

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญชนิดหนึ่งของเนื้อเยื่อพืช โดยพบอยู่ในระหว่างเส้นใยเซลลูโลสในผนังเซลล์ และแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้ 3 กลุ่ม คือ ไซแลน (xylan) แมนแนน (mannan) และกาแล็กแทน (galactan) (Goodwin and Mercer, 1983) โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์หลายชนิด และเรียกชื่อพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีมากที่สุดไว้ในอันดับสุดท้าย เช่น กลูโคแมนแนน (glucomannan) เป็นเฮมิเซลลูโลสที่มีส่วนประกอบของโครงสร้างเป็นแมนโนส (mannose) มากกว่ากลูโคส (glucose) เป็นต้น ในทางโภชนาการเฮมิเซลลูโลสเป็นสารอาหารที่ช่วยให้ระบบขับถ่ายทำงานได้ดี ช่วยดูดซับไขมัน ลดระดับกลูโคสในเลือดซึ่งจะเพิ่มขึ้นช่วงหนึ่งหลังรับประทานอาหาร และช่วยให้มื้ออาหารเป็นเวลานานเนื่องจากเป็นสารอาหารที่ไม่สามารถถูกย่อยในระบบทางเดินอาหาร (Mongeau *et al.*, 1999) ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสำเร็จรูปประเภทเส้นใย (fiber) ซึ่งประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสเพื่อช่วยให้บริโภคน้ำอาหารประเภทนี้ได้สะดวกขึ้น เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่สามารถใช้ผลิตเจลที่อุ้มน้ำ (hydrogel) (Gabrielli *et al.*, 2000) พอลิเมอร์ชีวภาพประจุบวก (cationic biopolymer) (Ebringerova *et al.*, 1994) และสารให้ความหวานซึ่งมีคาร์บอน 5 อะตอมและมีกลุ่มไฮดรอกซีจำนวนมาก (five-carbon polyol sweetener) เช่น ไซลิตอล (xylitol) (Dominguez *et al.*, 1997)

มะละกอบอกเป็นไม้ผลที่ปลูกทั่วไปในประเทศไทย ซึ่งมีทั้งที่ปลูกไว้ในครัวเรือนและปลูกเป็นสินค้าทางการเกษตร ผลมะละกอบอกสามารถรับประทานได้ทั้งผลดิบและผลสุก สำหรับเนื้อมะละกอดิบเป็นวัตถุดิบในการทำส้มตำและมะละกอดอง ส่วนเปลือกมะละกอนั้นเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานคองมะละกอดิบในประเทศไทยจำนวนมากกว่่าพันตันต่อปี (ภาวิณี และคณะ, 2545) กลิ่นเหม็นที่เกิดจากการเน่าของเปลือกมะละกอกทำให้ทางโรงงานต้องกำจัดด้วยการฝังกลบ ซึ่งสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย ดังนั้นเพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับเปลือกมะละกอกจึงได้แยกเฮมิเซลลูโลสจากเปลือกมะละกอดิบ พร้อมทั้งหาชนิดของโมโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) ที่เป็นส่วนประกอบ อีกทั้ง

ได้ทำการทดลองกับเนื้อมะละกอดิบควบคู่กัน ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเพิ่มมูลค่าให้กับเปลือกและเนื้อมะละกอ

1.2 สรุปสาระสำคัญและบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 มะละกอ

มะละกอ (*Carica papaya* L., family Caricaceae) เป็นพืชที่ปลูกได้ง่ายในพื้นที่ที่มีอากาศร้อนชื้น เช่นประเทศไทย ผลมะละกอใช้บริโภคได้ทั้งดิบและสุก อีกทั้งใช้ประกอบอาหารได้ทั้งคาวและหวาน ปัจจุบันพันธุ์มะละกอที่ปลูกในประเทศไทยส่วนหนึ่งเป็นลูกผสมที่มาจากพันธุ์ต่างประเทศ เพื่อให้ได้ผลผลิตตรงตามความนิยมของต่างประเทศ โดยธรรมชาติของมะละกอนั้นเป็นพืชที่ผสมข้ามต้นข้ามดอกได้ง่าย จึงทำให้เกิดการกลายพันธุ์ และในการขยายพันธุ์ส่วนมากมักจะใช้วิธีเพาะเมล็ดที่ได้จากธรรมชาติมากกว่าการใช้วิธีอื่น จึงทำให้มะละกอกลายพันธุ์ไปเรื่อยๆ ในประเทศไทยมีมะละกอที่รู้จักกันดีได้แก่ พันธุ์แขกดำ โกโก้ และปากช่อง 1 (วิชัย และคณะ, 2542) จากข้อมูลในช่วงปี พ.ศ. 2534-2545 ประเทศไทยได้ส่งออกผลมะละกอสดไปขายต่างประเทศเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ โดยในปี พ.ศ. 2534 มีการส่งออกเป็นจำนวน 89 เมตริกตัน ด้วยมูลค่า 936,000 บาท และมีการส่งออกเพิ่มขึ้นในปี พ.ศ. 2545 ซึ่งมีการส่งออกในปริมาณ 2,171 เมตริกตัน เป็นมูลค่า 31.4 ล้านบาท (นนุชและสมคิด, 2546) นอกจากการบริโภคผลดิบและสุกแล้วมะละกอยังถูกแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ เพื่อส่งออกจำหน่ายยังต่างประเทศ เช่น มะละกอน้ำเชื่อมบรรจุกระป๋อง มะละกอแช่อิ่ม และอาหารหมักดองต่างๆ เป็นต้น

การใช้เนื้อมะละกอเพื่อการประกอบอาหารและเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ส้มตำ ซี้แซ่กน่าย มะละกอดองสามรส มะละกอดองเค้าเขียว มะละกอดองเค็มกับขิงแก่ ตังน่าย มะละกอ มะละกอดิบหวานหรือมะละกอเส้น แยมมะละกอ แกงส้มมะละกอบรรจุกระป๋อง แกงเหลืองมะละกอบรรจุกระป๋อง ฟรุตสลัดบรรจุกระป๋อง มะละกอแช่อิ่ม เยลลี่มะละกอ มะละกอแผ่น ซอสมะละกอ และน้ำมะละกอบรรจุกระป๋อง (วิชัย และคณะ, 2542) ทำให้มีขยะจากเปลือกมะละกอเป็นจำนวนมาก ในปัจจุบันมีการกำจัดขยะนี้โดยการฝังกลบ หรือนำไปใช้ประโยชน์โดยทำเป็นปุ๋ย อาหารสัตว์ ผลิตภัณฑ์ผสมอาหาร (นนุชและสมคิด, 2546)

มะละกอและผลิตภัณฑ์การแปรรูป เช่น น้ำมะละกอ และมะละกอแช่อิ่มมีคุณค่าทางโภชนาการที่ต่างกันดังแสดงในตาราง 1.1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าคาร์โบไฮเดรตที่รวมถึงเส้นใยอาหารเป็นชีวโมเลกุลที่มีในปริมาณที่มากกว่าองค์ประกอบชีวโมเลกุลอื่นๆ สำหรับเนื้อมะละกอประกอบด้วยเส้นใยอาหารจำพวก เฮมิเซลลูโลส เพกติน ลิกนิน และเซลลูโลส คิดเป็น 5.3, 9.5, 0.4 และ 9.7 % โดยน้ำหนักแห้ง (Vollendorf and Marlett, 1993)

ตาราง 1.1 คุณค่าทางโภชนาการของมะละกอและผลิตภัณฑ์ (FAO and US. Dept. of Health, 1972)

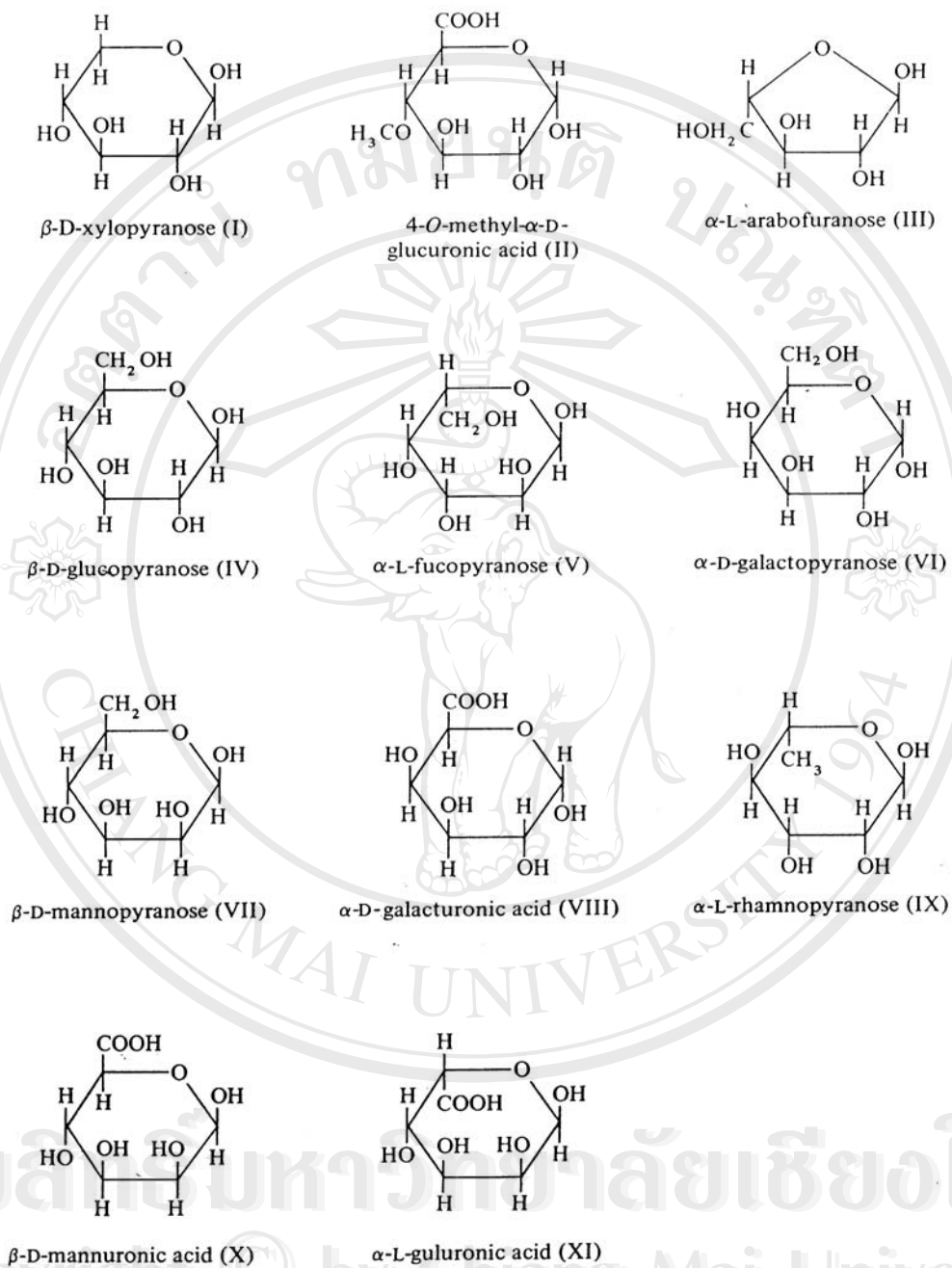
คุณค่าทางอาหาร	มะละกอสด		น้ำมะละกอ	น้ำมะละกอ	มะละกอแช่แข็ง
	ดิบ	สุก	สด	กระป๋อง	
พลังงาน, แคลอรี	26	45	69	68	273
ความชื้น, %	92.1	87.1	82.7	82.6	23.9
โปรตีน, %	1.0	0.5	*	*	0.3
ไขมัน, %	0.1	0.1	0.5	*	0.1
คาร์โบไฮเดรต (รวมเส้นใย), %	6.2	11.8	16.6	17.3	75.4
เส้นใย, %	0.9	0.5	0.1	0.2	0.2
เถ้า, %	0.6	0.5	0.2	0.1	0.3
แคลเซียม, มก/100กรัม	38	24	3	3	54
ฟอสฟอรัส, มก/100กรัม	20	22	1	1	20
เหล็ก, มก/100กรัม	0.3	0.7	0.4	0.2	2.4
โพแทสเซียม, มก/100กรัม	21.5	221	34	18	96
เบต้า-แคโรทีน, มก/100กรัม	15	710	340	*	0
วิตามินซี, มก/100กรัม	40	73	73	**	**
วิตามินบี 1, มก/100กรัม	0.2	0.3	0.1	0.1	**
วิตามินบี 2, มก/100กรัม	0.3	0.5	0.2	0.1	*

(*) = มีปริมาณเล็กน้อย, (**) = ไม่พบ

1.2.2 เฮมิเซลลูโลสในมะละกอและพืชชนิดต่างๆ

เฮมิเซลลูโลส เป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ในผนังเซลล์พืช ซึ่งทำหน้าที่เชื่อมประสานกลุ่มเส้นใยเซลลูโลสร่วมกับลิกนินและเพกตินประกอบกันเป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ ทำให้เซลล์พืชมีความแข็งแรงและคงรูป (Browning, 1967)

ในสายพอลิเมอร์ของเฮมิเซลลูโลสประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป โดยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวดังกล่าวนี้ ได้แก่ กลูโคส กาแล็กโทส (galactose) แมนโนส ไซโลส (xylose) แรมโนส (rhamnose) อะราบินโนส (arabinose) และกรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) [รูป 1.1] (Sjostrom, 1981) เฮมิเซลลูโลสถูกจำแนกออกเป็น 3 กลุ่มย่อย ตามชนิดและสัดส่วนปริมาณของน้ำตาลดังนี้



รูป 1.1 โครงสร้างของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลส (Goodwin and Mercer, 1983)

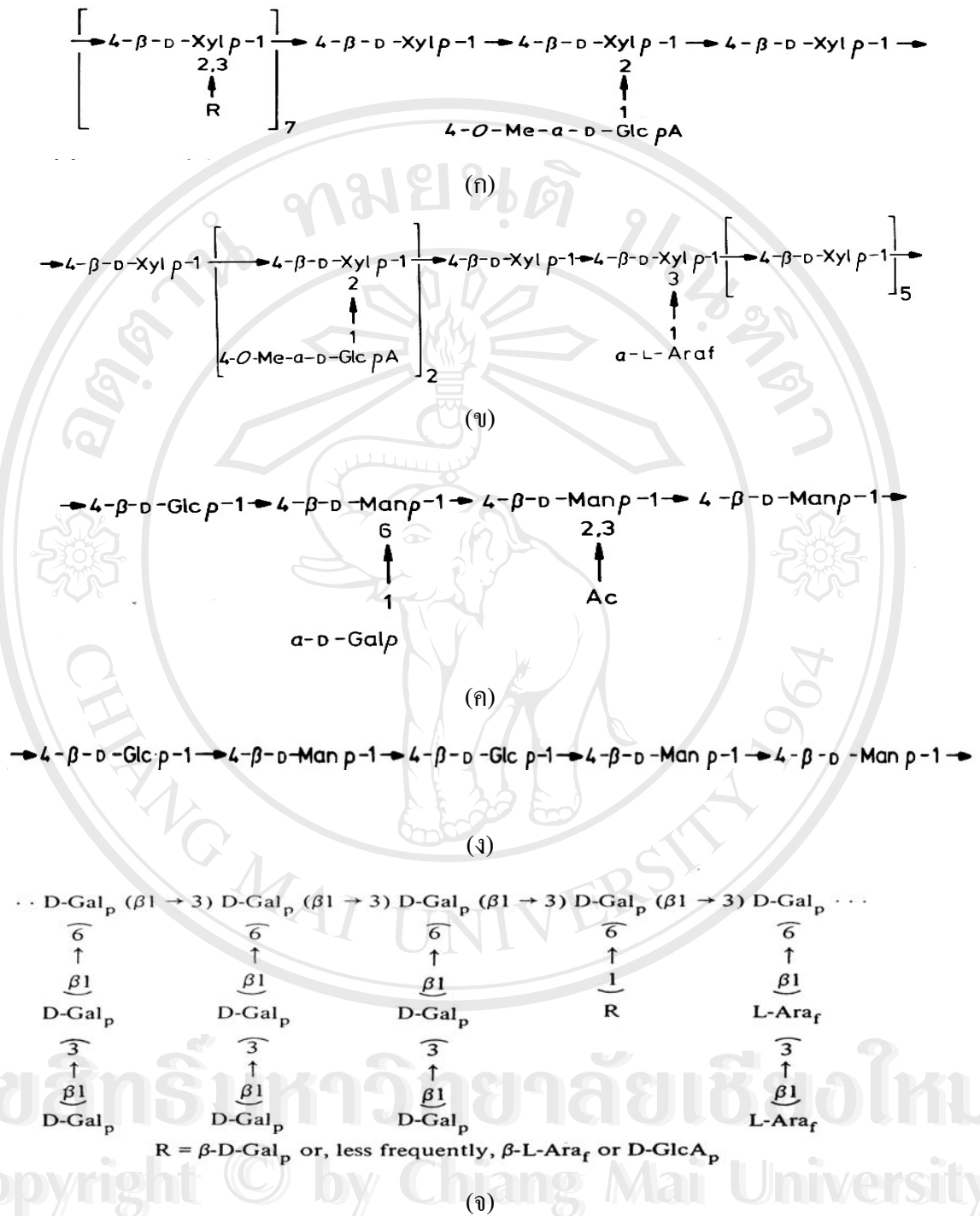
1. ไชเลน เป็นกลุ่มของเฮมิเซลลูโลสที่มีไฮโลสเป็นน้ำตาลองค์ประกอบหลัก ซึ่งอาจอยู่ในรูปของสายพอลิเมอร์หลักที่เชื่อมกันด้วยพันธะ $\beta(1\rightarrow4)$ หรือเป็นสายกิ่งจำนวนมากที่ต่อกับสายหลักด้วยพันธะ $\beta(1\rightarrow3)$ เช่น กลูคูโรโนไชลเลน (glucuronoxylan) ซึ่งเป็นเฮมิเซลลูโลสที่ประกอบด้วยสายหลักของไชลเลนและมี 4-O-methyl-D-glucuronic acid เป็นโมเลกุลข้างเคียง [รูป 1.2 (ก)] (Huan, 1970) ในขณะที่อะราบินوجلูคูโรโนไชลเลน (arabinoglucuronoxylan) เป็นเฮมิเซลลูโลสที่ประกอบด้วยไชลเลนเป็นสายพอลิเมอร์หลักโดยมีโมเลกุลสายข้างเป็น อะราบินอสไฮโลส และ 4-O-methyl-D-glucuronic acid ซึ่งเชื่อมต่อด้วยพันธะ $\alpha(1\rightarrow2)$, $\beta(1\rightarrow3)$ และ $\alpha(1\rightarrow3)$ ตามลำดับ [รูป 1.2 (ข)] (Schuerch, 1975)

2. แมนแนน เป็นเฮมิเซลลูโลสที่มีแมนโนสเป็นน้ำตาลองค์ประกอบหลัก เช่น กาแล็กโทกลูโคแมนแนน (galactoglucomannan) ซึ่งมีแมนโนส กาแล็กโทส กลูโคส เป็นองค์ประกอบของสายพอลิเมอร์หลักในอัตราส่วนของน้ำตาล 3:1:1 โดยเชื่อมระหว่างโมเลกุลแมนโนสในสายหลักและกลูโคสที่ต่อปลายสายแมนแนน ด้วยพันธะ $\beta(1\rightarrow4)$ และมีโมเลกุลของกาแล็กโทสเชื่อมต่อด้านข้างของสายหลักด้วยพันธะ $\alpha(1\rightarrow6)$ [รูป 1.2 (ค)] แต่ถ้าปริมาณกาแล็กโทสนี้น้อยมากหรือไม่มีเลยจะอยู่ในรูปของ กลูโคแมนแนน โดยมีโครงสร้างของสายหลักเป็นกลูโคสเชื่อมต่อกับ แมนโนสด้วยพันธะ $\beta(1\rightarrow4)$ ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 1:4 ดังรูป 1.2 (ง)

3. กาแล็กแทน (galactan) เป็นกลุ่มเฮมิเซลลูโลสที่ประกอบด้วยกาแล็กโทสเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนมากอยู่ในรูปของ อะราบินอกาแล็กแทน (arabinogalactan) ซึ่งมีสายหลักประกอบด้วยน้ำตาลกาแล็กโทสที่เชื่อมกันด้วยพันธะ $\beta(1\rightarrow3)$ และมีสายกิ่งที่ประกอบด้วยไดแซ็กคาไรด์ (disaccharide) ของกาแล็กโทสหรืออะราบินอสซึ่งเชื่อมต่อกับสายหลักด้วยพันธะ $(1\rightarrow6)$ [รูป 1.2 (จ)]

เฮมิเซลลูโลสที่พบในธรรมชาติแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้จากไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อน ในไม้เนื้อแข็งประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลสชนิดกลูคูโรโนไชลเลน และกลูโคแมนแนนในปริมาณร้อยละ 15-35 และ 2-5 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ในขณะที่ไม้เนื้ออ่อนประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลสชนิด กาแล็กโทกลูโคแมนแนน และอะราบินوجلูคูโรโนไชลเลนในปริมาณร้อยละ 12-20 และ 5-14 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ (McGinnis and Shafizadeh, 1980) โดยที่ปริมาณของเฮมิเซลลูโลสชนิดต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นที่พบในธรรมชาติจะมีความแตกต่างกันขึ้นกับ ชนิด สายพันธุ์พืช และส่วนประกอบของต้นพืช รวมถึงวิธีการสกัด ดังตัวอย่างต่อไปนี้

ในเนื้อผลไม้สดมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสมากกว่าในส่วนเปลือกและเยื่อหุ้มเมล็ด และเฮมิเซลลูโลสจากผลไม้สดที่สกัดด้วย 1 M KOH มีปริมาณมากกว่าการสกัดด้วย 4 M KOH (Thomas and Thibault, 2002)



รูป 1.2 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสแต่ละชนิด ได้แก่ กลูคูโรโนไซเลน (ก) อะราบิโนกลูคูโรโนไซเลน (ข) กาเล็กโทกลูโคแมนแนน (ค) กลูโคแมนแนน (ง) และอะราบิโนกาเล็กแทน (จ) (Gal= galactose, Glc= glucose, 4-O-Met-GlcA= 4-O-methyl-glucuronic acid, Ara= arabinose, Man= mannose, Xyl= xylose)

ในแต่ละชั้นของผนังเซลล์ซึ่งมีชั้นของพอลิแซ็กคาไรด์เชื่อมระหว่างเซลล์ ผนังเซลล์ชั้นที่ 1 และผนังเซลล์ชั้นที่ 2 ก็มีชนิดและปริมาณเฮมิเซลลูโลสที่ต่างกัน ดังเช่น การศึกษาเฮมิเซลลูโลสในเซลล์ต้นสนซึ่งจัดเป็นไม้เนื้ออ่อนพบว่า 67% ของสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่เชื่อมระหว่างเซลล์และผนังเซลล์ชั้นที่ 1 เป็นเฮมิเซลลูโลสที่มีองค์ประกอบหลักเป็นกาแล็กแทนและอะราแบน (araban) แต่ผนังเซลล์ชั้นที่ 2 ประกอบด้วยอะราบินโนไซแลน (arabinoxylan) และกลูโคแมนแนนเท่ากัน และในไม้เนื้อแข็งเช่น ต้นเบิร์ช (Birch) ก็มีชนิดและปริมาณของเฮมิเซลลูโลสในชั้นต่างๆ ของผนังเซลล์เหมือนในเซลล์ต้นสนแต่มีกลูคูโรโนไซแลนเป็นเฮมิเซลลูโลสชนิดหลัก (Huan, 1970)

ตัวอย่างของชนิดและปริมาณของเฮมิเซลลูโลสในพืชที่มีการศึกษาไว้ ได้แสดงไว้ในตาราง 1.2

ตาราง 1.2 ชนิดและปริมาณเฮมิเซลลูโลสในพืชชนิดต่างๆ

ชนิดของพืช	เฮมิเซลลูโลส		เอกสารอ้างอิง
	ชนิด	%	
ธัญพืช			
ฟางข้าวสาลี	อะราบินโนกลูคูโรโนไซแลน	18.9-26.7	Fang <i>et al.</i> , 1999, Sun and Tomkinson, 2002 Sun <i>et al.</i> , 2000 Kitayama <i>et al.</i> , 2000 Sun <i>et al.</i> , 2004
ฟางข้าว	อะราบินโนกลูคูโรโนไซแลน	67.2-88.5	
ข้าวฟ่าง	อะราบินโนไซแลน	9-16	
ชานอ้อย	อะราบินโนกลูคูโรโนไซแลน	16.1	
ผัก			
เห็ด	-	2.9	Vollendorf and Marlett, 1993
บร็อกโคลี	-	12.9	
มันเทศ	-	2.2	
ผลไม้			
กีวี (เนื้อ)	-	1.9	Doco <i>et al.</i> , 2003
มะละกอดิบ (เนื้อ)	-	5.3	
องุ่น (เนื้อ)	ไซโลกลูแคน	1.48	Thomas and Thibault, 2002
มะตูมญี่ปุ่น (เนื้อ)	ไซโลกลูแคน	2.6-3.2	
Sugar beet (กากเนื้อ)	อะราบินโนไซโลกลูแคน	9-10	Sun and Hughes, 1998

ซึ่งจะเห็นได้ว่าในธัญพืชมีเฮมิเซลลูโลสประเภทไซเลน ได้แก่ อะราบิโนกลูโคโรโนไซเลน และอะราบิโนไซเลน เป็นองค์ประกอบหลัก ในขณะที่ในผลไม้ไม่มีเฮมิเซลลูโลสประเภทกลูแคน ซึ่งได้แก่ ไซโลกลูแคน และอะราบิโนกลูแคน เป็นองค์ประกอบหลัก

1.2.2 การสกัดเฮมิเซลลูโลส

ในปี ค.ศ. 1891 Schulze เป็นผู้นิยามว่าเฮมิเซลลูโลสคือสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชที่สามารถสกัดได้โดยสารละลายเบสเจือจาง และไฮโดรไลสได้ด้วยกรดเกลือเจือจางที่อุณหภูมิสูง (Browning, 1967) การสกัดเฮมิเซลลูโลสด้วยสารละลายเบสทำได้โดยกำจัดองค์ประกอบเซลล์อื่นๆ เช่น แป้ง (starch) ลิพิด และรงควัตถุต่างๆ ออกไปก่อนด้วยการต้มในเอธานอล (Thomas and Thibault, 2002) หรือกำจัดรงควัตถุ และลิกนินโดยการฟอกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรท์ (Sun *et al.*, 2001) และแยกเพกตินออกโดยต้มใน 0.05 M HCl (Gabrielii *et al.*, 2000)

เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสละลายได้ดีในสารละลายเบสดังนั้นจึงสามารถแยกออกจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ ได้โดยสกัดด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ ชนิดและความเข้มข้นของสารละลายเบสที่ใช้และวิธีการสกัดมักขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่เป็นแหล่งของเฮมิเซลลูโลสที่ต้องการสกัด ซึ่งมีรายงานดังสรุปในตารางที่ 1.3

ตัวอย่างเช่น การสกัดเฮมิเซลลูโลสจากฟางข้าวสาลีด้วยสารละลาย 2% H_2O_2 ที่ปรับพีเอชเป็น 12.5 ด้วย 10% KOH (Fang *et al.*, 1999) เพื่อศึกษาคุณสมบัติการสกัด การกำจัดลิกนิน และการฟอกสีเฮมิเซลลูโลสของ H_2O_2 แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้ พบว่า การสกัดเฮมิเซลลูโลสด้วยสารละลาย H_2O_2 ให้ปริมาณผลผลิตน้อยกว่าการสกัดด้วย 10% KOH ก่อนฟอกสีด้วย 2% H_2O_2 ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลของการสกัด เฮมิเซลลูโลสจากฟางข้าวด้วย 0.5 M NaOH กับ 5% H_2O_2 (Sun *et al.*, 2000)

หลังจากการสกัดเฮมิเซลลูโลสด้วยสารละลายเบส ต้องปรับพีเอชสารละลายเฮมิเซลลูโลสที่ได้ให้เป็นกลาง และแยกไอออนอื่นออกด้วยไดอะไลซิส และทำแห้งด้วยการทำไลโอฟิลิเซชัน (lyophilization) (Mullin and Xu, 2000) หรือการทำแห้งด้วย spray-drying (Gabrielii *et al.*, 2000) หรือการตกตะกอนเฮมิเซลลูโลสด้วยเอธานอลปริมาตร 3-5 เท่าแล้วอบแห้ง (Sun *et al.*, 1998)

ตาราง 1.3 ความเข้มข้นของสารละลายเบสที่ใช้ในการสกัดเฮมิเซลลูโลสจากพืชชนิดต่างๆ

ชนิดของพืช	สารละลายที่ใช้ในการสกัดเฮมิเซลลูโลส		เอกสารอ้างอิง
	ชนิดของสารละลาย	ความเข้มข้น	
กาก sugar beet	KOH และ NaOH	10, 24% และ 7.5, 17.5%	Sun and Hughes (1998)
ฟางข้าวสาลี	KOH + H ₂ O ₂ pH 12.5	10% + 2%	Fang <i>et al.</i> (1999, 2002)
ไม้ aspen	KOH	0.5 M	Sun and Tomkinson (2002, 2003)
ฟางข้าว	NaOH	4%	Gabrielii <i>et al.</i> (2000)
ข้าวฟ่าง	NaOH + H ₂ O ₂ pH 11.5	05 M + 5%	Sun <i>et al.</i> (2000)
เมล็ดถั่วเหลือง	KOH	24%	Kitayama <i>et al.</i> (2000)
ผลมะตูมญี่ปุ่น	KOH	2 M	Mullin and Xu (2000)
องุ่น	KOH	1 และ 4 M	Thomas and Thibault (2002)
	KOH	4 M	Doco <i>et al.</i> (2003)

1.2.4 การวิเคราะห์

1.2.4.1 การวิเคราะห์น้ำตาลองค์ประกอบและกรดยูโรนิก

เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป โดยที่ชนิดและปริมาณน้ำตาลองค์ประกอบมีความสำคัญต่อการกำหนดลักษณะเฉพาะของเฮมิเซลลูโลสนั้นๆ

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส ซึ่งได้แก่ กลูโคส กาแล็กโตส ไซโลส แมนโนส และอะราบินอส รวมไปถึงน้ำตาลองค์ประกอบอื่นๆ เช่น แรมโนส และฟูโคส (fucose) ซึ่งพบปริมาณเพียงเล็กน้อยในเฮมิเซลลูโลส นิยมใช้เทคนิค Gas Chromatography (GC) (Sun *et al.*, 2000) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Mullin and Xu, 2000) (Sun and Tomkinson, 2002) การเตรียมตัวอย่างน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของเฮมิเซลลูโลสทำได้โดยการสลายเฮมิเซลลูโลสด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก (1-12 M) ที่ 100°C (Mullin and Xu, 1986) หรือด้วยอะซิดคลอไรด์ในเมทานอล 0.5 M ที่ 80°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (Bertaud *et al.*, 2002)

การวิเคราะห์น้ำตาลองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสด้วย GC ทำได้โดยการรีดิวซ์โมโนแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการสลายพันธะของเฮมิเซลลูโลสด้วยสารละลายโซเดียมโบโรไฮไดรด์ (sodium borohydride) ในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) ที่ 40°C เป็นเวลา 90 นาที และ

หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น จากนั้นเติมอะซิติกแอนไฮไดรด์ (acetic anhydride) เพื่อให้โมโนแซ็กคาไรด์อยู่ในรูปของอัลดิทอลอะซิเตต (aldital acetate) (Blakeney *et al.*, 1983) ซึ่งเป็นสารที่ระเหยได้ จากนั้นจึงสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) แล้ววิเคราะห์ด้วย GC เทียบกับอัลดิทอลอะซิเตตของน้ำตาลมาตรฐานโดยใช้คอลัมน์ที่เหมาะสม เช่น คอลัมน์ SP-2300 (Englyst *et al.*, 1992) คอลัมน์ Gaschrom Q (Kitayama *et al.*, 2000) และ คอลัมน์ DB-225 (Wang *et al.*, 2004)

สำหรับการวิเคราะห์น้ำตาลองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสด้วย HPLC สามารถวิเคราะห์จากสารละลายโมโนแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสด้วยกรดโดยตรงโดยไม่ต้องเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์ใดๆ การบ่งชี้ชนิดของน้ำตาลองค์ประกอบทำได้โดยเทียบกับเวลาริเทนชัน (retention time) กับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน โดยใช้คอลัมน์ Zorbax NH₂ และชะสารด้วยสารละลายอะซิโตไนโตรล 85% โดยปริมาตร (Benhura and Chidewe, 2002) หรือใช้คอลัมน์ C18 ซึ่งชะด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก $4 \times 10^{-3} \text{ M}$ (Thomas and Thibault, 2002)

ปริมาณกรดยูโรนิกในเฮมิเซลลูโลสสามารถหาได้จากสารละลายของเฮมิเซลลูโลสที่สลายด้วยกรด กรดยูโรนิกจะทำปฏิกิริยากับสารละลาย 3,5-dimethylphenol ในกรดอะซิติก (Englyst *et al.*, 1992)

1.2.4.2 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสด้วย FT-IR

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญของเฮมิเซลลูโลสนั้นเพื่อเปรียบเทียบกับลักษณะเฉพาะของ เฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีต่างๆ และจากพืชชนิดต่างกัน ทั้งนี้เพื่อศึกษาถึงผลกระทบของวิธีการสกัดที่มีต่อหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส ดังที่มีรายงานไว้ดังต่อไปนี้

FT-IR สเปกตรัมของเฮมิเซลลูโลสที่สกัดจาก sugar beet ด้วย 10% KOH และ 7.5% NaOH มีแบนด์ (band) ที่เกิดจากโปรตีนที่ 1546 cm^{-1} เหมือนกัน แต่ไม่ปรากฏแบนด์ดังกล่าวในสเปกตรัมที่สกัดด้วย 24% KOH และ 17.5% NaOH อย่างไรก็ตามเฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้ทั้ง 4 ตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันในแบนด์ที่เป็นลักษณะสำคัญของเฮมิเซลลูโลส ซึ่งได้แก่แบนด์ที่ 1640, 1322, 1417, 1164, 1036 และ 900 cm^{-1} ซึ่งเป็นแบนด์ที่เกิดจากกรดยูโรนิก (ในรูปเกลือ), C-H bending and wagging, O-H bending, C-O, C-O-C stretching และ C-OH bending (บางส่วน), C-OH bending และ β -glycosidic linkage (Sun and Hughes, 1998)

เฮมิเซลลูโลสจากฟางข้าวสาลีที่สกัดด้วยเบสในสภาวะที่แตกต่างกัน ซึ่งได้แก่การสกัดที่อุณหภูมิห้อง การสกัดที่สภาวะที่มี H_2O_2 ที่ 60°C และการสกัดด้วยน้ำร้อนที่ 90°C 1 ชั่วโมง ก่อน

สกัดด้วยเบส ให้ FT-IR สเปกตรัมที่เหมือนกัน ซึ่งแสดงว่าความร้อนและ H_2O_2 ไม่มีผลทำให้โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสเปลี่ยนแปลง (Fang *et al.*, 1999)

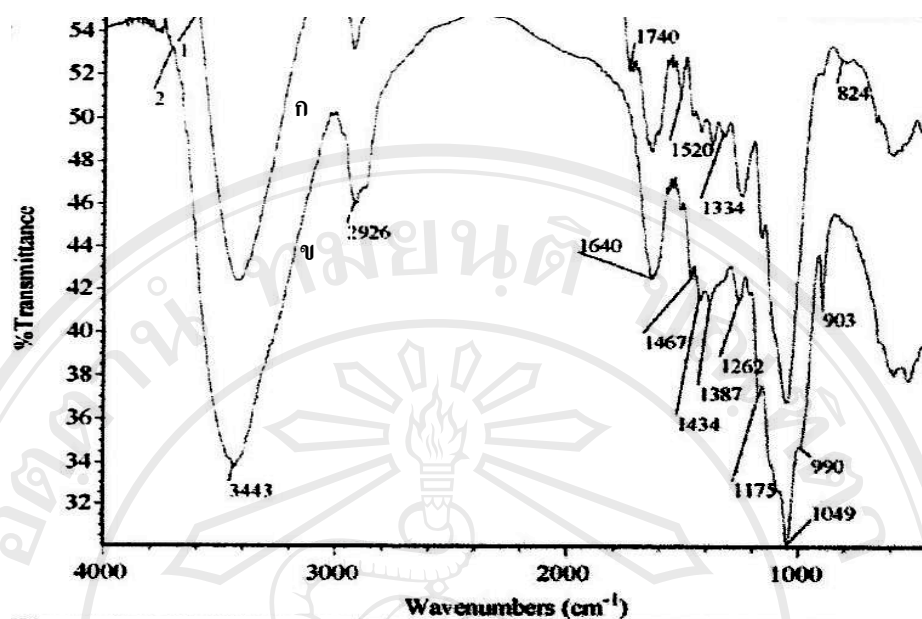
การสกัดเฮมิเซลลูโลสจากฟางข้าวแบบ 2 ขั้นตอน ด้วย NaOH และ 0-5% H_2O_2 พบว่าสเปกตรัมของเฮมิเซลลูโลสจากการสกัดฟางข้าวด้วย NaOH ที่ไม่มี H_2O_2 ไม่พบแบนด์ที่ 897 cm^{-1} ซึ่งเป็นแบนด์ของ β -glycosidic linkage เหมือนที่พบในสเปกตรัมของการสกัดด้วย H_2O_2 แสดงว่าเฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยเบสมีองค์ประกอบของสายหลักเป็นกลูโคส (α -glucans) ในขณะที่เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยเบส+ H_2O_2 มีน้ำตาลองค์ประกอบหลักเป็นไซโลส (Sun *et al.*, 2000)

เฮมิเซลลูโลสจากพืชโตไวจำพวก Poplar ที่สกัดด้วย NaOH ที่ความเข้มข้น 1.5, 3.0, 5.0, 7.5 และ 8.5 % ให้ FT-IR สเปกตรัมที่ไม่มีความแตกต่างกัน นั่นคือการสกัดด้วย NaOH ที่ความเข้มข้น ต่างกันไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญในโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสของพืชเหล่านี้ (Sun *et al.*, 2001)

เฮมิเซลลูโลสจากฟางข้าวสาลีที่สกัดด้วย 0.5 M KOH ร่วมกับการทำอัลตราโซนิเคชัน (ultrasonication) เป็นเวลา 20-35 นาที ให้ FT-IR สเปกตรัมที่แสดงหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญของเฮมิเซลลูโลสเหมือนกัน กับกรณีที่ไม่ใช้อัลตราโซนิเคชัน โดยทุกๆ สเปกตรัมไม่พบสัญญาณของหมู่คาร์บอนิล แสดงว่า การสกัดด้วยเบสทำให้เกิดการสลายพันธะเอสเทอร์ในเฮมิเซลลูโลสจากฟางข้าวสาลี (Sun and Tomkinson, 2002) ซึ่งก็ได้ผลเช่นเดียวกับสเปกตรัมของเฮมิเซลลูโลสจากฟางข้าวสาลีที่สกัดด้วย 0.5 M KOH และตามด้วย H_2O_2 ร่วมกับ TAED (Sun and Tomkinson, 2003) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัลตราโซนิเคชันและ H_2O_2 +TAED ไม่ได้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโดยรวมของเฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลสจากการสกัดขาน้อยด้วย 0.5 M NaOH ให้ FT-IR สเปกตรัมที่คล้ายคลึงกับเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำที่ 55°C [รูป 1.3] โดยมีแบนด์ของไซเลนที่อยู่ระหว่าง 1175 กับ 1000 cm^{-1} และมีแบนด์เล็กๆ 2 แบนด์ ที่ 1175 และ 990 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงสายข้างที่เป็นอะราบินโนส แต่มีความแตกต่างที่เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วย 0.5 M NaOH ไม่ปรากฏแบนด์ที่ 1740 cm^{-1} เหมือนในสเปกตรัมของเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำร้อน ซึ่งเป็นแบนด์ของหมู่เอซิดิลและหมู่เอสเทอร์ของกรดยูโรนิก ดังนั้นแสดงว่าการสกัดเฮมิเซลลูโลสด้วยสารละลายเบสทำให้เกิดการตัดพันธะเอสเทอร์ในเฮมิเซลลูโลส (Sun *et al.*, 2004)

ตาราง 1.4 แสดงแบนด์หลักๆ ใน FT-IR สเปกตรัมของเฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้จากพืชชนิดต่างๆ ในบางกรณีจะพบแบนด์ของลิกนินที่ 1540 cm^{-1} ซึ่งอาจติดมากับเฮมิเซลลูโลส



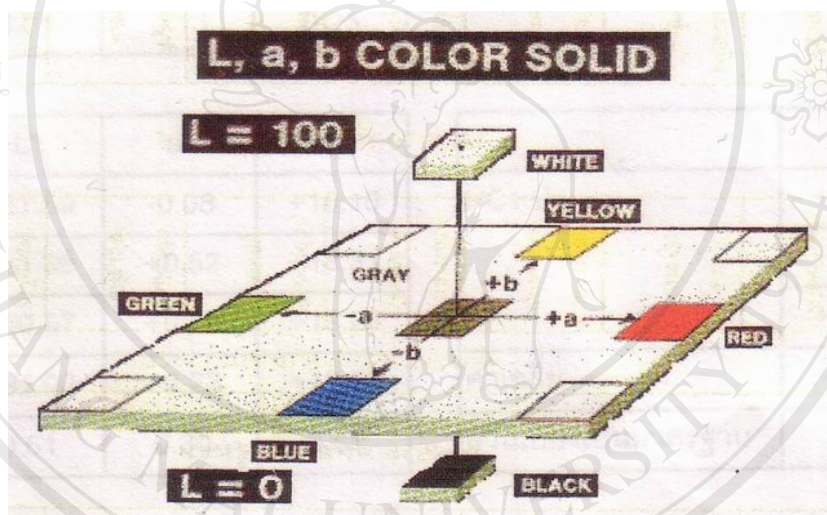
รูป 1.3 FT-IR สเปกตรัมของเฮมิเซลลูโลสจากขานอ้อยที่สกัดด้วยน้ำร้อน (ก) และ 0.5 M NaOH (ข)

ตาราง 1.4 ตำแหน่งของแบนด์ใน FT-IR สเปกตรัมที่แสดงหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญของเฮมิเซลลูโลส
(Sun and Tomkinson, 2002) (Sun *et al.*, 2004)

หมู่ฟังก์ชันหรือกลุ่มของโมเลกุล	wave number (cm ⁻¹)
O-H และ C-H stretching	3600-2800
Carbonyl group ของ uronic ester และหมู่ acetyl	1720-1700
absorbed water	1659-1573
-CH ₂ stretching และ C-H, O-H, -CH ₂ - bending	1475-1220
C-O, C-O-C stretching และ C-OH bending	1164
C-O-C stretching ของ xylans	1175-1000
C ₁ group ที่ β-glycosidic linkage	905-900

1.2.4.3 การวัดความเข้มระดับสีของผลิตภัณฑ์

การเปรียบเทียบสีของผลิตภัณฑ์ต่างๆ สามารถทำได้โดยการวัดความเข้มสีด้วยเครื่อง X-Rite CDM ซึ่งใช้ระบบ CIELAB วัดค่าการสะท้อนกลับของแสงจากการส่องแสงสีขาวไปกระทบกับผลิตภัณฑ์ ค่าที่วัดได้แสดงไว้ 3 ค่า คือ L, a และ b [รูป 1.4] โดยที่ค่า L เป็นค่าแทนความขาวมีค่าตั้งแต่ 0-100 ในขณะที่ค่า a เป็นค่าแทนช่วงสีเขียว-แดง ถ้าค่า a เป็นลบแสดงว่าวัตถุมีแนวโน้มสีไปทางสีเขียว แต่ถ้า a มีค่าเป็นบวกแสดงว่าวัตถุมีแนวโน้มสีไปทางสีแดง และค่า b เป็นค่าแทนช่วงสีน้ำเงิน-เหลือง ถ้าค่า b เป็นลบแสดงว่าวัตถุมีแนวโน้มสีไปทางสีน้ำเงิน แต่ถ้า b มีค่าเป็นบวกแสดงว่าวัตถุมีแนวโน้มสีไปทางสีเหลือง (CIELAB system)



รูป 1.4 การวัดความเข้มสีระบบ CIELAB

1.2.4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักด้วย Atomic Absorption Spectroscopy

การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักด้วย Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) จะต้องเตรียมสารตัวอย่างโดยย่อยสลายด้วยกรดไนตริกเข้มข้น ส่วนรายละเอียดของอุณหภูมิและระยะเวลานั้นขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่าง ตัวอย่างเช่นการทดลองกับพืชตระกูลถั่วด้วยสภาวะที่แตกต่างกัน 6 อย่าง ดังนี้ (Laing *et al.*, 2003)

1. สลายด้วย HNO_3 เข้มข้น ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ค้างคืน แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 120°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และเพิ่มเป็น 140°C จนเหลือสารละลาย 10 % ของปริมาตรเริ่มต้น

2. สลายด้วย HNO_3 เข้มข้น ที่ 90°C เป็นเวลา 45 นาที และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 140°C จนเหลือสารละลาย 10 % ของปริมาตรเริ่มต้น

3. สลายด้วยสารละลายผสมของ HNO_3 เข้มข้นและ 70% HClO_4 ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ค้างคืน แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 120°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และเพิ่มเป็น 175°C อีก 2 ชั่วโมง และเพิ่มต่อไปอีกเป็น 225°C เป็นเวลา 10 นาที

4. สลายด้วยสารละลายผสม HNO_3 เข้มข้น ที่ 130°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติม 20% H_2O_2 1 มล.

5. เผาตัวอย่างที่ 250°C จนเป็นเถ้าดำและเผาต่อ 450°C อีก 3 ชั่วโมง จนเป็นเถ้าขาว แล้วย่อยสลายเถ้าด้วย 6 M HNO_3 ระเหยจนเหลือปริมาตรน้อยๆ ละลายเถ้าที่เหลือด้วย 3 M HNO_3

6. สลายด้วย HNO_3 เข้มข้นและย่อยสลายต่อไปในไมโครเวฟขนาด 300W ที่ 190°C 30 นาที

การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักในพืชจำพวกอ้อ แสดงว่าการเตรียมสารละลายตัวอย่างวิธีที่ 6 ให้ปริมาณโลหะหนักมากที่สุด แต่วิธีที่ 1 และ 4 เป็นวิธีที่เร็ว และง่ายต่อการทดลองที่มีจำนวนตัวอย่างมากๆ

1.3 วัตถุประสงค์

ในงานวิจัยนี้ มีจุดมุ่งหมายเพื่อสกัดเฮมิเซลลูโลสจากเปลือกและเนื้อมะละกอดิบ และตรวจหาชนิดและปริมาณน้ำตาลองค์ประกอบของ เฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้ ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการเพิ่มมูลค่ามะละกอและการใช้ประโยชน์จากเฮมิเซลลูโลสของเปลือกและเนื้อมะละกอ