริมาณเอนไซม์และเวลาในการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง พบปริมาณสาร กลูตามิกและฟีนอลิกสูง ซึ่งอาจสรุปได้ว่าเมื่อโครงสร้างของเนื้อเยื่อกากมะเขือเทศถูกทำลาย โอกาสในการที่โบรมิเลนจะสามารถเข้าไปตัดโปรตีนภายในสายเพปไทด์มีมาก จึงส่งผลให้ตรวจพบปริมาณกรดกลูตามิกในปริมาณสูง และพบฟีนอลิกออกมาเนื่องจากผลของ cavitation แต่ในทางกลับกันเมื่อไม่มีคลื่นเสียงความถี่สูง โครงสร้างของเนื้อเยื่อไม่ถูกทำลาย โบรมิเลนไม่สามารถเข้าไปตัดโปรตีนภายในเนื้อเยื่อของมะเขือเทศได้ ดังนั้นจึงส่งผลให้ปริมาณกรดกลูตามิกที่พบน้อยกว่า ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้นที่กล่าวมาแล้ว



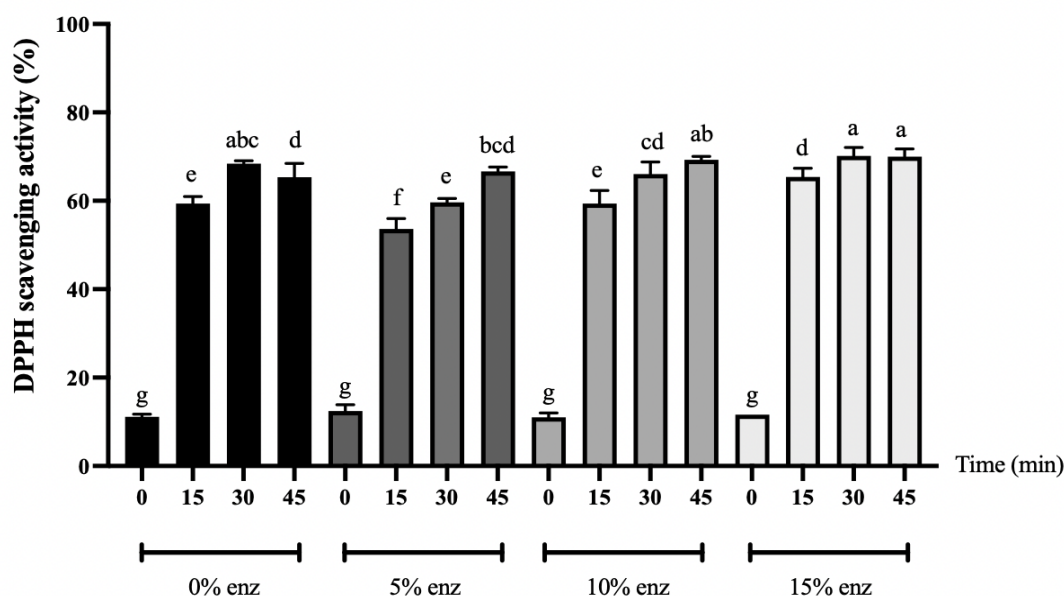
ภาพที่ 4- 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกากมะเขือเทศแห้ง (A) กากมะเขือเทศหลังจากย่อยด้วย เอนไซม์เพียงอย่างเดียว (B) กากมะเขือเทศที่ย่อยด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (C) และกากมะเขือเทศที่ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงอย่างเดียว (D) ที่กำลังขยาย 2000x

4.12 วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารเสริมรสจากกากมะเขือเทศ

4.12.1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH•

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH• พบว่าสารสกัดจากกากมะเขือเทศที่สกัดด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE) ที่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 0, 5, 10 และ 15 เวลาในการสกัด 0, 15, 30 และ 45 นาที มีร้อยละการยับยั้งสาร DPPH• อยู่ที่ 11.15-70.18 (ภาพที่ 4-9) โดยสารสกัดจากกากมะเขือเทศที่สกัดด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE) มีร้อยละการยับยั้งสาร DPPH• มากที่สุด ที่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 30 นาที รองลงมาคือ ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 45 นาที อยู่ที่ 70.18 และ 69.99 ตามลำดับ เห็นได้ว่าเมื่อภาวะการสกัดสารจากกากมะเขือเทศด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE) มีร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH• สูง โดยสถานะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดกากมะเขือเทศด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE) คือ ที่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ

15 เวลาในการสกัด 30 นาที ไม่ต่างในทางสถิติจากสภาวะเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 45 นาที เนื่องมาจากการสกัดด้วยโบรมิเลนร่วมดับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE) สามารถสกัดกรดกลูตามิกออกมาได้มาก ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่ากรดอะมิโนกรดกลูตามิก มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ เนื่องจากกรดกลูตามิกมีโครงสร้างโมเลกุลเป็น negatively charged ซึ่งสามารถแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ DPPH• โดยให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่ DPPH• และทำให้ปฏิกิริยาหยุดลงได้ กรดกลูตามิกจึงเป็นสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ [86] [87] มีรายงานพบว่าสารฟีนอลิกในมะเขือเทศมีผลต่อค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH• โดยมีค่า DPPH scavenging radical scavenging activity เท่ากับร้อยละ 35.7 โดยพบ chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric acid และ ferulic acid [23] สอดคล้องกับการสกัดสารจากมะเขือเทศโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงพบว่า มี chlorogenic acid เช่นเดียวกัน และมีค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH• SC_{50} เท่ากับ 1.36 mg/mL [52]

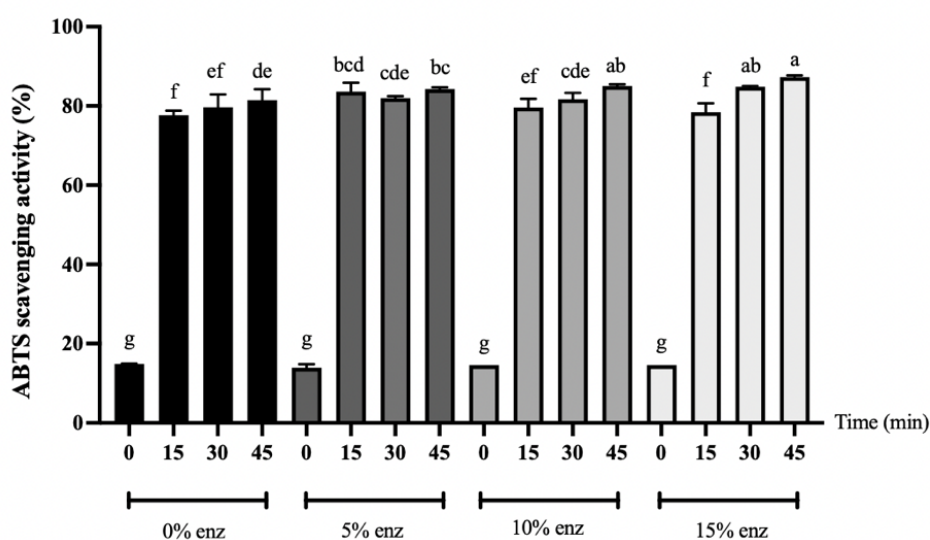


a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ภาพที่ 4- 9 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH• ของสารสกัดจากกากมะเขือเทศที่สกัดด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง

4.12.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย ABTS•+

ผลของการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย ABTS•+ พบว่า สารสกัดจากกากมะเขือเทศที่สกัดด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลีนเสียงความถี่สูง (enz + UAE) ที่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 0, 5, 10 และ 15 เวลาในการสกัด 0, 15, 30 และ 45 นาที มีร้อยละการยับยั้งสาร ABTS•+ อยู่ที่ 14.87-87.26 (ภาพที่ 4-10) สารสกัดจากกากมะเขือเทศที่สกัดด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลีนเสียงความถี่สูง (enz + UAE) ที่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 45 นาที มีร้อยละความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS•+ มากที่สุด ซึ่งไม่แตกต่างกับภาวะการสกัดด้วยโบรมิเลนร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 30 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS•+ เท่ากับร้อยละ 87.26 และ 84.82 ตามลำดับ จากผลการทดลองเห็นได้ว่าสารสกัดจากกากมะเขือเทศที่สกัดด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลีนเสียงความถี่สูง (enz + UAE) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS•+ สูง เนื่องจากการดกลูตามิกที่สกัดออกมาได้ สามารถให้อะตอมไฮโดรเจนไปจับกับอะตอมไนโตรเจนของ ABTS•+ ที่สูญเสียอิเล็กตรอนกลับมาอยู่ในภาพที่เสถียร หรืออาจเกิดจากลักษณะการสกัด เป็นการสกัดโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย โดยงานวิจัยของ อนุกุล บุญเลิศ (2561) กล่าวว่า สารสกัดที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด นอกจากนี้ อาจเกิดสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในมะเขือเทศที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงถูกสกัดออกมาด้วย เช่น กรดแกลลิก (gallic acid) กรดคลอโรจีนิค กรดคาเฟอิก ออกมา [79] จึงทำให้ทั้ง ABTS•+ และ DPPH• ของสารสกัดจากกากมะเขือเทศมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี

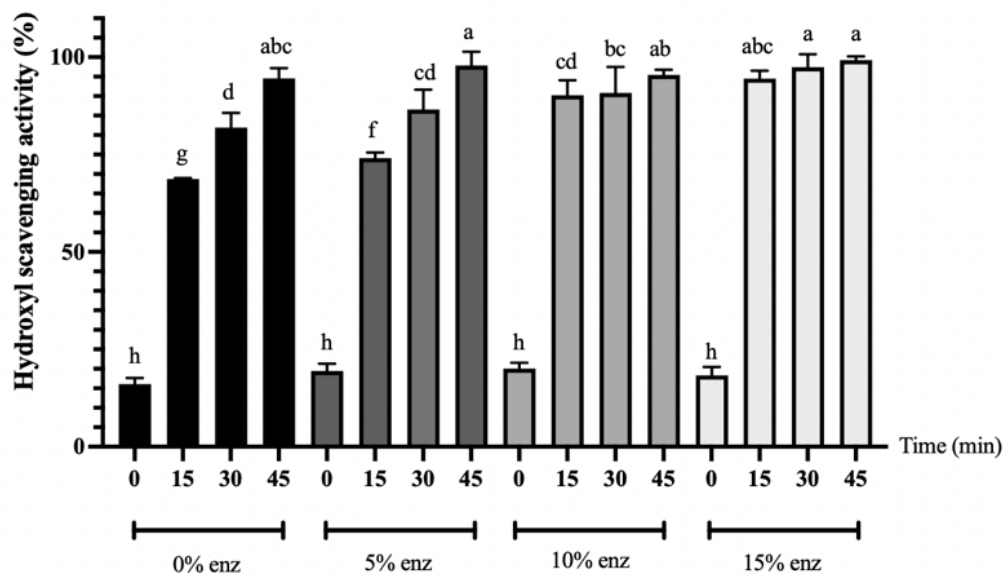


a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ภาพที่ 4- 10 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS•+ ของสารสกัดจากกากมะเขือเทศที่สกัดด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลีนเสียงความถี่สูง

4.12.3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Hydroxyl radical scavenging activity

จากผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Hydroxyl radical scavenging activity พบว่าสารสกัดจากกากมะเขือเทศที่สกัดด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE) ที่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 0, 5, 10 และ 15 เวลาในการสกัด 0, 15, 30 และ 45 นาที มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ hydroxyl อยู่ที่ 16.06-99.18 (ภาพที่ 4-11) โดยสารสกัดจากกากมะเขือเทศที่สกัดด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE) มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ Hydroxyl มากที่สุด ที่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 45 นาที รองลงมาคือปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 30 นาที อยู่ที่ 99.18 และ 97.38 ตามลำดับ เห็นได้ว่าเมื่อภาวะการสกัดสารจากกากมะเขือเทศด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE) มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ Hydroxyl สูง โดยสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดกากมะเขือเทศด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE) คือ ที่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 30 นาที ซึ่งไม่ต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากสภาวะเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 45 นาที โดยฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอาจเกิดจากกรดกลูตามิก กรดแอสพาร์ติก ที่พบในสารสกัดจำนวนมาก [21] นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่ออกมาในขั้นตอนการสกัด ได้แก่ กรดแกลลิก รูติน และนารินจีน อาจมีผลต่อประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ hydroxyl เช่นเดียวกัน [24] ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่พบสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในปริมาณที่สูง ส่งผลให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระ hydroxyl สูง



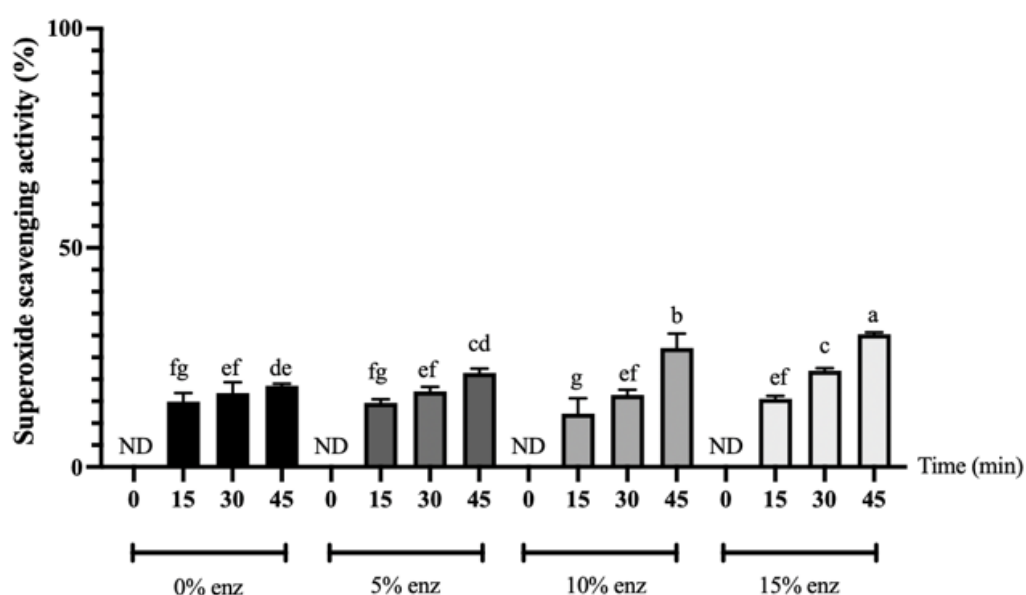
a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ภาพที่ 4- 11 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ hydroxyl ของสารสกัดจากกากมะเขือเทศที่สกัดด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง

4.12.4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Superoxide radical scavenging activity

จากผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี superoxide radical scavenging activity พบว่าสารสกัดจากกากมะเขือเทศที่สกัดด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE) ที่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 0, 5, 10 และ 15 เวลาในการสกัด 0, 15, 30 และ 45 นาที มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ superoxide อยู่ที่ 0-30.29 (ภาพที่ 4-12) โดยสารสกัดจากกากมะเขือเทศที่สกัดด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE) มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ superoxide มากที่สุด ที่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 45 นาที อยู่ที่ 30.29 รองลงมาคือ ที่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 30 นาที อยู่ที่ 21.94 เห็นได้ชัดว่าเวลาในการสกัด 0 นาที สารสกัดจากมะเขือเทศไม่สามารถต้านอนุมูลอิสระ superoxide ได้ อาจเป็นเพราะที่ระยะเวลา 0 นาที อาจมีสารสำคัญบางชนิดที่ละลายน้ำ หลุดออกมาได้ แต่มีปริมาณไม่มากพอที่จะออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ superoxide ได้ และเมื่อปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น ค่าการต้านอนุมูลอิสระ superoxide ก็เพิ่มขึ้นด้วย เช่นเดียวกับผลของ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี hydroxyl radical scavenging activity แต่ค่าการต้านอนุมูลอิสระ

superoxide น้อยกว่าค่าการต้านอนุมูลอิสระ hydroxyl อาจเนื่องมาจากผลของการต้านอนุมูลอิสระ superoxide สอดคล้องกับผลของปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยที่โบรมิเลนร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 45 นาที ให้ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 5996.12 mg QE/mL มีการศึกษาการทดสอบชนิดของฟลาโวนอยด์จากมัลเบอร์รี่ พบว่า มีรูตินเป็นองค์ประกอบหลัก และรูตินซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์ที่พบ ทำให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระ superoxide สูง [88]



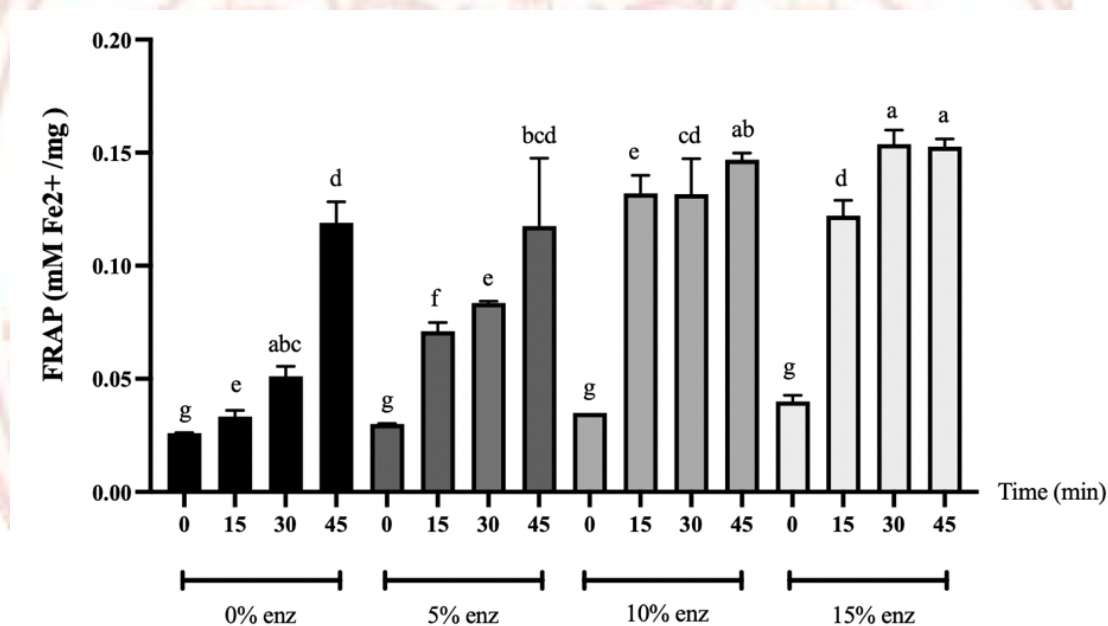
a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ภาพที่ 4- 12 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ superoxide ของสารสกัดจากกากมะเขือเทศที่สกัดด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง

4.12.5 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

ผลของการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP พบว่า สารสกัดจากกากมะเขือเทศที่สกัดด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE) ที่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 0, 5, 10 และ 15 เวลาในการสกัด 0, 15, 30 และ 45 นาที มีร้อยละการยับยั้งสาร ABTS•+ อยู่ที่ 0.026-0.254 mM Fe^{2+} /mg (ภาพที่ 4-13) สารสกัดจากกากมะเขือเทศที่สกัดด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (Enz + UAE) ที่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 30 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP มากที่สุด ซึ่งไม่แตกต่างกับสภาวะการสกัดด้วยโบรมิเลน

ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 45 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP เท่ากับ 0.254 และ 0.153 mM Fe²⁺/mg ตามลำดับ จากผลการทดลองเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ และระยะเวลาในการสกัด พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP มากขึ้น เนื่องจากฤทธิ์ การต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่เกิดจากปฏิกิริยารีดอกซ์ ซึ่งทำให้สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ทำหน้าที่เป็นรีดิวซ์ ให้ไฮโดรเจน และรับออกซิเจน นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกยังมีประสิทธิภาพ ในการจับโลหะ [89] ช่วยอนุมูลอิสระ FRAP ได้อย่างมีประสิทธิภาพ [90] การที่สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีโครงสร้างแบบวงแหวนคอนจูเกตและหมู่ไฮดรอกซิลทำให้สารประกอบฟีนอลิกสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีหมู่คาร์บอกซิลิกยับยั้งการเกิด ออกซิเดชันของไขมัน [91]



a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ภาพที่ 4- 13 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของสารสกัดจากกากมะเขือเทศที่สกัดด้วย ไบรไมเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง

4.13 การหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (response surface methodology, RSM)

ผลจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากกากมะเขือเทศด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง RSM ใช้การออกแบบการทดลอง 4x4 Factorial in Completely Randomized Design (CRD) โดยศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ ร้อยละความเข้มข้นของเอนไซม์ (X_1) เท่ากับ 0, 5, 10 และ 15 และระยะเวลาในการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (X_2) เท่ากับ 0, 15, 30 และ 45 นาที

ตารางที่ 4- 4 ตารางแสดงค่าโมเดล รีเกรสชันสำหรับร้อยละผลได้ (yield) ปริมาณกรดกลูตามิก (glutamic acid) ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compounds, TPC) ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (total flavonoid content, TFC) ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH•, ABTS•+, hydroxyl, superoxide และ FRAP) คะแนนด้านรสอร่อย (umami) และการยอมรับโดยรวม (overall acceptance) ของสารสกัดจากกากมะเขือเทศด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz+UAE)

	Coefficient										
	% Yield	Glutamic acid	TPC	TFC	%DPPH•	%ABTS•+	%OH	%Sup	FRAP	Umami	OA
constant	9.325*	11444.316*	1049.035	502.76	13.722*	17.72*	14.248	-12.779*	0.006	0.876*	1.782
Linear											
X_1	-0.295	-239.026	-22.35	-84.771	-0.724	0.165	1.045	0.335	0.005	0.11*	0.056*
X_2	2.075*	291.086	328.251*	102.62*	3.438*	4.487*	4.435*	1.604*	0.003*	0.085*	0.002*
Quadratic											
X_1^2	0.022	36.018	2.601	6.075	0.058	-0.051	-0.01	0.25	0	-0.007*	-0.003*
X_2^2	-0.0235*	-0.925	-4.904*	-0.847	-0.051*	-0.07*	-0.062*	-0.019*	-3.08E-05	-0.001*	0
Interactions											
$X_1 \times X_2$	0.014	5.373	0.274	4.972*	0.005	0.01	-0.004	-0.006	3.75E-05	0.002*	0.001*
R^2	0.938*	0.891*	0.952*	0.965*	0.961*	0.94*	0.943*	0.924*	0.863*	0.956*	0.8*

Notes. A model in which X_1 = enzyme concentration, X_2 = Extraction time

*Significant at $p < 0.05$

จากนั้นนำค่าสัมประสิทธิ์ที่ได้จากการคำนวณผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS มาสร้างเป็นสมการกำลังสองสมบูรณ์ โดยเขียนเป็นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของค่าร้อยละผลได้ ปริมาณกรดกลูตามิก ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (TFC) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ อนุมูลอิสระ DPPH•, ABTS•+, hydroxyl, superoxide และ FRAP คะแนนการยอมรับด้านรสอูมามิ (รสอร่อย) และคะแนนการยอมรับโดยรวม เพื่อแสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรในการศึกษา ดังสมการ (1) - (11)

$$\text{Yield : } Y = 0.022X_1^2 - 0.0235X_2^2 + 0.014 X_1X_2 - 0.295X_1 + 2.075X_2 + 9.325 \quad (1)$$

$$R^2 = 0.938$$

$$\text{Glutamic : } Y = 36.018x_1^2 - 0.925x_2^2 + 5.373 x_1x_2 - 239.026x_1 + 291.086x_2 + 11444.316 \quad (2)$$

$$R^2 = 0.891$$

$$\text{TPC : } Y = 2.601x_1^2 - 4.904x_2^2 + 0.274x_1x_2 - 22.350x_1 + 328.251x_2 + 1049.035 \quad (3)$$

$$R^2 = 0.952$$

$$\text{TFC : } Y = 6.075x_1^2 - 0.847x_2^2 + 4.972x_1x_2 - 84.771x_1 + 102.617x_2 + 502.759 \quad (4)$$

$$R^2 = 0.965$$

$$\text{DPPH• : } Y = 0.058 x_1^2 - 0.051 x_2^2 + 0.005 x_1x_2 - 0.724 x_1 + 3.438 x_2 + 13.722 \quad (5)$$

$$R^2 = 0.961$$

$$\text{ABTS•+ : } Y = -0.051 x_1^2 - 0.070 x_2^2 + 0.010 x_1x_2 + 0.165 x_1 + 4.487 x_2 + 17.720 \quad (6)$$

$$R^2 = 0.940$$

$$\text{Hydroxyl : } Y = -0.010 x_1^2 - 0.062 x_2^2 - 0.004 x_1x_2 + 1.045 x_1 + 4.435 x_2 + 14.248 \quad (7)$$

$$R^2 = 0.943$$

$$\text{Superoxide : } Y = 0.25 x_1^2 - 0.019 x_2^2 - 0.006 x_1x_2 + 0.335 x_1 + 1.604 x_2 - 12.779 \quad (8)$$

$$R^2 = 0.924$$

$$\text{FRAP : } Y = 0.000 x_1^2 - 3.083e-5x_2^2 + 3.747e-5 x_1x_2 + 0.005 x_1 + 0.003 x_2 + 0.006 \quad (9)$$

$$R^2 = 0.863$$

$$\text{umami : } Y = -0.007X_1^2 - 0.001X_2^2 + 0.002X_1X_2 + 0.110X_1 + 0.085X_2 + 0.876 \quad (10)$$

$$R^2 = 0.956$$

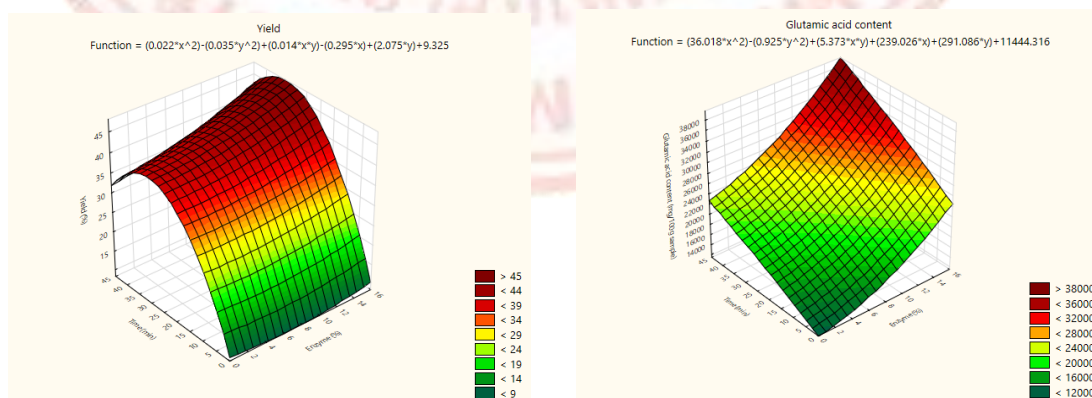
$$\text{overall : } Y = -0.003X_1^2 + 0.000X_2^2 + 0.001X_1X_2 + 0.056X_1 + 0.002X_2 + 1.782 \quad (11)$$

$$R^2 = 0.800$$

การตรวจสอบความสัมพันธ์ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์และความเหมาะสมด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของสมการค่าโมเดล (model) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) พบว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของร้อยละผลได้ ปริมาณกรดกลูตามิก ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH•, ABTS•+, hydroxyl, superoxide radical, FRAP การยอมรับด้านอูมามิ (รสอร่อย) และการยอมรับโดยรวม มีความสัมพันธ์และเหมาะสม โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($p \leq 0.05$) ทำให้ทราบว่าปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาทั้ง 2 ปัจจัย มีผลต่อค่าร้อยละผลได้ ปริมาณกรดอะมิโน กลูตามิก ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH•, ABTS•+, hydroxyl, superoxide radical, FRAP การยอมรับด้านอูมามิ (รสอร่อย) และการยอมรับโดยรวม เมื่อพิจารณาค่า R^2 เป็นค่าที่ใช้ในการบอกถึงแม่นยำและความถูกต้องของสมการแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ พบว่าค่า R^2 ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของค่าร้อยละผลได้ ปริมาณกรดกลูตามิก ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH•, ABTS•+, hydroxyl, superoxide radical, FRAP การยอมรับด้านอูมามิ (รสอร่อย) และการยอมรับโดยรวม มีค่า R^2 เท่ากับ 0.938, 0.891, 0.952, 0.965, 0.961, 0.940, 0.943, 0.924, 0.863, 0.956 และ 0.800 ตามลำดับ จากค่าดังกล่าวอธิบายได้ว่า ข้อมูลจากการทดลองและข้อมูลที่ได้จากการทำนายที่มาจากอิทธิพลของปัจจัยทั้ง 2 สามารถเข้ากันได้ ที่ 96.38, 95.20, 96.10, 94.00, 94.30, 92.40, 86.30, 95.60 และ 80.00 ตามลำดับ ส่วนที่เหลืออีกร้อยละ 3.62, 4.80, 3.90, 6.00, 5.70, 7.60, 13.70, 4.40 และ 20.00 เป็นผลมาจากปัจจัยอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้ เช่น อุณหภูมิ ซึ่งแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่มีค่า R^2 ใกล้เคียงค่า 1.00 หมายถึง สมการจากการทดลองมีความแม่นยำสูงในการทำนายสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกากมะเขือเทศ ค่าที่ยอมรับได้ควรมีค่า R^2 มากกว่า 0.75 [92]

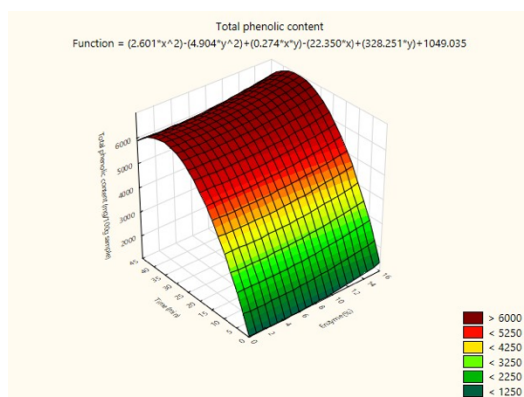
จากนั้นนำค่าจากการทดลองและสมการแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในสมการที่ (1) – (11) มาสร้างกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองแบบ 3 มิติ (3D) เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ศึกษาที่มีต่อค่าร้อยละผลได้ ปริมาณกรดกลูตามิก ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH•, ABTS•+, hydroxyl, superoxide radical, FRAP การยอมรับด้านอูมามิ (รสอร่อย) และการยอมรับโดยรวม โดยกราฟแสดงถึงอิทธิพลร่วมของตัวแปรที่ใช้ศึกษา จากภาพที่ 4-14 แสดงเห็นถึงการใช้ปัจจัยร่วมกันระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาในการสกัด พบว่า ที่บริเวณความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 10-16 เวลาในการสกัด 30-45 นาที เป็นบริเวณที่มี ค่าร้อยละผลได้มากที่สุด (ภาพที่ 4-14a) บริเวณความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 12-16 เวลาในการสกัด 30-45 นาที เป็นบริเวณที่มีกรดกลูตามิกมากที่สุด (ภาพที่ 4-14b) บริเวณความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 10-16 เวลาในการสกัด 30-45 นาที เป็นบริเวณที่มีปริมาณสารฟีนอลิก

ทั้งหมดมากที่สุด (ภาพที่ 4-14c) บริเวณความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 12-16 เวลาในการสกัด 40-45 นาที เป็นบริเวณที่มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด (ภาพที่ 4-14d) บริเวณความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 12-16 เวลาในการสกัด 30-45 นาที เป็นบริเวณที่มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH• มากที่สุด (ภาพที่ 4-14e) บริเวณความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 12-16 เวลาในการสกัด 30-40 นาที เป็นบริเวณที่มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS•+ มากที่สุด (ภาพที่ 4-14f) บริเวณความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 12-16 เวลาในการสกัด 30-45 นาที เป็นบริเวณที่มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ hydroxyl มากที่สุด (ภาพที่ 4-14g) บริเวณความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 12-16 เวลาในการสกัด 40-45 นาที เป็นบริเวณที่มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ superoxide มากที่สุด (ภาพที่ 4-14h) บริเวณความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 12-16 เวลาในการสกัด 35-45 นาที เป็นบริเวณที่มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP มากที่สุด (ภาพที่ 4-14i) บริเวณความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 10-16 เวลาในการสกัด 30-50 นาที เป็นบริเวณที่มีค่าการยอมรับด้านอูมามิ (รสอร่อย) มากที่สุด (ภาพที่ 4-14j) บริเวณความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 12-16 เวลาในการสกัด 40-50 นาที เป็นบริเวณที่มีค่าการยอมรับโดยรวมมากที่สุด (ภาพที่ 4-14k) เมื่อทำการซ้อนทับกราฟ surface plot เพื่อกำหนดขอบเขตของสภาวะในการสกัดที่ให้ค่าร้อยละผลได้ ปริมาณกรดกลูตามิก ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH•, ABTS•+, hydroxyl, superoxide radical, FRAP การยอมรับด้านอูมามิ (รสอร่อย) และการยอมรับโดยรวมสูง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดจากกากมะเขือเทศโดยใช้โบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง คือ สภาวะที่ใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 10-16 ร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 25-45 นาที ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกสภาวะในการทดลองคือเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 30 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด

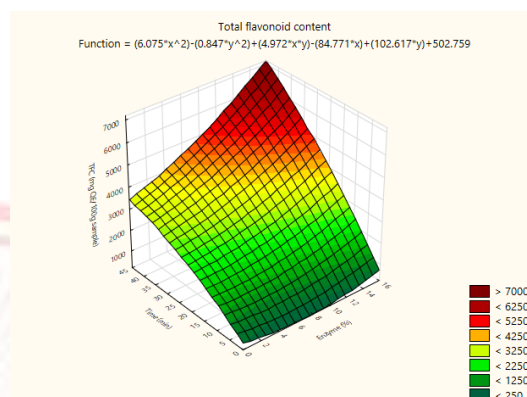


(a)

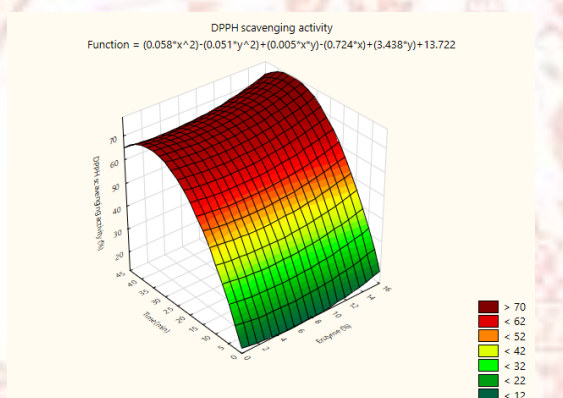
(b)



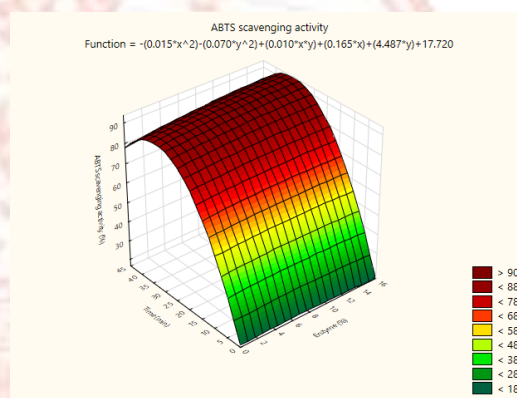
(c)



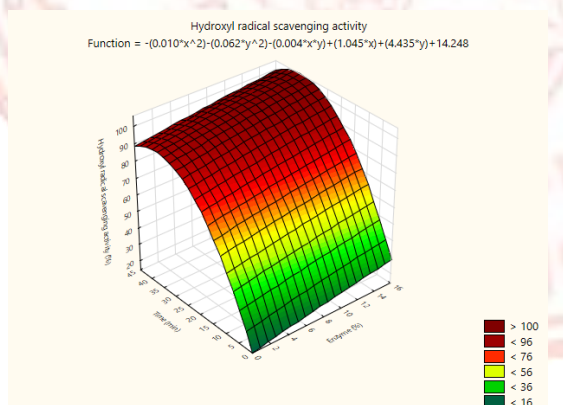
(d)



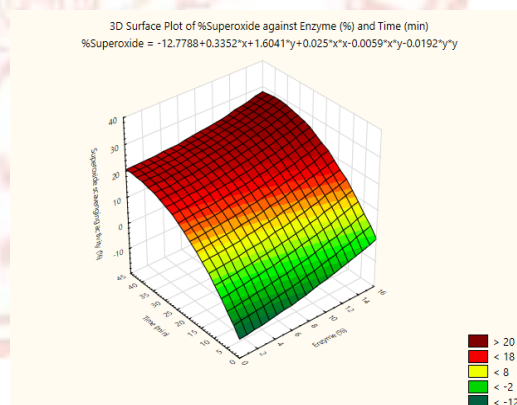
(e)



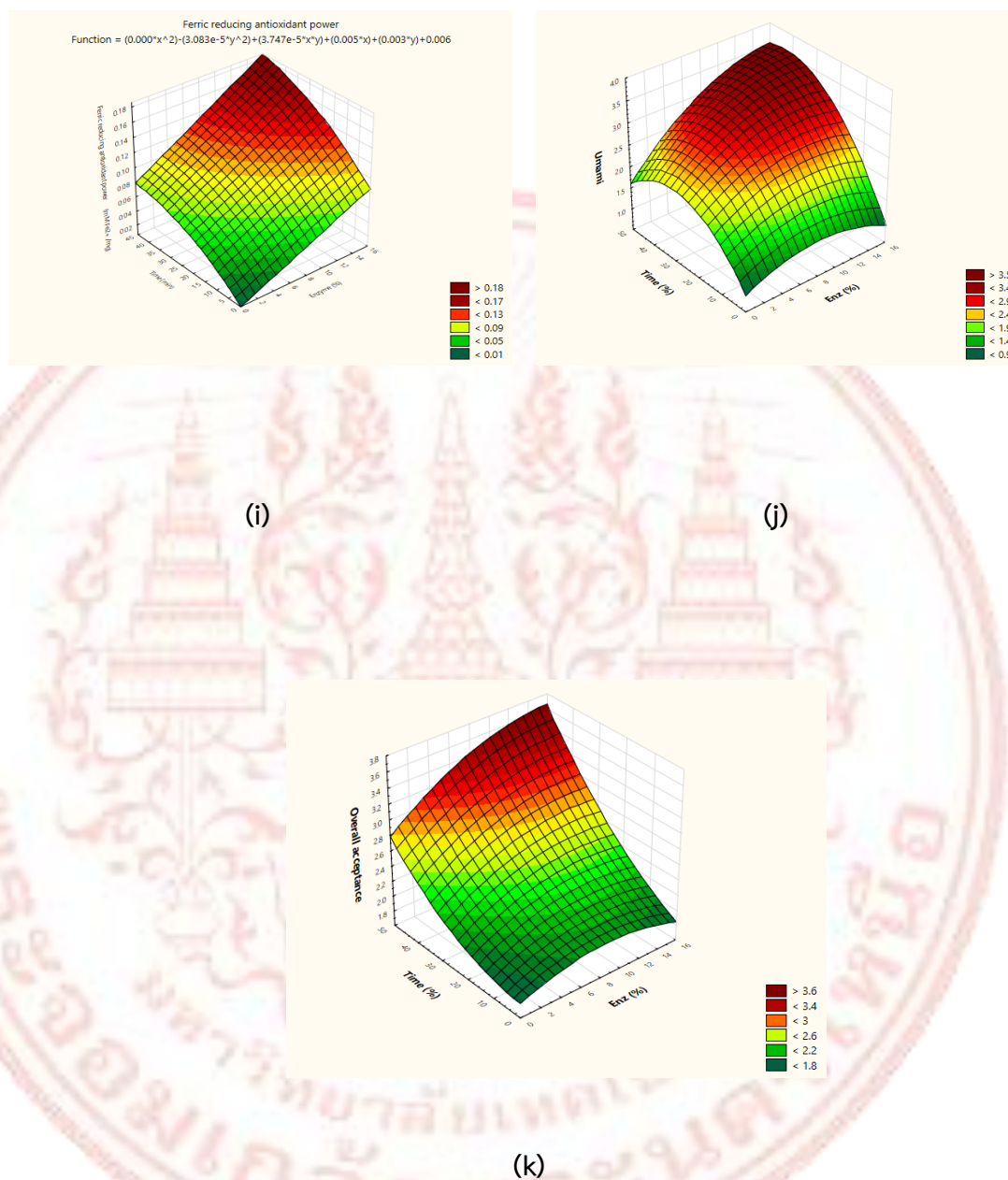
(f)



(g)



(h)



ภาพที่ 4- 14 ร้อยละผลได้ (a) ปริมาณกรดกลูตามิก (b) ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (c) ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (d) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH• (e) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS•+ (f) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ Hydroxyl (g) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ Superoxide (h) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP (i) การยอมรับต้านอนุมูล (รสร้อย) (j) การยอมรับโดยรวม (k)

ตารางที่ 4- 5 Observed and Predicted Values of the Confirmation Experiments

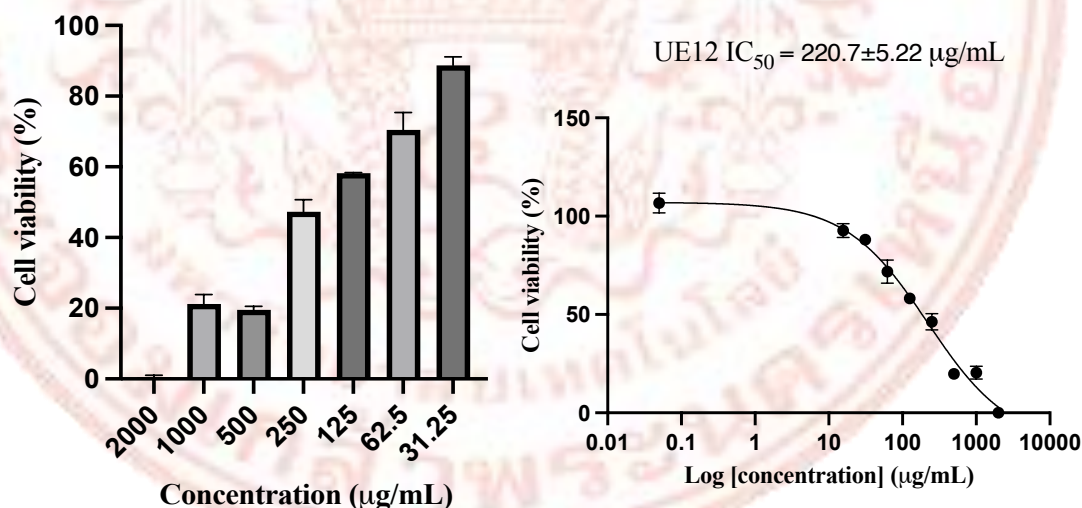
Observed and predicted values for optimizing the tomato extracts																							
Trial	Condition ^a	Yield		glutamic acid		TPC		TFC		DPPH•		ABTS•+		Hydroxyl		Superoxide		FRAP		Umami		Overall acceptance	
		Obs.	Pre.	Obs.	Pre.	Obs.	Pre.	Obs.	Pre.	Obs.	Pre.	Obs.	Pre.	Obs.	Pre.	Obs.	Pre.	Obs.	Pre.	Obs.	Pre.	Obs.	Pre.
1	X ₁ = 0%, X ₂ = 0 min	9.33	10.52	11444.32	12681.73	1049.04	886.52	502.76	455.78	13.72	11.15	17.72	14.87	14.25	16.06	-12.78	-17.52	0.01	0.026	0.88	1.1	1.78	1.8
2	X ₁ = 0%, X ₂ = 15min	35.16	35.02	15602.48	13934.46	4869.40	5129.66	1851.49	2229.32	53.82	59.36	69.28	77.64	66.82	68.71	7.01	14.88	0.04	0.033	1.93	1.9	1.81	1.8
3	X ₁ = 10%, X ₂ = 0 min	8.58	5.64	12655.86	15801.93	1085.64	913.30	262.55	447.72	12.28	11.04	14.27	14.58	23.70	20.02	-12.78	-4.97	0.06	0.035	1.28	1.1	2.04	2.2
4	X ₁ = 15%, X ₂ = 30min	57.25	46.79	26280.91	37656.63	6856.24	6223.28	5151.77	5996.12	75.40	70.18	84.83	84.82	103.12	97.38	18.24	21.94	0.16	0.154	2.46	3.2	2.46	3.2
5	X ₁ = 15%, X ₂ = 45min	65.09	42.03	30815.50	34438.54	6324.66	6608.33	6856.90	6195.14	70.72	69.99	75.64	87.26	99.00	99.18	20.93	30.29	0.18	0.153	2.71	3.1	2.71	3.1

Notes.

^a x₁ represents enzyme concentration. x₂ represents extraction time.

4.14 ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

นำสภาวะที่เหมาะสมหรือสภาวะที่ดีที่สุดที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย RSM คือ สภาวะการสกัดที่ความเข้มข้นโบรมิเลนร้อยละ 15 เวลาในการสกัด 30 นาที (UE12) จึงนำสภาวะนี้ไปศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของ UE-12 โดยใช้ Vero cell และทดสอบด้วยวิธี MTT assays โดยใช้ด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่ต่างกัน ได้แก่ 1000, 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการวิเคราะห์พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดสามารถแปรผกผันกับอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ปกติได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4-15) โดยความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่สภาวะที่เหมาะสมนี้ (UE12) ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ เท่ากับ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งทำให้เซลล์มีความรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 80 หมายความว่าเซลล์สามารถมีชีวิตอยู่ได้โดยไม่ถูกทำลาย และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 220.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากข้อมูลชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากมะเขือเทศไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์และปลอดภัยสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ มีงานวิจัยพบว่าสารสกัดจากเปลือกมะเขือเทศสามารถปกป้องเซลล์จากความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถป้องกันเซลล์จากความเสียหายที่เหนี่ยวนำโดย H_2O_2 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ [20]

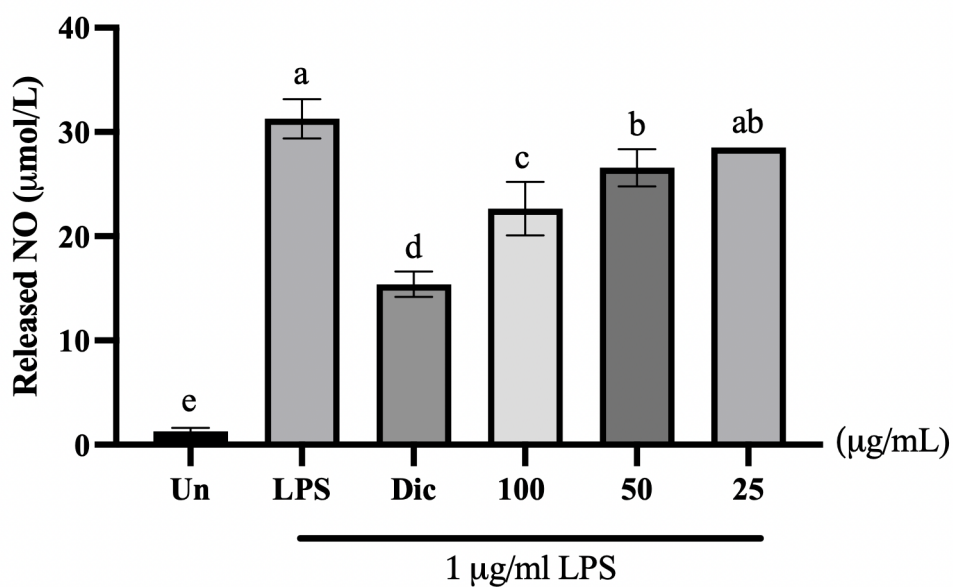


ภาพที่ 4- 15 ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cell) ของสารสกัดมะเขือเทศที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสม

4.15 ความสามารถต้านอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ

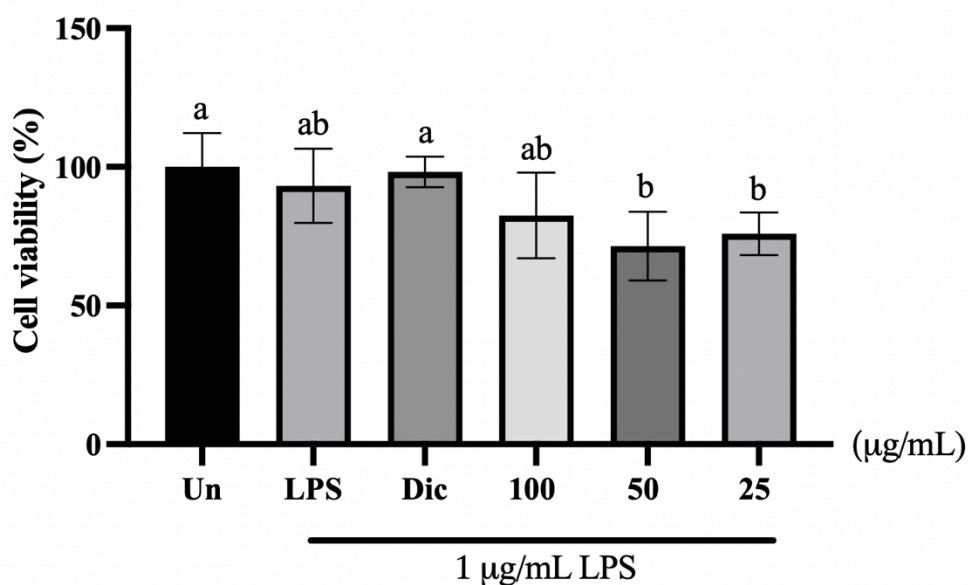
สารสกัดจากกากมะเขือจากสภาวะที่ดีที่สุด (UE12) มีความสามารถต้านอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ พบว่าสารสกัดจากมะเขือเทศมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการปลดปล่อยไนโตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS และวิเคราะห์ปริมาณไนโตริกออกไซด์ที่เกิดขึ้นหลังเกิดการอักเสบ ซึ่งเป็นโมเลกุลที่สำคัญสำหรับระบบภูมิคุ้มกันสามารถป้องกันเชื้อโรคต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส และปรสิต หากเซลล์มีการอักเสบจะปลดปล่อยไนโตริกออกไซด์มากขึ้น แต่หากมากเกินไป ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเฉียบพลันและเรื้อรัง หากสารตัวอย่างสามารถยับยั้งการอักเสบได้ ปริมาณไนโตริกออกไซด์ที่ตรวจวัดได้ จะมีปริมาณน้อยกว่าตัวอย่างควบคุมที่บ่มด้วย LPS อย่างเดียว ให้นิยามว่า UE12 สามารถยับยั้งการผลิตไนโตริกออกไซด์ อย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ความเข้มข้น 100, 50, และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบไนโตริกออกไซด์ที่ผลิตออกมาแค่ 22.64, 26.56 และ 28.52 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ (ภาพที่ 4-16a.) บ่งชี้ว่าสารสกัดมะเขือเทศที่ได้จาก Enz-UAE มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจได้ดี โดยที่ความเข้มข้น 100, 50, และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์แมคโครฟาจรอดชีวิตมากกว่า 80% (ภาพที่ 4-16b.) จากผลการทดลองพบว่ากรดกลูตามิกที่มีอยู่ปริมาณมากในสารสกัดจากมะเขือเทศ อาจจะช่วยเสริมฤทธิ์ในการต้านอักเสบ โดยกรดกลูตามิกอาจจะไม่ได้ช่วยเสริมฤทธิ์ในการต้านอักเสบโดยตรง แต่กรดกลูตามิกเป็นสารตั้งต้นของ กลูตาไธโอน ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญที่ช่วยลดความเครียดออกซิเดชัน [93] และยังพบว่ากรดกลูตามิกเป็นสารตั้งต้นของ GABA ซึ่งมีบทบาทในการลดการกระตุ้นการอักเสบ [94] นอกจากนี้อาจเป็นเพราะสารประกอบฟีนอลิกที่พบ สอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากดอกควินซ์สามารถลดการปลดปล่อยไนโตริกออกไซด์ได้ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ [54] ที่ และยังมีนารินจีนที่สามารถลดการผลิต ROS ที่เกิดจาก AGEs อย่างมีนัยสำคัญ [30]

(a.)



a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

(b.)

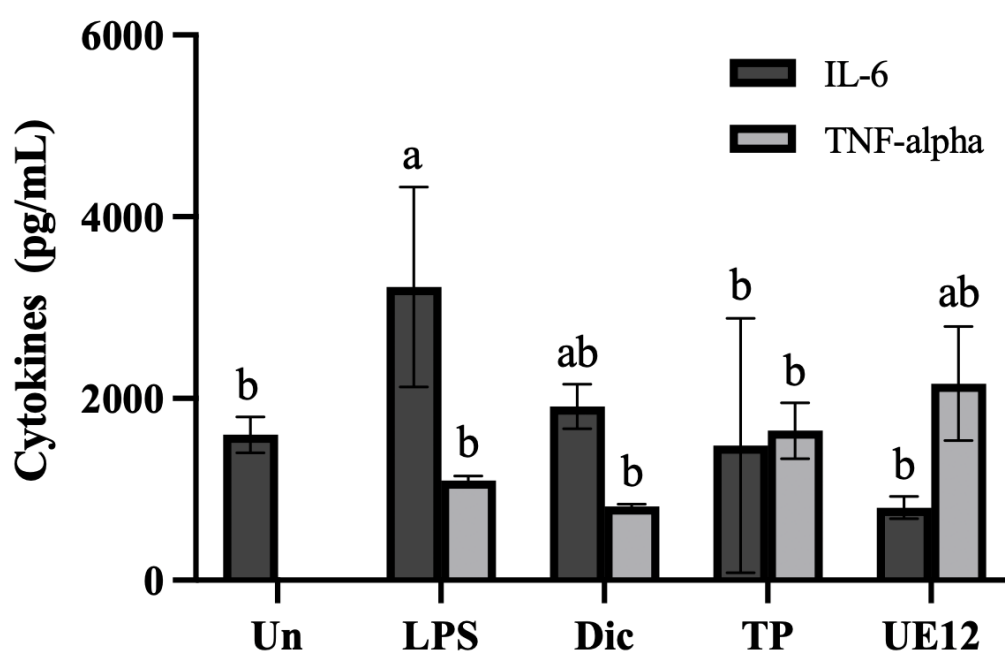


a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ภาพที่ 4- 16 ผลการทดสอบความสามารถต้านอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจของสารสกัดมะเขือเทศที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสม (a.) ความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ (b.)

4.16 ผลของสารสกัดมะเขือเทศที่มีผลต่อไซโตไคน์ IL-6 และ TNF-alpha

จากผลการศึกษา IL-6 และ TNF-alpha พบว่าสารสกัดจากมะเขือเทศช่วยลดการหลั่งไซโตไคน์ IL-6 ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบในเซลล์ [95] ได้มากกว่าจากมะเขือเทศ แต่เมื่อเทียบกับยาลดการอักเสบหรือ Diclofenac พบว่าสารสกัดจากมะเขือเทศมีประสิทธิภาพในการลดการหลั่งไซโตไคน์ IL-6 ได้มากกว่า (ภาพที่ 4-17) สอดคล้องกับผลการทดสอบความสามารถในการต้านอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ ที่พบว่าสารสกัดจากมะเขือเทศสามารถลดการปลดปล่อยไนตริกออกไซด์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจได้เช่นกัน มีงานวิจัยพบว่าสารสกัดจากมะเขือเทศช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลชนิดไม่ดี (LDL-cholesterol) [96] ซึ่งเป็นตัวการที่ก่อให้เกิดการอักเสบอย่าง IL-6 ได้อย่างมีนัยสำคัญ และยังพบว่าไลโคปีนจากมะเขือเทศช่วยยับยั้งการเกิด IL-6 ในเซลล์ Raw264.7 ได้ [97] ในทางกลับกัน สารสกัดจากมะเขือเทศไม่สามารถลด TNF-alpha ได้ อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของตัวอย่างต่ำเกินไป มีงานวิจัยพบว่า ฟลาโวนอยด์บางชนิดกระตุ้นให้เกิด TNF-alpha มากกว่าลดการเกิด และหากมี LPS (lipopolysaccharide) หรือสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันอื่น ๆ ฟลาโวนอยด์อาจเสริมฤทธิ์การหลั่ง TNF-alpha ได้เช่นกัน [98]



a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

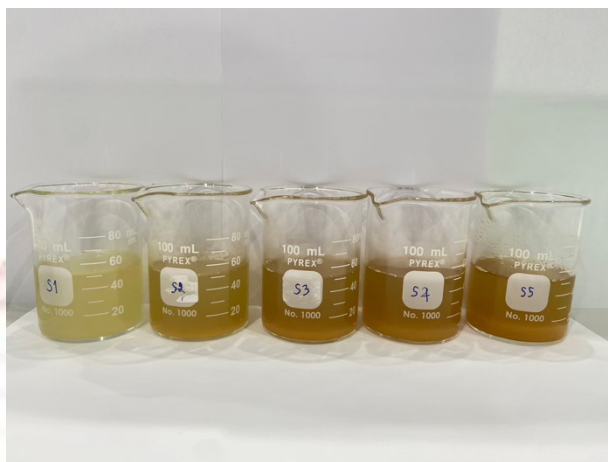
ภาพที่ 4- 17 ผลของสารสกัดมะเขือเทศที่มีผลต่อ IL-6 และ TNF-alpha

4.17 การประยุกต์ใช้สารเสริมรสที่สกัดได้จากมะเขือเทศโดยใช้โบรมิเลนร่วมกับกลิ่นเสียงความถี่สูงจากสถานะที่ดีที่สุดในผลิตภัณฑ์น้ำต้มยำ

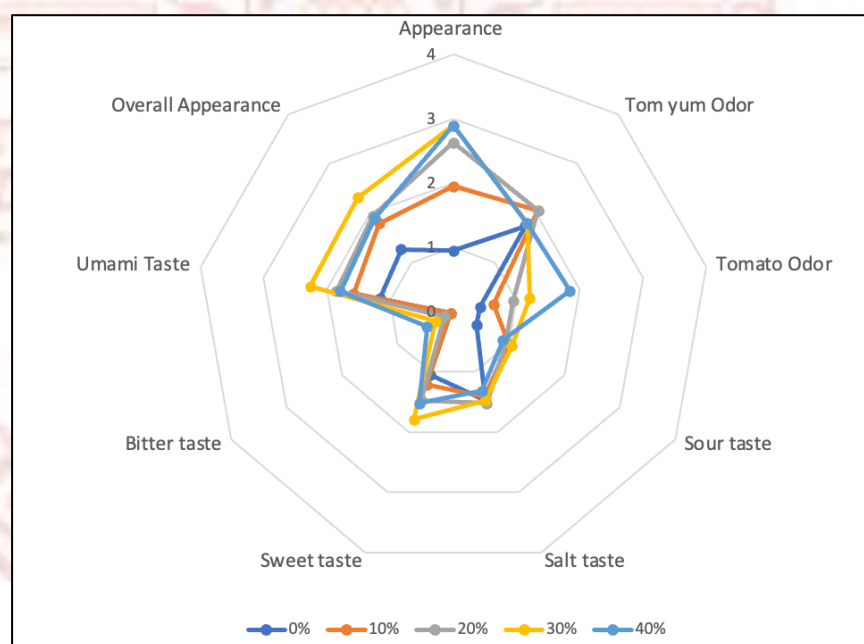
จากนั้นศึกษาการประยุกต์ใช้สารเสริมรสอูมามิจากสารสกัดมะเขือเทศจากมะเขือเทศที่ได้จากสถานะที่ดีที่สุดในสถานะการย่อยด้วยโบรมิเลนร่วมกับกลิ่นเสียงความถี่สูง คือที่สภาวะการใช้เอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาในการย่อยสลาย 30 นาที โดยการนำสารสกัดจากสภาวะดังกล่าวมาทำแห้งด้วยวิธี freeze dry ได้เป็นผงปรุงรสอูมามิจากมะเขือเทศ (ภาพที่ 4-18) จากนั้นนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารเสริมรสอูมามิในผลิตภัณฑ์น้ำต้มยำ แปรอัตราส่วนร้อยละ 0, 10, 20, 30, และ 40 ต่อน้ำซุปโดยปริมาตร (ภาพที่ 4-19) ทำการทดสอบการยอมรับด้านประสาทสัมผัสทางด้านกลิ่นมะเขือเทศ กลิ่นต้มยำ รสอูมามิ รสเปรี้ยว รสเค็ม รสขม รสหวาน และการยอมรับโดยรวมจากผู้ชิมทั้งหมดจำนวน 15 คน โดยใช้วิธีทดสอบแบบ Qualitative different test ให้คะแนนแบบ 5-point scoring test ซึ่งเป็นวิธีให้คะแนนตามความแรง (เข้มข้น) ของกลิ่นรส จากนั้นน้อยถึงมากที่สุด โดยให้เป็นคะแนน 0 ถึง 4 โดยคะแนน 0 หมายถึง น้อยมาก/ไม่พบกลิ่นรสเลย คะแนน 1 หมายถึง เล็กน้อย คะแนน 2 หมายถึง กลาง ๆ คะแนน 3 หมายถึง มาก และคะแนน 4 หมายถึง มากที่สุด พบว่าสารเสริมรสอูมามิจากมะเขือเทศร้อยละ 30 มีคะแนนการยอมรับทางด้านรสอูมามิสูงที่สุดเท่ากับ 2.26 ซึ่งหมายความว่ามีความพึงพอใจในเกณฑ์สูง มีรสหวานเล็กน้อย (1.78) มีรสเปรี้ยว (1.05) รสขม (0.31) และกลิ่นมะเขือเทศ (1.21) ต่ำ คะแนนการยอมรับโดยรวมสูงสุดเท่ากับ 2.31 (ภาพที่ 4-20) ซึ่งเห็นได้ชัดเจนน่าน้ำต้มยำที่ใส่ผงปรุงรสในอัตราส่วนร้อยละ 30 ให้คะแนนด้านอูมามิสูงสุด และได้รับการยอมรับของผู้บริโภคสูงสุด อาจเนื่องมาจากอัตราส่วนที่สูงเกินไป ทำให้กลิ่นรสของผงปรุงรสเข้มข้นเกินไป จนเกินระดับการรับได้และความชอบของผู้บริโภค ดังนั้นจากผลการวิจัยนี้สามารถสรุปว่าอัตราส่วนผงปรุงรสร้อยละ 30 เป็นระดับที่เหมาะสมในการใส่ในผลิตภัณฑ์น้ำต้มยำ หรืออาหารประเภทอื่น ๆ ที่มีลักษณะกลิ่นรสที่ไม่รุนแรงที่คล้ายคลึงกัน



ภาพที่ 4- 18 ลักษณะของผงแห้งของสารสกัดจากมะเขือเทศที่ใช้เป็นสารเสริมรสเชิงสุขภาพ



ภาพที่ 4- 19 อัตราส่วนของผงปรุงรสอูมิมาในน้ำต้มยำ โดยแปรความเข้มข้นร้อยละ 0, 10, 20, 30, และ 40 ต่อน้ำซุปโดยปริมาตร



ภาพที่ 4- 20 คะแนนการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสด้านรสชาติของน้ำต้มยำที่ปรุงแต่งด้วยสารสกัดมะเขือเทศกากมะเขือเทศ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดสารประกอบชีวภาพพบว่า สารสกัดจากมะเขือเทศที่ได้จากเทคนิคการสกัดด้วยเอนไซม์ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงประกอบด้วยกรดกลูตามิกในปริมาณสูง ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อรสชาติอูมามิ (อร่อย) และสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีส่วนช่วยในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารเสริมรสจากกากมะเขือเทศโดยใช้เอนไซม์ร่วมกับเทคนิค UAE คือ ปริมาณโบรมิเลนร้อยละ 15 เวลา ร่วมกับการสกัดด้วย UAE 30 นาที มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•], ABTS^{•+}, hydroxyl, superoxide และ FRAP สูง เท่ากับร้อยละ 70.18, 84.82, 97.38, 21.94 และ 0.153 mM Fe²⁺/mg ตามลำดับ มีคะแนนด้านรสอูมามิ และการยอมรับโดยรวมเท่ากับ 3.4 และ 3.3 ตามลำดับ

นอกจากนี้พบว่าสกัดจากกากมะเขือเทศมีกลิ่นรสที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวของมะเขือเทศ ได้แก่ hexanal และ 2-isobutylthiazole เจือจางลง พบสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์หลัก ได้แก่ Gallic acid และ naringin ในปริมาณเท่ากับ 413.26 และ 8,256.49 mg/100g ตามลำดับ สารสกัดเหล่านี้สามารถลดการอักเสบของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจได้ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำและสามารถลดการหลั่ง IL-6 ที่ทำหน้าที่เป็น ตัวประสานระหว่างการกระตุ้นการอักเสบในระยะเริ่มต้นและการควบคุมการอักเสบในระยะยาว นอกจากนี้สารสกัดจากมะเขือเทศยังสามารถกำจัดสารประกอบระเหยที่มีกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์ของมะเขือเทศ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารเสริมรสอูมามิ เพื่อเพิ่มความอร่อยในอาหารได้โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย

บรรณานุกรม

- [1] Team, M., สถิติผู้สูงอายุไทยปี 65 จำนวนผู้สูงอายุเพิ่มขึ้นต่อเนื่อง แต่อัตราการเกิดต่ำ 2022.
- [2] Niaz, K., E. Zaplatic, and J. Spoor, Extensive use of monosodium glutamate: A threat to public health? *Excli j*, 2018. **17**: p. 273-278.
- [3] Filer, L.J., Jr. and L.D. Stegink, A report of the proceedings of an MSG workshop held August 1991. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1994. **34**(2): p. 159-74.
- [4] Zhang, Y., et al., Recent developments on umami ingredients of edible mushrooms – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 2013. **33**(2): p. 78-92.
- [5] de Bie, T.H., et al., Screening for GABA and glutamic acid in tomato and potato genotypes and effects of domestic cooking. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2023. **122**: p. 105416.
- [6] Choi, S.H., et al., Protein, free amino acid, phenolic, β -carotene, and lycopene content, and antioxidative and cancer cell inhibitory effects of 12 greenhouse-grown commercial cherry tomato varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2014. **34**(2): p. 115-127.
- [7] Zuorro, A., et al., Enzyme-Assisted Production of Tomato Seed Oil Enriched with Lycopene from Tomato Pomace. *Food and Bioprocess Technology*, 2013. **6**(12): p. 3499-3509.
- [8] Saini, R.K., S.H. Moon, and Y.-S. Keum, An updated review on use of tomato pomace and crustacean processing waste to recover commercially vital carotenoids. *Food Research International*, 2018. **108**: p. 516-529.

- [9] Valle, M., M. Cámara, and M.E. Torija, Chemical characterization of tomato pomace. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006. **86**: p. 1232-1236.
- [10] Vorobyova, V., M. Skiba, and G. Vasyliiev, Extraction of phenolic compounds from tomato pomace using choline chloride-based deep eutectic solvents. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2022. **16**(2): p. 1087-1104.
- [11] Wijayasekara, K. and J. Wansapala, Uses, effects and properties of monosodium glutamate (MSG) on food & nutrition. 2017. **2**: p. 132-143.
- [12] Zhang, Y.a.P., Zhongli and Venkitasamy, Chandrasekar and Ma, Haile and Li, Yunliang, Umami taste amino acids produced by hydrolyzing extracted protein from tomato seed meal. *Food Science and Technology*, 2015. **62**: p. 1154-1161.
- [13] Herrero, M., et al., 4.08 - Extraction Techniques for the Determination of Phenolic Compounds in Food, in *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, J. Pawliszyn, Editor. 2012, Academic Press: Oxford. p. 159-180.
14. Ninomiya, K., Natural occurrence. *Food Reviews International*, 1998. **14**(2-3): p. 177-211.
- [15] Liu, Y.-y., et al., Value-added application of *Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A.DC. roots (PGR) by ultrasound-assisted extraction (UAE) process to improve physicochemical quality, structural characteristics and functional properties. *Food Chemistry*, 2021. **363**: p. 130354.
- [16] Katalin, S., et al., Carotenoid Recovery from Tomato Processing By-Products through Green Chemistry. *Molecules*, 2022. **27**: p. 3771.
- [17] Pandey, A., et al., Optimization of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of phenolics and antioxidant compounds from rhizomes of *Rheum*

- moorcroftianum using response surface methodology (RSM). *Industrial Crops and Products*, 2018. **119**: p. 218-225.
- [18] Rice-Evans, C., N. Miller, and G. Paganga, Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 1997. **2**(4): p. 152-159.
- [19] Inês Amaro, M., et al., Anti-inflammatory activity of naringin and the biosynthesised naringenin by naringinase immobilized in microstructured materials in a model of DSS-induced colitis in mice. *Food Research International*, 2009. **42**(8): p. 1010-1017.
- [20] Reshmitha, T.R., et al., DNA and mitochondrial protective effect of lycopene rich tomato (*Solanum lycopersicum* L.) peel extract prepared by enzyme assisted extraction against H₂O₂ induced oxidative damage in L6 myoblasts. *Journal of Functional Foods*, 2017. **28**: p. 147-156.
- [21] Populin, T., et al., A survey on the presence of free glutamic acid in foodstuffs, with and without added monosodium glutamate. *Food Chemistry*, 2007. **104**(4): p. 1712-1717.
- [22] Tamasi, G., et al., Characterization of nutraceutical components in tomato pulp, skin and locular gel. *European Food Research and Technology*, 2019. **245**(4): p. 907-918.
- [23] Izzo, L., et al., Bioaccessibility and Antioxidant Capacity of Bioactive Compounds From Various Typologies of Canned Tomatoes. *Frontiers in Nutrition*, 2022. **9**.
- [24] Samak, G., et al., Superoxide and hydroxyl radical scavenging actions of botanical extracts of *Wagatea spicata*. *Food Chemistry*, 2009. **115**(2): p. 631-634.

- [25] Zhao, Q., et al., Anti-inflammatory effect of two novel peptides derived from Binglangjiang buffalo whey protein in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food Chemistry*, 2023. **429**: p. 136804.
- [26] Kawai, M., et al., Gustatory sensation of l- and d-amino acids in humans. *Amino Acids*, 2012. **43**(6): p. 2349-2358.
- [27] Zhang, Y., et al., Recent developments on umami ingredients of edible mushrooms – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 2013. **33**: p. 78–92.
- [28] Garattini, S., Glutamic Acid, Twenty Years Later. *The Journal of Nutrition*, 2000. **130**(4): p. 901S-909S.
- [29] กานดาวดี โนชัย, จิรภา พงจินดา., ผลของสายพันธุ์มะเขือเทศและวิธีการสกัดไลโคปีนต่อสมบัติทางเคมีและกายภาพของมะเขือเทศ =: Effects of tomato variety and lycopene extraction methods on physicochemical properties of tomato powder.
- [30] Teng, J., et al., Naringenin, a common flavanone, inhibits the formation of AGEs in bread and attenuates AGEs-induced oxidative stress and inflammation in RAW264.7 cells. *Food Chemistry*, 2018. **269**: p. 35-42.
- [31] Kristinsson, H.G. and B.A. Rasco, Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2000. **40**(1): p. 43-81.
- [32] อภิษฎา แซ่เต่ง, ณัฏฐา เลหากุลจิตต์, อรพิน เกิดชูชื่น., การสกัดสารเพิ่มรสชาติและไลโคปีนจากมะเขือเทศ. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 57, 2562. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์(57): p. 620-626.
- [33] Hale, L.P., et al., Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. *Int Immunopharmacol*, 2005. **5**(4): p. 783-93.

- [34] พิสิฐ วงศ์สง่าศรี, เบญจวรรณ ธรรมชนารักษ์, สุทธิวัฒน์ แซ่ฮ้อ, การผลิตแมงกะพรุนผง ด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย. 2555.
- [35] ประนอม สุขเกื้อ., การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มโปรตีนไฮโดรไลเซตเพื่อสุขภาพจากเห็ด. 2557.
- [36] ดวงมล เรือนงาม., การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ. Journal of Science Ladkrabang, 2015. **23(2)**(Vol. 23 No. 2 (2014): เดือนกรกฎาคม - ธันวาคม 2557): p. 120–139.
- [37] Pflieger, R., et al., Bubble Dynamics. 2019. p. 1-38.
- [38] ordoñez-santos, L., J. Esparza-Estrada, and P. Vanegas, Ultrasound-assisted extraction of total carotenoids from mandarin epicarp and application as natural colorant in bakery products. LWT, 2020. **139**: p. 110598.
- [39] Meregalli, M.M., et al., Conventional and ultrasound-assisted methods for extraction of bioactive compounds from red araçá peel (*Psidium cattleianum* Sabine). Arabian Journal of Chemistry, 2020. **13(6)**: p. 5800-5809.
- [40] Laqui Vilca, C., et al., Ultrasound-assisted optimal extraction and thermal stability of betalains from colored quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) hulls. Industrial Crops and Products, 2018. **111**: p. 606-614.
- [41] Sousa, C., et al., Greener ultrasound-assisted extraction of bioactive phenolic compounds in *Croton heliotropiifolius* Kunth leaves. Microchemical Journal, 2020. **159**: p. 105525.
- [42] Munro, E., The Spaces of Organisation and the Organisation of Space: Power, Identity and Materiality at Work. Dale, Karen and Burrell, Gibson. Geografiska Annaler: Series B, Human Geography, 2010. **92**: p. 182-184.
- [43] Saladin, R., et al., Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. Nature, 1995. **377(6549)**: p. 527-9.

- [44] Newman, A.J., et al., The administration of monosodium L-glutamate to neonatal and pregnant rhesus monkeys. *Toxicology*, 1973. **1**(3): p. 197-204.
- [45] Chaudhari, N., et al., The Taste of Monosodium Glutamate: Membrane Receptors in Taste Buds. *The Journal of Neuroscience*, 1996. **16**(12): p. 3817.
- [46] Halliwell, B., *Free Radicals and Other Reactive Species in Disease*. 2005.
- [47] Kedare, S.B. and R.P. Singh, Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*, 2011. **48**(4): p. 412-22.
- [48] Zhang, J., et al., UPLC-Q-Exactive-MS based metabolomics reveals chemical variations of three types of insect teas and their in vitro antioxidant activities. *LWT*, 2022. **160**: p. 113332.
- [49] Baek, M.W., et al., Preharvest Methyl Jasmonate Treatment Increased the Antioxidant Activity and Glucosinolate Contents of Hydroponically Grown Pak Choi. *Antioxidants*, 2021. **10**(1): p. 131.
- [50] Mahieddine, B., et al., Effects of microwave heating on the antioxidant activities of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Annals of Agricultural Sciences*, 2018. **63**(2): p. 135-139.
- [51] Shalaby, E. and S. Shanab, Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, 2013. **7**.
- [52] Nzimande, N.A., et al., Impact of different pre-treatments and drying methods on the physicochemical properties, bioactive compounds and antioxidant activity of different tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivars. *LWT*, 2024. **207**: p. 116641.
- [53] Zeilhofer, H.U. and U.B. Zeilhofer, Spinal dis-inhibition in inflammatory pain. *Neuroscience Letters*, 2008. **437**(3): p. 170-174.

- [54] Hu, F., et al., Phenolic compounds from *Chaenomeles speciosa* alleviate inflammation in lipopolysaccharide-treated RAW264.7 macrophages via the NF- κ B and MAPK pathways. *Food Science and Human Wellness*, 2023. **12**(4): p. 1071-1080.
- [55] Navarrete, S., M. Alarcón, and I. Palomo, Aqueous Extract of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and Ferulic Acid Reduce the Expression of TNF- α and IL-1 β in LPS-Activated Macrophages. *Molecules*, 2015. **20**(8): p. 15319-15329.
- [56] Zhu, Q., et al., A poly-l-glutamic acid functionalized nanocomplex for improved oral drug absorption. *J Mater Chem B*, 2015. **3**(43): p. 8508-8517.
- [57] Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
- [58] Singleton, V.L. and J.A. Rossi, Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1965. **16**(3): p. 144.
- [59] Farinon, B., et al., Tomato pomace food waste from different variants as a high antioxidant potential resource. *Food Chem*, 2024. **452**: p. 139509.
- [60] Girgih, A., C. Udenigwe, and R. Aluko, In Vitro Antioxidant Properties of Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) Protein Hydrolysate Fractions. *Journal of Oil & Fat Industries*, 2012. **88**: p. 381-389.
- [61] Sonklin, C., N. Laohakunjit, and O. Kerdchoechuen, Assessment of antioxidant properties of membrane ultrafiltration peptides from mungbean meal protein hydrolysates. 2018.

- [62] Ajibola, C.F., et al., Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. *Int J Mol Sci*, 2011. **12**(10): p. 6685-702.
- [63] Sonklin, C., et al., Functional Characterization of Mung Bean Meal Protein-Derived Antioxidant Peptides. *Molecules*, 2021. **26**(6): p. 1515.
- [64] Karamać, M., A. Kosińska-Cagnazzo, and A. Kulczyk, Use of Different Proteases to Obtain Flaxseed Protein Hydrolysates with Antioxidant Activity. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(7).
- [65] Barzkar, N., et al., Jellyfish protein hydrolysates: Multifunctional bioactivities unveiled in the battle against diabetes, inflammation, and bacterial pathogenesis. *Microbial Pathogenesis*, 2024. **191**: p. 106648.
- [66] Tabtimmai, L., et al., Three-phase partitioning technique for the green separation of crude polysaccharides from *Schizophyllum commune* and its effect on macrophage activation. *Food Bioscience*, 2024. **58**: p. 103735.
- [67] Zhu, J., et al., Saikosaponin A mediates the inflammatory response by inhibiting the MAPK and NF- κ B pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Exp Ther Med*, 2013. **5**(5): p. 1345-1350.
- [68] Sonklin, C., N. Laohakunjit, and O. Kerdchoechuen, Physicochemical and Flavor Characteristics of Flavoring Agent from Mungbean Protein Hydrolyzed by Bromelain. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2011. **59**.
- [69] Aksoylu Özbek, Z., et al., A Promising Food Waste for Food Fortification: Characterization of Dried Tomato Pomace and Its Cold Pressed Oil. *Journal of Food Chemistry & Nanotechnology*, 2020. **6**: p. 9-17.

- [70] Mirzaei, A., et al., Estimation of the nutritive value of tomato pomace for ruminant using in vitro gas production technique. *African Journal of Biotechnology*, 2011. **10**: p. 6251-6256.
- [71] Agrawal, P., et al., Bromelain: A Potent Phytomedicine. *Cureus*, 2022. **14**(8): p. e27876.
- [72] Singh, L., et al., Synergistic effects of enzyme-based ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from *Rhododendron arboreum* and evaluation of thermal kinetic stability. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2022. **31**: p. 100395.
- [73] Wang, J., et al., Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic extraction of kiwi starch and evaluation of its structural, physicochemical, and functional characteristics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2021. **81**: p. 105866.
- [74] Periaswamy Sivagnanam, S., et al., Ultrasound, microwave and enzyme-assisted multiproduct biorefinery of *Ascophyllum nodosum*. *Food Chemistry*, 2024. **433**: p. 137259.
- [75] Abbas, S., T. Shanbhag, and A. Kothare, Applications of bromelain from pineapple waste towards acne. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2021. **28**(1): p. 1001-1009.
- [76] Ali, M.Y., et al., Nutritional Composition and Bioactive Compounds in Tomatoes and Their Impact on Human Health and Disease: A Review. *Foods*, 2020. **10**: p. 45.
- [77] Yi Ling, Y., et al., Assessment of Maceration, Ultrasonic and Microwave Assisted Extraction for Total Phenolic Content, Total Flavonoid Content and Kaempferol Yield from *Cassia alata* via Microstructures Analysis. *Materials Today: Proceedings*, 2019. **19**: p. 1273-1279.

- [78] Slimestad, R., T. Fossen, and M.J. Verheul, The Flavonoids of Tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008. **56**(7): p. 2436-2441.
- [79] Vallverdú-Queralt, A., et al., Effect of tomato industrial processing on phenolic profile and hydrophilic antioxidant capacity. *LWT - Food Science and Technology*, 2012. **47**(1): p. 154-160.
- [80] Li, J., T. Di, and J. Bai, Distribution of Volatile Compounds in Different Fruit Structures in Four Tomato Cultivars. *Molecules*, 2019. **24**(14): p. 2594.
- [81] Wang, L., et al., Difference in volatile composition between the pericarp tissue and inner tissue of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2018. **42**(1): p. e13387.
- [82] Distefano, M., et al., Aroma Volatiles in Tomato Fruits: The Role of Genetic, Preharvest and Postharvest Factors. *Agronomy*, 2022. **12**(2): p. 376.
- [83] Zanor, M., et al., Metabolic characterization of loci affecting sensory attributes in tomato allows an assessment of the influence of the levels of primary metabolites and volatile organic contents. *Journal of experimental botany*, 2009. **60**: p. 2139-54.
- [84] Rahimpour, S. and S. Taghian Dinani, Lycopene extraction from tomato processing waste using ultrasound and cell-wall degrading enzymes. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2018. **12**: p. 2394-2403.
- [85] Solaberrieta, I., et al., Recovery of Antioxidants from Tomato Seed Industrial Wastes by Microwave-Assisted and Ultrasound-Assisted Extraction. *Foods*, 2022. **11**: p. 3068.
- [86] อนุสรณ์ วงษ์ไวย, มณฑา หมีไพรพฤกษ์, สิริลักษณ์ ประเสริฐบำรุง, ดวงกมล สีทา และ มณฑา หมีไพรพฤกษ์, สารกาบาและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของข้าวกล้องงอกหอม ปทุมธานี 1 ในน้ำแช่ 4 ชนิด. 2561.

- [87] อัญชลี กนิกรรัตน์, การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่วเหลือง และกากถั่วเขียว เพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส. 2548.
- [88] Ma, J., et al., Extraction of flavonoids from black mulberry wine residues and their antioxidant and anticancer activity in vitro. *Heliyon*, 2024. **10**(10): p. e31518.
- [89] Rice-Evans, C.A., et al., The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res*, 1995. **22**(4): p. 375-83.
- [90] Di Paola Naranjo, R.D., et al., Hydrophilic antioxidants from Andean tomato landraces assessed by their bioactivities in vitro and in vivo. *Food Chemistry*, 2016. **206**: p. 146-155.
- [91] Kruk, J., et al., Antioxidative properties of phenolic compounds and their effect on oxidative stress induced by severe physical exercise. *J Physiol Sci*, 2022. **72**(1): p. 19.
- [92] Muraina, I., O. Adesanya, and S. Abam, DATA ANALYTICS EVALUATION METRICS ESSENTIALS: MEASURING MODEL PERFORMANCE IN CLASSIFICATION AND REGRESSION. 2023.
- [93] Cerit, İ., et al., Effects of cooking on glutathione, cysteine, beta-carotene, ascorbic acid concentrations and antioxidant activity of red bell peppers (*Capsicum annum* L.). *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 2025. **39**: p. 101092.
- [94] Tian, J. and D.L. Kaufman, The GABA and GABA-Receptor System in Inflammation, Anti-Tumor Immune Responses, and COVID-19. *Biomedicines*, 2023. **11**(2).
- [95] Zhang, Z., et al., Immunomodulatory Activity of Low Molecular-Weight Peptides from *Nibea japonica* in RAW264.7 Cells via NF-**KB** Pathway. *Mar Drugs*, 2019. **17**(7).

- [96] Silaste, M.L., et al., Tomato juice decreases LDL cholesterol levels and increases LDL resistance to oxidation. *Br J Nutr*, 2007. **98**(6): p. 1251-8.
- [97] Boufeldja, L., et al., The Impact of Elevated Atmospheric Carbon Dioxide Exposure on Magic Tomatoes' Nutrition–Health Properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023. **24**: p. 12815.
- [98] Zhong, R., et al., Anti-inflammatory activity of flavonols via inhibiting MAPK and NF- κ B signaling pathways in RAW264.7 macrophages. *Current Research in Food Science*, 2022. **5**: p. 1176-1184.





ภาคผนวก ก
วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ก 1. ปริมาณความชื้น (% moisture)

ชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอนมาประมาณ 2.XXX กรัมให้เป็นน้ำหนักสด อบใน hot-air oven ที่ อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทั้งตัวอย่างให้เย็นใน desiccator แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำไปอบต่อใน Hot-air oven 30 นาที ทำซ้ำจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ได้เป็นน้ำหนักแห้ง จากนั้น คำนวณหาความชื้นตามสูตรคำนวณ

$$\text{Moisture content (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักสด} - \text{น้ำหนักแห้ง}}{\text{น้ำหนักสด}} \times 100$$

ก 2. ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl method (AOAC, 2000)

วิเคราะห์จากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในกากมะเขือเทศ (Total nitrogen) แล้วนำมาคูณกับค่า Empirical factor ของอาหารชนิดต่าง ๆ โดยในการทดลองนี้ใช้ค่า 6.25

การเตรียมสารเคมี

1. เตรียม modified methyl red indicator เตรียมโดยการชั่งสาร bromocresol green 1.250 กรัม และ methylene blue 0.825 กรัม ละลายด้วยเอธานอลร้อยละ 90 ปริมาตรเป็น 1 ลิตร
2. สารละลาย 4 นอร์มัล โซเดียมไฮดรอกไซด์ เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 40 กรัม ในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่มีฝาปิด
3. สารละลาย 0.1 นอร์มัล กรดซัลฟูริก เตรียมโดยละลายกรดซัลฟูริก 1 นอร์มัล ปริมาณ 2.719 มิลลิลิตร ลงในขวดเชิงปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำ ากล้นเขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์

นำตัวอย่างจำนวน 2 กรัม ใส่ลงในหลอดตัวอย่าง (digestion tube) เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงในแต่ละหลอดปริมาณ 20 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ Kjeltab 1 เม็ด เตรียม blank 1 หลอด โดยเติมเฉพาะ กรดซัลฟูริกและ Kjeltab เท่านั้น นำหลอดไปวางลงในเครื่องย่อยสลาย แล้วปรับปุ่มให้ความร้อนไป หมายเลข 10 (จะให้อุณหภูมิภายในหลอดทดลองประมาณ 330°C) ย่อยสลายตัวอย่าง จนกระทั่งสารละลายใส แล้วย่อยสลายต่อไปอีก 20-30 นาที เพื่อให้การย่อยสลายเป็นไปอย่างสมบูรณ์ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำตัวอย่างไปกลั่นไนโตรเจนโดยดวงสารละลายอิมตัวกรดบอริก 50 – 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม modified methyl red indicator ลงไป 2 – 3 หยด แล้วนำไปวางใต้ เครื่องกลั่น Buchi 320 โดยให้สายยางที่นำแอมโมเนียจุ่มอยู่ใต้สารละลายกรดบอริก จากนั้นนำ สารละลายในหลอด Kjeldahl ที่ย่อยสลายจนใสและ เย็นแล้วมา

วางในเครื่องกลั่น เติมน้ำให้ได้ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 80–100 มิลลิลิตร รองรับแอมโมเนียที่ เกิดขึ้นในสารละลายกรดบอริกที่เตรียมไว้ แล้วล้างปลายสายยาง ภายนอกด้วยน้ำกลั่นจำนวนเล็กน้อยลงในขวดรูปชมพู่ที่รองรับ นำขวดรูปชมพู่ที่รองรับแอมโมเนีย จากนั้นนำไปไทเทรตด้วยสารละลาย มาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มัล จนสารละลายเปลี่ยนจากสี เขียวเป็นสีเทาแกมม่วง แล้วนำมา คำนวณหาปริมาณโปรตีนตามสูตรคำนวณดังนี้

$$\% N = \frac{0.014 A (B - C)}{D} \times 100$$

โดยที่ A = ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มัล

B = มิลลิลิตรของกรดซัลฟูริกที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง

C = มิลลิลิตรของกรดที่ใช้ในการไทเทรต blank

D = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

$$\% \text{ Protein} = \% \text{ Nitrogen} \times \text{Emperical factor}$$

ก 3. ปริมาณไขมัน โดยใช้ soxhlet (AOAC, 2000)

สารเคมี

- petroleum ether

การวิเคราะห์

นำ round bottom flask ขนาด 250 มิลลิลิตร และ glass bead 3 เม็ด ไปอบที่อุณหภูมิที่ 100 องศา เซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น 30–60 นาที ใน desiccator ชั่งน้ำหนัก (W1) แล้ว นำไปติดตั้งกับชุด soxhlet ซึ่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ประมาณ 10 กรัม (W) ใส่ลงใน porous cup ที่ ทำจากกระดาษ แล้วปิดทับด้วยก้อนสำลี แล้วนำไปติดตั้งไว้กับชุด soxhlet เติมน้ำมัน petroleum ether 200 มิลลิลิตร ลงไปใน round bottom flask แล้วให้ความร้อน โดยให้น้ำมัน petroleum ether เดือดและควบแน่น ลงใน porous cup ประมาณ 3–4 หยดต่อวินาที ทำการสกัด เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการระเหย petroleum ether ที่อยู่ใน round bottom flask ออกไปจนหมด (petroleum ether นี้มี crude fat ที่ถูกสกัดออกมาจาก ตัวอย่างละลายอยู่) แล้วนำไปอบที่ 100°C ประมาณ 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator ชั่งน้ำหนัก (W2) จากนั้นนำมาหาปริมาณไขมันโดย คำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{ร้อยละของไขมัน} = \frac{W2 - W1}{W} \times 100$$

โดยที่ W = น้ำหนักตัวอย่าง

W1 = น้ำหนักของ round bottom flask และ glass bead

W2 = น้ำหนักของ round bottom flask, glass bead และ fat

ก 4. ปริมาณเยื่อใย โดย Acid detergent digestion (AOAC, 2000)

การเตรียมสารเคมี

- สารละลายกรดซัลฟูริกร้อยละ 1.25 เตรียมโดยเติมสารละลายกรดซัลฟูริก 12.50 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1 ลิตร ที่มีน้ำกลั่นแล้วเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกับและปรับปริมาตร เป็น 1 ลิตร
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 1.25 เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 12.50 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร
- แอลกอฮอล์ร้อยละ 95 เตรียมโดยละลายแอลกอฮอล์ 960 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำ กลั่นเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 กรัม และ glass bead 3 เม็ด ในถุงสำหรับบรรจุตัวอย่างที่ชั่งน้ำหนักแล้ว ใส่ในปิกรอร์สำหรับย่อย แล้วเติมร้อยละ 1.25 กรดซัลฟูริกที่ต้มเดือดประมาณ 500 มิลลิลิตร ให้ความร้อน จนเดือดนาน 30 นาทีล้างกากด้วยน้ำร้อนประมาณ 200 มิลลิลิตร จนกรดหมด แล้วจึงเติม 1.25 เปอร์เซ็นต์ ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ต้มเดือดประมาณ 500 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนเดือดนาน 30 นาทีล้างกากด้วยน้ำร้อนประมาณ 200 มิลลิลิตร จนต่างหมดแล้วเอา glass bead ออกมาแล้วล้างกาก ด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ประมาณ 15 – 20 มิลลิลิตร นำถุงบรรจุกากตัวอย่าง ใส่ลงในครูชีเบล และ ใช้แอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ชะล้างจากผ้ากรองลงในครูชีเบล แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 130 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำออกมาทิ้งให้เย็นใน desiccator ชั่งน้ำหนัก (W1) นำครูชีเบลและ กากหลังจากอบแห้งแล้วไปเผาใน furnace ที่อุณหภูมิ 600°C นานประมาณ 60 นาที นำออกมาทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วจึงชั่งน้ำหนัก (W2) จากนั้นคำนวณหาค่าปริมาณเยื่อใยตามสูตร คำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณเยื่อใย (ร้อยละ)} = \frac{(W1 - W2)}{W} \times 100$$

โดยที่ W = น้ำหนักของตัวอย่าง

W1 = น้ำหนักของครูชีเบลและกากหลังจากอบแห้งแล้ว

$W2$ = น้ำหนักของครุชชีเบลและถ้ำหลังจากเผาแล้ว

ก 5. ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)

นำครุชชีเบลพร้อมฝาปิดเผาใน furnace ที่อุณหภูมิ 600°C นานประมาณ 15 นาที แล้วนำ ออกมาทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก ชั่งตัวอย่างใส่ในครุชชีเบลประมาณ 2–4 กรัม หรือให้ปริมาณของตัวอย่างสูงประมาณครึ่งหนึ่งของความสูงครุชชีเบล บันทึกน้ำหนักของครุชชีเบลและตัวอย่าง ($W1$) นำไปอบใน hot-air oven ที่อุณหภูมิประมาณ 100°C นาน 30 นาทีหรือจนตัวอย่างเริ่ม เป็นสีดำ จึงนำไปเผาใน furnace ที่อุณหภูมิ 600°C โดยเปิดฝาครุชชีเบลไว้อีก 2 ชั่วโมง หรือจนตัวอย่างเป็นเถ้าสีขาวหรือสีเทา นำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนักของครุชชีเบลพร้อมฝาปิดและถ้ำ ($W2$) จากนั้นคำนวณหาปริมาณเถ้าจากสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)} = \frac{W - (W1 - W2)}{W} \times 100$$

โดยที่ W = น้ำหนักของตัวอย่าง

$W1$ = น้ำหนักของครุชชีเบลและตัวอย่างก่อนเผา

$W2$ = น้ำหนักของครุชชีเบลและถ้ำหลังเผา

ก 6. ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

คาร์โบไฮเดรต (%) = $100 - [\text{ร้อยละของ (ความชื้น + โปรตีน + ไขมัน + เถ้า + เยื่อใย)}]$



ภาคผนวก ข

ตารางที่ 4-2 ร้อยละผลได้ของสารสกัดจากกากมะเขือเทศด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE)

เวลา (นาที)	ร้อยละความเข้มข้นเอนไซม์	ร้อยละผลได้
0	0	10.52 ⁱ ±0.20
	5	35.02 ^s ±0.41
	10	31.57 ^h ±0.33
	15	36.17 ^f ±0.74
15	0	6.54 ^k ±0.23
	5	38.21 ^d ±0.15
	10	38.74 ^{cd} ±0.44
	15	37.12 ^e ±0.10
30	0	5.64 ^l ±0.31
	5	37.30 ^e ±0.22
	10	41.47 ^b ±0.31
	15	36.13 ^f ±0.36
45	0	8.77 ^j ±0.30
	5	39.05 ^c ±0.29
	10	46.79 ^a ±0.19
	15	42.03 ^b ±0.37

a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4-3 ปริมาณโปรตีนของสารสกัดจากกากมะเขือเทศด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE)

เวลา (นาทื)	ร้อยละความเข้มข้นเอนไซม์	ร้อยละโปรตีน
0	0	2.5210 ^{ef} ±1.48
	5	3.0625 ^{ef} ±1.48
	10	4.8691 ^{ef} ±2.14
	15	5.9742 ^e ±2.33
15	0	1.2946 ^f ±1.05
	5	4.1560 ^{ef} ±1.47
	10	3.9265 ^{ef} ±1.83
	15	10.2141 ^d ±1.89
30	0	2.2386 ^{ef} ±1.66
	5	4.4152 ^{ef} ±0.69
	10	10.2141 ^d ±1.89
	15	14.4539 ^c ±2.50
45	0	20.5506 ^b ±4.79
	5	23.5139 ^{ab} ±3.35
	10	24.6073 ^{ab} ±3.79
	15	26.0155 ^a ±4.04

a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตาราง 4-4 ปริมาณกรดกลูตามิกของสารสกัดจากกากมะเขือเทศด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE)

เวลา (นาทื)	รอยละความเข้มข้นเอนไซม์	รอยละโปรตีน
0	0	2.5210 ^j ±1.48
	5	3.0625 ^{ij} ±1.48
	10	4.8691 ^{efg} ±2.14
	15	5.9742 ^{cde} ±2.33
15	0	1.2946 ^{hij} ±1.05
	5	4.1560 ^{fghi} ±1.47
	10	3.9265 ^{efg} ±1.83
	15	10.2141 ^c ±1.89
30	0	2.2386 ^{ghij} ±1.66
	5	4.4152 ^{fgh} ±0.69
	10	10.2141 ^b ±1.89
	15	14.4539 ^b ±2.50
45	0	20.5506 ^c ±4.79
	5	23.5139 ^c ±3.35
	10	24.6073 ^a ±3.79
	15	26.0155 ^{ab} ±4.04

a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4-5 ตารางแสดงปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

เวลา (นาทีก)	ร้อยละความเข้มข้นเอโนไซม์	ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100g)
0	0	886.52 ^d ±103.38
	5	5129.66 ^c ±539.50
	10	5847.30 ^b ±107.78
	15	6200 ^{ab} ±65.84
15	0	943.60 ^d ±37.07
	5	5800.97 ^b ±96.23
	10	6088.48 ^b ±125.53
	15	6081.37 ^b ±138.09
30	0	913.30 ^d ±23.18
	5	5092.40 ^c ±397.80
	10	5937.75 ^b ±63.50
	15	6055.88 ^b ±199.07
45	0	918.24 ^d ±11.67
	5	6140.69 ^b ±425.11
	10	6223.28 ^{ab} ±127.22
	15	6608.33 ^a ±64.33

a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4-6 ตารางแสดงปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

เวลา (นาทีก)	ร้อยละความเข้มข้นเอทานอล	ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/100g)
0	0	455.78 ^g ±20.54
	5	2229.32 ^{ef} ±120.85
	10	2438.54 ^e ±311.53
	15	3426.36 ^d ±142.92
15	0	391.92 ^g ±84.15
	5	1765.67 ^f ±70.22
	10	3041.44 ^d ±147.71
	15	4611.00 ^c ±424.50
30	0	447.72 ^g ±23.52
	5	1830.55 ^f ±258.61
	10	4144.43 ^c ±277.06
	15	5585.47 ^d ±163.98
45	0	394.68 ^g ±42.78
	5	3112.15 ^d ±553.71
	10	5996.12 ^{ab} ±422.43
	15	6195.14 ^a ±420.00

a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4-9 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH• ของสารสกัดจากกากมะเขือเทศที่สกัดด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE)

เวลา (นาทื)	ร้อยละความเข้มข้นเอนไซม์	ร้อยละ DPPH•
0	0	11.15 ^g ±0.49
	5	59.36 ^e ±1.33
	10	68.42 ^{abc} ±0.53
	15	65.33 ^d ±2.56
15	0	12.44 ^g ±1.18
	5	53.63 ^f ±1.93
	10	59.67 ^e ±0.69
	15	66.68 ^{bcd} ±0.77
30	0	11.04 ^g ±0.77
	5	59.39 ^e ±2.38
	10	66.06 ^{cd} ±2.22
	15	69.29 ^{ab} ±0.61
45	0	11.63 ^g ±0.00
	5	65.39 ^d ±1.63
	10	70.18 ^a ±1.56
	15	69.99 ^a ±1.41

a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4-10 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS•+ ของสารสกัดจากกากมะเขือเทศด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE)

เวลา (นาทื)	ร้อยละความเข้มข้นเอนไซม์	ร้อยละ ABTS•+
0	0	14.87 ^g ±0.07
	5	77.64 ^f ±0.94
	10	79.66 ^{ef} ±2.67
	15	81.48 ^{de} ±2.24
15	0	13.97 ^g ±0.71
	5	83.64 ^{bcd} ±1.80
	10	82.00 ^{cde} ±0.36
	15	84.25 ^{bd} ±0.39
30	0	14.58 ^g ±0.01
	5	79.61 ^{ef} ±1.79
	10	81.68 ^{cde} ±1.34
	15	85.03 ^{ab} ±0.35
45	0	14.60 ^g ±0.01
	5	78.44 ^f ±1.81
	10	84.82 ^{ab} ±0.16
	15	87.26 ^a ±0.37

a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4-11 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ Hydroxyl radical scavenging activity ของสารสกัดจากกากมะเขือเทศด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE)

เวลา (นาที)	ร้อยละความเข้มข้นเอนไซม์	ร้อยละ Hydroxyl
0	0	16.06 ^h ±1.56
	5	68.71 ^g ±0.22
	10	81.85 ^d ±3.82
	15	94.49 ^{abc} ±2.68
15	0	19.41 ^h ±1.84
	5	74.05 ^f ±1.43
	10	86.50 ^{cd} ±5.15
	15	97.81 ^a ±3.54
30	0	20.02 ^h ±1.49
	5	90.20 ^{cd} ±3.84
	10	90.79 ^{bc} ±6.69
	15	95.41 ^{ab} ±1.31
45	0	18.24 ^h ±2.18
	5	94.47 ^{abc} ±2.03
	10	97.38 ^a ±3.31
	15	99.18 ^a ±0.97

a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4-12 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ Superoxide radical scavenging activity ของสารสกัดจากกากมะเขือเทศด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE)

เวลา (นาที)	ร้อยละความเข้มข้นเอนไซม์	ร้อยละ Superoxide
0	0	ND
	5	14.88 ^{fg} ±1.99
	10	16.87 ^{ef} ±2.47
	15	18.53 ^{de} ±0.49
15	0	ND
	5	14.64 ^{fg} ±0.82
	10	17.27 ^{ef} ±1.03
	15	21.47 ^{cd} ±1.02
30	0	ND
	5	12.19 ^s ±3.46
	10	16.45 ^{ef} ±1.19
	15	27.13 ^b ±3.28
45	0	ND
	5	15.56 ^{ef} ±0.67
	10	21.94 ^c ±0.65
	15	30.29 ^a ±0.44

a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4-13 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ Ferric Reducing Antioxidant Power ของ สารสกัดจากกากมะเขือเทศด้วยโบรมิเลนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (enz + UAE)

เวลา (นาทื)	รอยละความเข้มข้นเอนไซม์	รอยละ FRAP
0	0	0.026 ^g ±0.00
	5	0.033 ^e ±0.00
	10	0.051 ^{abc} ±0.00
	15	0.119 ^d ±0.01
15	0	0.030 ^g ±0.00
	5	0.071 ^f ±0.00
	10	0.084 ^e ±0.00
	15	0.118 ^{bcd} ±0.02
30	0	0.035 ^g ±0.00
	5	0.132 ^e ±0.01
	10	0.132 ^{cd} ±0.01
	15	0.147 ^{ab} ±0.00
45	0	0.040 ^g ±0.00
	5	0.122 ^d ±0.01
	10	0.254 ^a ±0.01
	15	0.153 ^a ±0.00

a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



ภาคผนวก ค

แบบทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส

Sensory analysis form (Quantitative descriptive analysis)

Product: Umami powder from tomato

Name: Date:

Taste the sample and give score how much you feel each of the characteristics. You can taste the sample more than once.



Characteristics	Sample																																					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32	T33	T34	T35	T36		
Odor																																						
Tomato																																						
Sour																																						
Salty																																						
Sweet																																						
Taste																																						
Umami																																						
Sweet																																						
Salty																																						
Sourness																																						



	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32	T33	T34	T35	T36
Overall acceptance																																				

Comments:

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวพชรพร พุทธิงกูร
ชื่อวิทยานิพนธ์	การสกัดสารเสริมรสเชิงหน้าที่จากกากมะเขือเทศด้วยเอนไซม์ร่วมกับ คลื่นเสียงความถี่สูง
สาขาวิชา	เคมีอุตสาหกรรม
ประวัติ	มัธยมต้น โรงเรียนเบญจมราชานุสรณ์ มัธยมปลาย โรงเรียนเบญจมราชานุสรณ์ ปริญญาตรี ภาควิชาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

