

การประยุกต์ใช้เอนไซม์ในรูปอิสระและรูปตรึงสำหรับการสกัดสารธรรมชาติจากพืช
**APPLICATIONS OF FREE-ENZYME AND IMMOBILIZED-ENZYME
FOR EXTRACTION OF NATURAL COMPOUNDS FROM PLANTS**

วีรภัทร วิโนทพรรษ์

กลุ่มวิจัยและพัฒนานวัตกรรมสีเขียวทางเภสัชศาสตร์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม

ติดต่อผู้พิมพ์ : weerapath89@hotmail.com

WEERAPATH WINOTAPUN

Pharmaceutical Development of Green Innovations Group (PDGIG),

Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University,
Sanamchandra Palace, Nakhon Pathom

Corresponding Author: weerapath89@hotmail.com

บทคัดย่อ

สารธรรมชาติจากพืชเป็นสารที่มีความสำคัญและกำลังเป็นที่นิยม เนื่องจากสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ในหลายด้าน ไม่ว่าจะเป็นสารแต่งสีอาหาร สารแต่งกลิ่นแต่งรส สารฆ่าแมลง สารต้านอนุมูลอิสระ และยารักษาโรค โดยวิธีที่นิยมใช้ในการแยกสารธรรมชาติจากพืชได้แก่การสกัด ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 วิธี คือ การสกัดด้วยวิธีทางเคมี การสกัดด้วยวิธีทางกายภาพ และการใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัด การสกัดด้วยวิธีทางเคมีนั้นทำได้ง่าย แต่มักมีการใช้ตัวทำละลายที่มีความเป็นพิษและใช้ในปริมาณมาก การสกัดด้วยวิธีทางกายภาพ มักใช้ร่วมกับการสกัดด้วยวิธีทางเคมีโดยการให้พลังงานความร้อนหรือการสั่น ทำให้ตัวทำละลายสามารถแทรกเข้าไปยังชิ้นส่วนของพืชได้มากขึ้น ส่วนการใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัด ทำโดยใช้เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยองค์ประกอบของพืช ทำให้สารสำคัญที่ต้องการออกมาในสารสกัดได้มากยิ่งขึ้น จึงช่วยลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายในการสกัดลงได้ โดยการใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัดนั้น ต้องคำนึงถึงชิ้นส่วนของพืชที่จะนำมาสกัด ชนิดของเอนไซม์ และสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้ ยังได้มีการนำเทคโนโลยีการตรึงเอนไซม์เข้ามาใช้ เพื่อเพิ่มความคงตัวให้แก่เอนไซม์ อีกทั้งยังสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำได้อีกด้วย ในปัจจุบัน มีการใช้วิธีในการสกัดหลายวิธีร่วมกัน เพื่อให้การสกัดมีประสิทธิภาพสูงสุด

คำสำคัญ : เอนไซม์, การประยุกต์ใช้เอนไซม์, เอนไซม์ในรูปตรึง, สารธรรมชาติ, การสกัดสารธรรมชาติ

Abstract

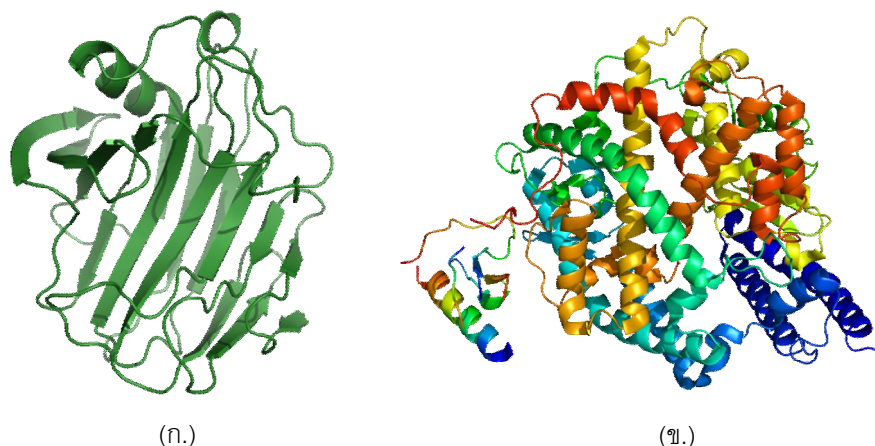
Natural compounds from plants are important and popular, since they can be utilized in many applications such as food coloring agents, flavoring agents, insecticide agents, antioxidants and medicines. The most favorite method for the separation of natural compounds from plants is the extraction which can be divided into three methods, i.e. chemical extraction, physical extraction, and enzyme-assisted extraction. Chemical extraction is a simple method but it often employs toxic and large volume of solvent. Physical extraction method is often applied in combination with chemical extraction by a generation of heat or vibration causing the higher penetration of solvents into parts of plants compared with the use of only chemical extraction. On the other hand, enzyme-assisted extraction can be done by the use of enzymes possessing the ability of disruption of cell structures contributing to the enhancement of the release of required intracellular contents from plants. This will lead to the reduction in the amount of solvents used. The use of enzyme-assisted extraction should be taken into consideration of the parts of plants, types of enzyme and the optimum conditions for enzyme activity. In addition, the technology of enzyme immobilization has been used to improve the stability of enzyme and also to recycle the enzyme. At present, the combination of different methods of extraction can be performed to achieve the highest extraction efficiency.

Keywords: enzyme, applications of enzyme, immobilized-enzyme, natural compounds, extraction of natural compounds

บทนำ

เอนไซม์ (enzyme) คือ ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพที่เป็นสารจำพวกโปรตีน ที่ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) สายเดี่ยวหรือหลายสายม้วนเป็นก้อนกลมและมีรูปร่างที่จำเพาะ (ภาพที่ 1) ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาเคมีให้เกิดเร็วขึ้น เอนไซม์สามารถจับกับสารตั้งต้น

อย่างจำเพาะเจาะจง โดยการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ในปฏิกิริยาชีวเคมีที่แน่นอนภายใต้สภาวะที่มีความเหมาะสม จึงมีความสำคัญและจำเป็นสำหรับการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ ยังมีความสำคัญทางอุตสาหกรรม และทางการแพทย์



ภาพที่ 1 โครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ที่ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว (ก.) และโพลีเปปไทด์หลายสาย (ข.)

Available at <http://en.wikipedia.org/wiki/File:1NLRibbon.png> (16 June 2013)

Available at http://en.wikipedia.org/wiki/File:Protein_ACE2_PDB_1r42.png (16 June 2013)

ข้อดีของเอนไซม์คือมีความจำเพาะเจาะจง (specificity) ในการทำปฏิกิริยา โดยเอนไซม์สามารถจับกับสารตั้งต้นตัวใดตัวหนึ่งได้สูง แต่จะมีความสามารถต่ำหรือไม่สามารถจับกับสารอื่น ความจำเพาะนั้นเกิดจากหมู่ฟังก์ชันที่จัดเรียงตัวอยู่บนบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์สามารถสร้างพันธะระหว่างเอนไซม์กับส่วนต่าง ๆ ของโมเลกุลของสารตั้งต้นได้อย่างพอเหมาะและลงตัว เอนไซม์ยังมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูง ไม่เป็นพิษ และสามารถสลายได้เองโดยกระบวนการทางชีวภาพ

ในปัจจุบันได้มีการนำเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมขนมอบ (baking industry) อุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (brewing industry) อุตสาหกรรมยาง (rubber industry) อุตสาหกรรมกระดาษ (paper industry) และอุตสาหกรรมอาหาร

(food industry)¹ เป็นต้น โดยบทความฉบับนี้ได้นำเสนอการใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัดสารจากธรรมชาติ เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการสกัด และเพิ่มผลผลิตที่ได้จากการสกัด นอกจากนี้ยังนำเสนอเทคโนโลยีการตรึงเอนไซม์ (immobilization technology) เพื่อแก้ปัญหาความคงตัวของเอนไซม์ที่มีความคงตัวต่ำในสภาวะการผลิตต่าง ๆ และความยุ่งยากในการนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำ

ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับสารจากธรรมชาติและวิธีการสกัดต่าง ๆ

สารจากธรรมชาติ (natural compounds) เป็นสารที่สังเคราะห์โดยสิ่งมีชีวิต เพื่อใช้สำหรับป้องกันตัวจากสิ่งแปลกปลอม หรือเพื่อยืดชีวิต มนุษย์นำสารจากธรรมชาติเหล่านี้ มาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ อย่างหลากหลาย ไม่ว่าจะเป็น

นำมาใช้เป็นสารแต่งสี (coloring agents)² สารแต่งกลิ่นแต่งรส (flavoring agents)³ สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants)⁴ สารฆ่าแมลง (insecticides)⁵ และที่สำคัญสามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรค (medicines)⁶ โดยวิธีที่จะได้มาซึ่งสารที่ต้องการนั้นมีหลายวิธี เช่น การกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) การบีบเย็น (cold pressing) เป็นต้น แต่วิธีที่ได้รับความนิยมและใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ การสกัด (extraction) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการแยกสารออกจากแหล่งตามธรรมชาติ ซึ่งในบทความนี้จะเน้นการสกัดสารจากพืช โดยวิธีการสกัดที่ดีนั้น ควรจะประหยัดเวลาที่ใช้ในการสกัด ใช้ตัวทำละลายในการสกัดปริมาณน้อย และได้ปริมาณของสารสกัดสูง โดยสามารถแบ่งประเภทของการสกัดได้เป็น 3 ประเภท⁷ ได้แก่

ตารางที่ 1 การเลือกใช้ชนิดของตัวทำละลายให้เหมาะสมกับชนิดของสารสำคัญ

ประเภทของตัวทำละลาย	ตัวทำละลายที่ใช้	ชนิดของสารสำคัญ
ขั้วต่ำ	ไซโคลเฮกเซน, เฮกเซน, โทลูอิน, เบนซีน, อีเทอร์, คลอโรฟอร์ม, เอซิลอะซีเตท	แอลคาลอยด์, เทอปีนอยด์, คูมาริน, ฟลาโวนอยด์,
ขั้วสูง	อะซิโตน, อะซิโตนไทรล์, บิวทานอล, โพรพานอล, เอทานอล, มีเทน	ฟลาโวนอล, เลคติน, ฟลาโวน, โพลีฟีนอล, ซาโปนิน

2. การสกัดด้วยวิธีทางกายภาพ (physical extraction process)

เป็นการสกัดโดยการให้พลังงานหรือการสั่น นิยมใช้ร่วมกับการสกัดด้วยตัวทำละลายเพื่อช่วยเพิ่มการละลายของสาร ทำให้ได้สารสกัดปริมาณสูงขึ้น เช่น การสกัดด้วยน้ำร้อนแรงดันสูง (pressurized

1. การสกัดด้วยวิธีทางเคมี (chemical extraction method)

เป็นการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในการสกัดสาร ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการสกัด ได้แก่ ชนิดของตัวทำละลายที่เลือกใช้ โดยสารประกอบที่ละลายได้ดีในไขมัน (lipophilic compounds) มักถูกสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วต่ำ เช่น เฮกเซน (hexane) หรือไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) ส่วนสารประกอบที่ละลายได้ดีในน้ำ (hydrophilic compounds) มักถูกสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูง เช่น เมทานอล (methanol) หรือเอทานอล (ethanol) (ดังตารางที่ 1) วิธีการสกัดด้วยวิธีทางเคมีเป็นวิธีที่นิยมใช้ในวงกว้าง เนื่องจากเป็นวิธีทำได้ง่าย และให้ปริมาณของสารสกัดสูง

hot water extraction) การใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด (ultrasound-assisted extraction) การใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด (microwave-assisted extraction) การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหนือจุดวิกฤติ (supercritical carbon dioxide extraction) และการบีบเย็น (cold pressing) เป็นต้น

3. การใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัด (enzyme-assisted extraction)

เป็นการสกัดสารโดยใช้เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยผนังเซลล์พืชมาช่วยในการสกัด โดยเอนไซม์ที่นิยมใช้ได้แก่ เซลลูเลส (cellulase) เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) และเพกตินเนส (pectinase) ส่งผลให้สารจากธรรมชาติที่ต้องการออกมาจากเซลล์ง่ายขึ้น จึงทำให้ได้ปริมาณของสารสำคัญเพิ่มมากขึ้น โดยวิธีนี้มักนำไปใช้ร่วมกับการสกัดด้วยวิธีทางเคมี และในบทความฉบับนี้จะขอเสนอเฉพาะการใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัด

การใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัดสารจากธรรมชาติที่ได้จากพืช

ในปัจจุบัน มีผู้คิดค้นพัฒนาวิธีการสกัดใหม่ ๆ มากมาย เพื่อเพิ่มผลผลิตในการสกัดให้มากขึ้น สามารถสกัดสารที่ต้องการออกมาได้ครั้งละมาก ๆ เพื่อลดต้นทุนในการสกัด เพราะปริมาณสารสำคัญที่มีในพืชนั้น มักจะพบในปริมาณต่ำ โดยวิธีที่นิยมใช้ในการสกัดสารจากพืชในปัจจุบัน ได้แก่ การบีบเย็น (cold pressing) การสกัดด้วยของเหลวเหนือวิกฤติ (supercritical fluid extraction) และการสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) อย่างไรก็ตาม การใช้ตัวทำละลายในการสกัดมีข้อด้อยหลายประการ ไม่ว่าจะเป็นความเป็นพิษของตัวทำละลายที่ใช้ ความเสี่ยงด้านความปลอดภัย ต้องใช้พลังงานช่วยในการสกัดสูง ได้ปริมาณของสารสกัดน้อย สารสกัดที่ได้มีคุณภาพต่ำ และมักส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม จึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาวิธีการสกัดใหม่ ๆ เพื่อแก้ไขปัญหา

ดังกล่าว และเพิ่มประสิทธิภาพของการสกัดให้ดียิ่งขึ้น ซึ่งทางเลือกที่น่าสนใจและเป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลายคือการสกัดด้วยตัวทำละลายร่วมกับการใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัด

ในรายงานบทความทางวิชาการ ได้แสดงให้เห็นว่า การใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัดสารจากธรรมชาติ นั้น สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับสารตั้งต้นได้หลายรูปแบบ ไม่ว่าจะเป็นการสกัดสารแคโรทีนอยด์จากเปลือกมะเขือเทศ⁸ การสกัดสารวานิลลินจากฝักวานิลลา⁹ การสกัดสารโพลีแซ็กคาไรด์จากต้น sterculia¹⁰ และการสกัดน้ำมันจากเมล็ดองุ่น¹¹ เป็นต้น โดยทั่วไป การใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัดสารจากธรรมชาติ เช่น เอนไซม์เซลลูเลส, เพกตินเนส และ เฮมิเซลลูเลส จะใช้เพื่อย่อยส่วนประกอบของพืชก่อนที่จะนำมาสกัดด้วยวิธีทั่วไป เอนไซม์จะเข้าไปทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์พืช เช่น การใช้เซลลูเลสช่วยในการสกัดสารเจนิพินจากผลพุทธรักษา¹² ดังภาพที่ 2 จึงมีผลทำให้สารสำคัญที่อยู่ในพืชถูกสกัดออกมาได้มากขึ้น โดยทั่วไปแล้ว แหล่งที่มาของเอนไซม์เหล่านี้ อาจได้มาจากแบคทีเรีย เชื้อรา อวัยวะสัตว์ และสารสกัดจากผักหรือผลไม้ โดยปัจจัยที่ส่งผลถึงประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์นั้น ได้แก่

1. ส่วนของพืชที่จะนำมาสกัด

เนื่องจากองค์ประกอบหลักของพืชในแต่ละส่วนนั้น มีความแตกต่างกัน เช่น องค์ประกอบหลักที่พบได้ในผล คือ เพกติน องค์ประกอบหลักที่พบในเปลือกไม้ คือ ลิกนิน และองค์ประกอบหลักที่พบได้ในใบและเหง้า คือ เซลลูโลส เป็นต้น จึงมีความ

จำเป็นที่ต้องทราบก่อนว่า องค์ประกอบหลักของชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาสกัดนั้นคืออะไร เพื่อสามารถเลือกชนิดของเอนไซม์ให้เหมาะสมกับส่วนของพืช

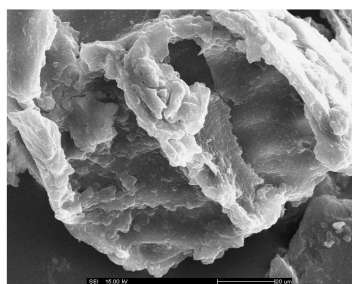
2. ชนิดของเอนไซม์ที่เลือกใช้ในการสกัด

การเลือกเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดควรเลือกให้เหมาะสมกับส่วนของพืชที่จะนำมาสกัด และควรทราบก่อนว่าแหล่งที่มาของเอนไซม์ที่เลือกใช้สามารถหาได้จากแหล่งใดบ้าง และหน้าที่การทำงานของเอนไซม์เป็นอย่างไร เช่น เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อจุลินทรีย์ มีคุณสมบัติในการตัดพันธะ เบต้า-1,4-ดี-ไกลโคสิติกที่พบในเซลลูโลส จึงนิยมนำเซลลูเลส มาช่วยในการสกัดสารสำคัญที่ได้จากส่วนใบหรือเหง้าของพืช ส่วนเพคตินเอสเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อจุลินทรีย์ เช่นเดียวกับเซลลูเลส มีคุณสมบัติในการตัดพันธะ แอลฟา-1,4-ดี-กาแล็คโตโลนิคแอซิดที่

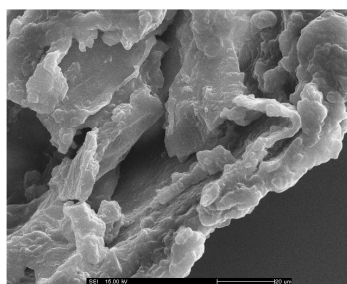
อยู่ในเพคตินได้ จึงนิยมนำเพคตินเอส มาช่วยในการสกัดสารที่ได้จากผลพืช เป็นต้น นอกจากนี้ เอนไซม์บางชนิดที่มีหน้าที่การทำงานเหมือนกัน แต่มาจากแหล่งที่ต่างกัน อาจมีความคงตัว ความจำเพาะในการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น และอัตราในการเร่งปฏิกิริยาที่ต่างกัน¹³

3. สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและการทำงานของเอนไซม์

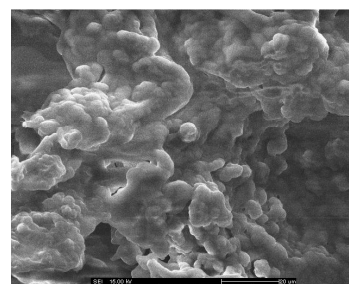
สภาวะที่เกี่ยวข้องกับการสกัด และการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ ค่าความเป็นกรดต่าง เวลาที่ใช้ในการหมักเอนไซม์กับพืช และอุณหภูมิ ล้วนส่งผลต่อประสิทธิภาพของการสกัดและประสิทธิภาพของเอนไซม์ จึงควรคำนึงถึงปัจจัยเหล่านี้ เพื่อให้เอนไซม์สามารถทำงานได้มีประสิทธิภาพสูงสุด และส่งผลให้ประสิทธิภาพในการสกัดเกิดขึ้นได้ดีที่สุด



(ก.)



(ข.)

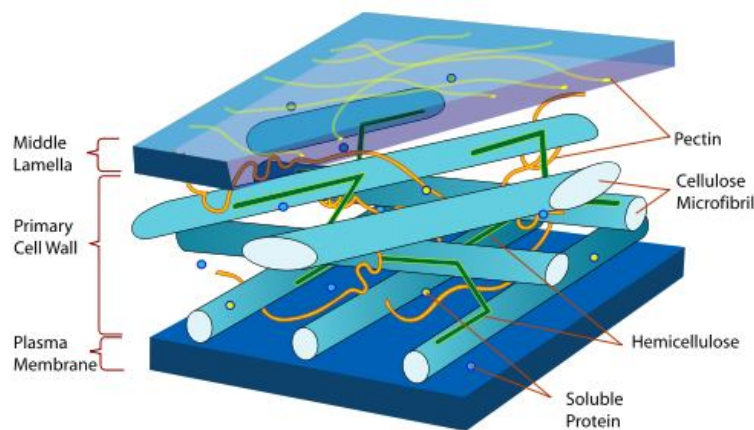


(ค.)

ภาพที่ 2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงให้เห็นถึงโครงสร้างของผนังเซลล์ของผลพุท เมื่อไม่ได้ถูกย่อยด้วยเซลลูเลส (ก.) เมื่อถูกย่อยด้วยเซลลูเลสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ข.) และเมื่อถูกย่อยด้วยเซลลูเลสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ค.)

มีการนำเอนไซม์มาใช้เพื่อช่วยการสกัดสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จากใบแป๊ะก๊วย ทำให้ลดปริมาณของตัวทำละลายและเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 5 % w/w สามารถเพิ่มปริมาณสารสกัดจาก 88.84 มิลลิกรัมต่อหนึ่งกรัมของเปลือกส้มแห้ง เป็น 113.11 มิลลิกรัมต่อหนึ่งกรัมของเปลือกส้มแห้ง¹⁵ การใช้เซลลูเลสและเพคตินเนส ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดไลโคปีนจากมะเขือเทศ ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณการสกัดได้ถึง 206 % เมื่อเทียบกับวิธีที่ไม่ใช้เอนไซม์ในการสกัด¹⁶ นอกจากนี้การใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัดยังช่วยเพิ่มปริมาณสารสกัดในกลุ่มโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดภูมามา (*Hericium erinaceus*) ได้ถึง 67.22 % เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อน¹⁷

พลังงานความร้อนที่ใช้ลงได้¹⁴ การใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกส้ม โดยการใช้โดยทั่วไปแล้ว พืชส่วนใหญ่จะมีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลส เพคติน และเฮมิเซลลูโลส ดังภาพที่ 3 ซึ่งเป็นสารในกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ จึงนิยมใช้เซลลูเลสและเพคตินเนสที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์ช่วยในกระบวนการหมัก โดยโพลีแซคคาไรด์จะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ยกตัวอย่างเช่น การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการหมักเปลือกผลของเกรปฟรุ๊ต เพื่อผลิตเอทานอล และผลิตภัณฑ์อื่นที่เกิดจากการหมัก¹⁸ นอกจากนี้ในช่วงปีที่ผ่านมายังมีรายงานการใช้เอนไซม์ช่วยเพิ่มผลผลิตประเภทอื่น ๆ ในระดับอุตสาหกรรมอีกมากมาย (ดังตารางที่ 2)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของผนังเซลล์พืช

Available at http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/53/Plant_cell_wall_diagram.svg (12 June 2013)

ตารางที่ 2 ตัวอย่างสารสำคัญที่ได้จากการใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัดในระดับอุตสาหกรรม

ชนิดของสาร	แหล่งที่มาของสาร	เอนไซม์ที่ใช้	ปริมาณสารสกัดที่เพิ่มขึ้น (%) เทียบกับ ไม่ใช้เอนไซม์	เอกสารอ้างอิง
แทกเซน	ใบต้นยู	เซลลูเลส	78.0	6
วานิลลิน	ฝักวานิลลา	เบต้า-กลูโคซิเดส และเพคตินเนส	14-21	8
น้ำมัน	เปลือกส้มแมนดาริน	ไซเลส	15.0	19
	เมล็ัด forsythia	เซลลูเลส, เพคตินเนส และโปรตีนเนส	92.5	20
แคโรทีนอยด์	ดอกดาวเรือง	เพคตินเนส, นิวเทรล และโคโรเลส	97.0	21
สารสี	ต้นพิทahaya	เซลลูเลส, เพคตินเนส และเฮมิเซลลูเลส	83.5	22
โอลิโกแซคคาไรด์	รำข้าว	เซลลูเลส	39.9	23
แป้ง	ต้นแคสสว่า	เพคตินเนส	45.6	24
เพคติน	ฟักทอง	ไซเลส, เซลลูเลส และเพคตินเนส	14.0	25
โพลีฟีนอล	กากองุ่น	เพคตินเนส	98.1	26
คาเทชิน	ใบชา	เปปซิน	80.0	27
ไฟเบอร์	กากแครอท	เซลลูเลส	77.3	28

ประโยชน์และข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัด

การประยุกต์ใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัดสารจากธรรมชาติมีประโยชน์ในการช่วยย่อยส่วนของพืชที่จะนำมาสกัดให้มีความเปื่อยยุ่ยมากขึ้น สารสำคัญออกมาจากเซลล์ได้ง่ายขึ้น จึงช่วยลดปริมาณตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ลดระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด ช่วยเพิ่มปริมาณของสารสกัด และทำให้คุณภาพของการสกัดดียิ่งขึ้น^{29,30} วิธีการใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัดยังมีความสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็น

กระบวนการพัฒนาที่ยั่งยืนและมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าวิธีที่ไม่ได้ใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัด แต่วิธีนี้อาจมีข้อจำกัดบางประการ เช่น เอนไซม์ที่มีขายในท้องตลาดมีราคาค่อนข้างแพง เอนไซม์ที่ใช้้อาจยังไม่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์พืชหรือส่วนประกอบของพืชได้อย่างสมบูรณ์ จึงทำให้ได้ปริมาณของสารสำคัญไม่มากเท่าที่ต้องการ อีกทั้งปัญหาเรื่องของความคงตัวของเอนไซม์ในตัวทำละลายที่ใช้สกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อะซิโตน อะซิโตนไทรล์ และไดเมทิล

ฟอร์มาไมด์ ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลงได้³¹ แต่ในบางกรณี ตัวทำละลายอินทรีย์อาจเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ ส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นได้เช่นกัน^{32,33} นอกจากนี้ ปัญหาที่สำคัญในการใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัดคือ เมื่อการสกัดเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์แล้ว จะไม่สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำได้ และเอนไซม์จะถูกทิ้งไปพร้อมกับตัวทำละลายหลังจากการสกัดเสร็จสิ้น ปัจจุบันจึงมีผู้คิดค้นการนำเทคโนโลยีการตรึงเอนไซม์ (immobilization technology) บนตัวยึดเกาะ (supporter) ที่เหมาะสม

ความหมายและวัตถุประสงค์ของการตรึงเอนไซม์

การตรึงเอนไซม์ หมายถึง การจำกัดการเคลื่อนที่ของเอนไซม์ด้วยวิธีการทางกายภาพและเคมี หรือการจำกัดตำแหน่งของเอนไซม์ให้อยู่ในช่องว่างที่

กำหนด โดยการตรึงเอนไซม์กับตัวยึดเกาะที่เหมาะสม หรือการตรึงเอนไซม์ภายในวัสดุยึดเกาะที่ไม่ละลายน้ำที่หลากหลาย ซึ่งเอนไซม์ยังคงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา วัตถุประสงค์หลักของการตรึงเอนไซม์คือ ความง่ายและสะดวกในการแยกเอนไซม์ออกจากสารสกัด เพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ในสภาวะที่ใช้ และสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำได้ โดยทั่วไปแล้ว เทคโนโลยีการตรึงเอนไซม์ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลายแขนง ไม่ว่าจะเป็นการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลกรดอะมิโน หรือการสังเคราะห์ยา เป็นต้น (ดังตารางที่ 3) นอกจากนี้ ยังมีผู้นำมาประยุกต์ใช้ในการสกัดสารจากธรรมชาติ เพื่อช่วยลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการสกัด โดยใช้เอนไซม์ช่วย ปัจจัยที่สำคัญต่อกระบวนการตรึงเอนไซม์ ได้แก่ คุณสมบัติของเอนไซม์อิสระ ชนิดของตัวยึดเกาะที่เลือกใช้ และเทคนิคการตรึงเอนไซม์ที่เลือกใช้

ตารางที่ 3 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ในรูปปตรึง

เอนไซม์	ผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
Glucose isomerase	High-fructose corn syrup	34
Amino acid acylase	Amino acid production	35
Penicillin acylase	Semi-synthetic penicillins	36
Nitrile hydratase	Acrylamide	37
Beta-galactosidase	Hydrolyzed lactose (whey)	38

เทคนิคในการตรึงเอนไซม์

เทคนิคในการตรึงเอนไซม์นั้นมีหลายวิธี โดยสามารถแบ่งออกได้ดังนี้

1. วิธีอาศัยการดูดซับ (adsorption method) เป็นเทคนิคการตรึงเอนไซม์รูปแบบหนึ่ง ซึ่งเอนไซม์จะถูกดูดซับอยู่บนตัวยึดเกาะที่ไม่ละลายน้ำโดยวิธีทางกายภาพ

2. วิธีการเชื่อมต่อดัวยพันธะโควาเลนต์ (covalent bonding method) เป็นการเชื่อมเอนไซม์เข้ากับตัวยึดเกาะที่ไม่ละลายน้ำด้วยพันธะโควาเลนต์

3. วิธีการกักเก็บเอนไซม์ (entrapment method) เป็นการกักเก็บเอนไซม์ภายในโครงข่ายของพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ (water-insoluble polymer lattice) หรือภายในแผ่นเยื่อที่มีความสามารถในการเลือกผ่าน (semi-permeable membrane)

4. วิธีการเชื่อมไขว้ระหว่างโมเลกุล (intermolecular cross-linking method) เป็นการเชื่อมไขว้ระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ โดยใช้สารที่มีบริเวณที่สามารถทำปฏิกิริยาหลายตำแหน่ง (multi-functional reagents).

ส่วนใหญ่แล้ววิธีที่นิยมใช้ในการตรึงเอนไซม์ ได้แก่ วิธีอาศัยการดูดซับ เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย โดยเอนไซม์จะถูกดูดซับอยู่บนตัวยึดเกาะที่ไม่ละลายน้ำด้วยปฏิกิริยาทางกายภาพอย่างไม่เฉพาะเจาะจงด้วยแรงอ่อน ๆ เช่น แรงแวนเดอร์วาลส์ จึงไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์มากนัก ตัวอย่างเช่น การตรึงเซลล์ูเลส เพคตินเนส เฮมิเซลล์ูเลส เบต้ากลูโคซิเดส และโปรตีนเนส บนตัวยึดเกาะแอลจีเนต (alginate) ในการสกัดน้ำมันจากเมล็ดลินิน³⁹ (flaxseed) การสกัดสารเจนิสติน (genistin) และเจนิสติน (genistein) จากรากถั่ว

และ โดยใช้เบต้ากลูโคซิเดสที่ถูกตรึงบนเม็ดบีต แคลเซียมแอลจีเนต⁴⁰ (Ca-alginate bead) จากตัวอย่างทั้ง 2 วิธี ให้ผลผลิตจากการสกัดในปริมาณที่สูงและยังมีความคงตัวที่ดีกว่าการใช้เอนไซม์ในรูปอิสระ

ประโยชน์และข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์ในรูปตรึง

การนำเทคโนโลยีการตรึงเอนไซม์มาช่วยในการสกัดสารธรรมชาติจากพืชมีประโยชน์หลายประการ ไม่ว่าจะเป็นการนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำได้ เอนไซม์มีความคงตัวเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเอนไซม์ในรูปอิสระ และสามารถแยกเอนไซม์ออกจากสารสกัดได้ง่ายมากขึ้น เป็นต้น แต่การใช้เอนไซม์ในรูปตรึงซ้ำหลาย ๆ ครั้ง อาจทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง จึงต้องมีการทดสอบการทำงานของเอนไซม์อยู่เสมอ นอกจากนี้หากการตรึงเอนไซม์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของเอนไซม์ หรือจำกัดการเคลื่อนที่ของเอนไซม์มากเกินไป อาจทำให้เอนไซม์มีความอิสระในการทำงานลดลง ซึ่งจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลงตามไปด้วย

สรุป

การใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัดสารธรรมชาติจากพืช เป็นแนวทางหนึ่งที่กำลังมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยนำไปใช้ร่วมกับการสกัดสารธรรมชาติด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการสกัดให้ดียิ่งขึ้น อีกทั้งยังทำให้ได้ปริมาณสารสกัดมากขึ้นด้วย โดยปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงเมื่อมีการใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัด ได้แก่ ส่วนของพืชที่จะนำมาสกัด ชนิดของเอนไซม์ที่เลือกใช้ในการสกัด และสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและการทำงานของเอนไซม์

นอกจากนี้ ยังได้มีการนำเทคโนโลยีการตรึงเอนไซม์เข้ามาใช้ เพื่อเพิ่มความคงตัวให้กับเอนไซม์ ช่วยทำให้แยกเอนไซม์ออกจากสารสกัดได้ง่ายขึ้น และที่สำคัญสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำได้ จึงช่วยลดค่าใช้จ่ายที่เกิดขึ้นในการใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัดได้

เอกสารอ้างอิง

- Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotech.* 2002;13(4):345-51.
- Rodriguez-Saona LE, Giusti MM, Durst RW, Wrolstad RE. Development and process optimization of red radish concentrate extract as potential natural red colorant. *J Food Process Preserv.* 2001;25(3):165-82.
- Lomascolo A, Stentelaire C, Asther M, Lesage-Meessen L. Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. *Trends Biotechnol.* 1999;17(7):282-9.
- López-Vélez M, Martínez-Martínez F, Del Valle-Ribes C. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003;43(3):233-44.
- Dumas C, Robert P, Pais M, Vey A, Quiot J-M. Insecticidal and cytotoxic effects of natural and hemisynthetic destruxins. *Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 1994;108(2):195-203.
- Zu Y, Wang Y, Fu Y, Li S, Sun R, Liu W, et al. Enzyme-assisted extraction of paclitaxel and related taxanes from needles of *Taxus chinensis*. *Sep Purific Technol.* 2009;68(2):238-43.
- Puri M, Sharma D, Barrow CJ. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends Biotechnol.* 2012;30(1):37-44.
- Dehghan-Shoar Z, Hardacre AK, Meerdink G, Brennan CS. Lycopene extraction from extruded products containing tomato skin. *Int J Food Sci Technol.* 2011;46(2):365-71.
- Ruiz-Terán F, Perez-Amador I, López-Munguia A. Enzymatic extraction and transformation of glucovanillin to vanillin from vanilla green pods. *J Agric Food Chem.* 2001;49(11):5207-9.
- Wu Y, Cui SW, Tang J, Gu X. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds by response surface methodology. *Food Chem.* 2007;105(4):1599-605.
- Passos CP, Yilmez S, Silva CM, Coimbra MA. Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail. *Food Chem.* 2009;115(1):48-53.
- Winotapun W, Opanasopit P, Ngawhirunpat T, Rojanarata T. One-enzyme catalyzed simultaneous plant cell disruption and conversion of released

- glycoside to aglycone combined with in situ product separation as green one-pot production of genipin from gardenia fruit. *Enzyme Microb Technol.* 2013;53(2):92-6.
13. Gustavus Adolphus College. Cell Biology Laboratory Manual [homepage on the Internet]. [cited 2013 Nov 14]. Available from: http://www.bjcancer.org/_Library/UserFiles/pdf/Cell_Biology_Laboratory_Manual.pdf
 14. Chen S, Xing XH, Huang JJ, Xu MS. Enzyme-assisted extraction of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves: Improvement effect of flavonol transglycosylation catalyzed by *Penicillium decumbens* cellulase. *Enzyme Microb Technol.* 2011;48(1):100-5.
 15. Li BB, Smith B, Hossain MdM. Extraction of phenolics from citrus peels II. Enzyme-assisted extraction method. *Sep Purific Technol.* 2006;48(2):189-96.
 16. Choudhari SM, Ananthanarayan L. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. *Food Chem.* 2007;102(1):77-81.
 17. Zhu Y, Li Q, Mao G, Zou Y, Feng W, Zheng D, et al. Optimization of enzyme-assisted extraction and characterization of polysaccharides from *Hericium erinaceus*. *Carbohydr Polym.* 2014; 101:606-13.
 18. Wilkins MR, Widmer WW, Grohmann K, Cameron RG. Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzyme. *Bioresourc Technol.* 2007;98(8):1596-601.
 19. Mishra D, Shukla AK, Dixit AK, Singh K. Aqueous enzymatic extraction of oil from mandarin peels. *J Oleo Sci.* 2005;54(6):355-9.
 20. Gai QY, Jiao J, Wei FY, Luo M, Wang W, Zu YG, et al. Enzyme-assisted aqueous extraction of oil from *Forsythia suspense* seed and its physicochemical property and antioxidant activity. *Ind Crop Prod.* 2013;51:274-8.
 21. Barzana E, Rubio D, Santamaria RI, Garcia-Correa O, Garcia F, Ridaura Sanz VE, et al. Enzyme-mediated solvent extraction of carotenoids from marigold flower (*Tagetes erecta*). *J Agric Food Chem.* 2002;50(16):146-61.
 22. Schweiggert RM, Villalobos-Gutierrez MG, Esquivel P, Carle R. Development and optimization of low temperature enzyme-assisted liquefaction for the production of colouring foodstuff from purple pitaya (*Hylocereus* sp. [Weber] Britton & Rose). *Eur Food Res Technol.* 2009; 230(2):269-80.
 23. Patindol J, Wang L, Wang YJ. Cellulase-assisted extraction of oligosaccharides from defatted rice bran. *J Food Sci.* 2007; 72(9):516-21.
 24. Dzogbefia VP, Ofosu GA, Oldham JH. Evaluation of locally produced *Saccharomyces erevisiae* pectinase

- enzyme for industrial extraction of starch from cassava in Ghana. *Sci Res Essays*. 2008;3(8):365-9.
25. Ptichkina NM, Markina OA, Rumyantseva GN. Pectin extraction from pumpkin with the aid of microbial enzymes. *Food Hydrocoll*. 2008;22(1):192-5.
26. Kammerer D, Claus A, Schieber A, Carle R. A novel process for the recovery of polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *J Food Sci*. 2005;70(2):157-63.
27. Ferruzzi MG, Green RJ. Analysis of catechins from milktea beverages by enzyme assisted extraction followed by high performance liquid chromatography. *Food Chem*. 2006;99(3):484–91.
28. Yoon KY, Cha M, Shin SR, Kim KS. Enzymatic production of a soluble-fibre hydrolyzate from carrot pomace and its sugar composition. *Food Chem*. 2005;92(1):151-7.
29. Meyer AS. Enzyme technology for precision functional food ingredients processes. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1190:126-32.
30. Sowbhagya HB, Chitra VN. Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2010;50(2):146-61.
31. Kamal MZ, Yedavalli P, Deshmukh MV, Rao NM. Lipase in aqueous-polar organic solvents: activity, structure, and stability. *Protein Sci*. 2013;22(7):904-15.
32. Ogino H, Ishikawa H. Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. *J Biosci Bioeng*. 2001;91(2):109-16.
33. Saborowskia R, Sahling G, Navarette del Toro MA, Walter I, Garcia-Carreno F. Stability and effects of organic solvents on endopeptidases from the gastric fluid of the marine crab *Cancer pagurus*. *J Mol Catal*. 2004;30(3):109-18.
34. Visuri K, Klivanov AM. Enzymatic production of high fructose corn syrup (HFCS) containing 55% fructose in aqueous ethanol. *Biotechnol Bioeng*. 1987;30(7):917-20.
35. Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;69(1):1-8.
36. Bruggink A, Roos EC, Vroom E. Penicillin acylase in the industrial production of β -Lactam antibiotics. *Org Proc Res Dev*. 1998;2(2):128-33.
37. Padmakumar R, Oriel P. Bioconversion of acrylonitrile to acrylamide using a thermostable nitrile hydratase. *Appl Biochem Biotechnol*. 1999;77-9:671-9.
38. Shukla TP, Wierzbicki LE. Beta-galactosidase technology: A solution to the lactose problem. *Crit Rev Food Technol*. 1975;5(3):325-56.

39. Long JJ, Fu YJ, Zu YG, Li J, Wang W, Gu C-B, et al. Ultrasound-assisted extraction of flaxseed oil using immobilized enzymes. *Bioresource Technol.* 2011;102(21):9991-6.
40. Zhang DY, Zu YG, Fu YJ, Luo M, Wang W, Gu CB, et al. Application of immobilized enzymes to accelerate the conversion of genistin to genistein in pigeon pea root extracts and the evaluation their antioxidant activity. *Ind Crop Prod.* 2013;42:409-15.