บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องและงานวิจัย

2.1 น้ำแครอท

แครอทเป็นพืชที่มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Daucus carota* L. subsp. *sativus* Thell. และอยู่ในวงศ์ : Umbelliferae นิยมนำมาแปรรูปเป็นน้ำแครอท โดยทั่วไปน้ำแครอทแบ่งออกเป็น 2 ชนิด

(1) น้ำแครอทแท้ หมายถึง น้ำแครอทที่ไม่มีการเจือน้ำ

(2) น้ำแครอทปรุง หมายถึง น้ำแครอทที่ทำมาจากน้ำแครอทไม่น้อยกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก มีการเจือน้ำ ปรุงแต่งรสด้วยน้ำตาล กรดซิทริก หรือน้ำผลไม้อื่น อาจแต่งสีและกลิ่นด้วย (คณะกรรมการสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2547)

คุณลักษณะของน้ำแครอทตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมได้กำหนดไว้ดังนี้

(1) ลักษณะทั่วไป : เป็นของเหลวขุ่น อาจตกตะกอนเมื่อวางทิ้งไว้

(2) สี กลิ่น และกลิ่นรส :

(2.1) น้ำแครอทแท้ ต้องมีสี กลิ่น และรสที่ดีตามธรรมชาติของแครอท ไม่มีกลิ่นแอลกอฮอล์ และปราศจากกลิ่นรสอื่นที่ไม่พึงประสงค์

(2.2) น้ำแครอทปรุง ต้องมีสี กลิ่น และรสที่ดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้ ไม่มีกลิ่นแอลกอฮอล์ และปราศจากกลิ่นรสอื่นที่ไม่พึงประสงค์

(3) สิ่งแปลกปลอม ต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ เช่น เส้นผม ขนสัตว์ ดิน ทราย กรวด ชิ้นส่วนหรือสิ่งปฏิกูลจากสัตว์

(4) วัตถุเจือปนอาหาร

(4.1) ห้ามใช้วัตถุกันเสียและสีสังเคราะห์ทุกชนิด

(4.2) หากมีการใช้สเตบิไลเซอร์ ให้ใช้ได้ตามชนิดและปริมาณที่กฎหมายกำหนด

(5) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (เฉพาะน้ำแครอทปรุง) ต้องไม่เกิน 4.2

(6) จุลินทรีย์

(6.1) <u>สตาฟิโลค็อกคัส</u> <u>ออเรียส</u> ต้องไม่พบในตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

(6.2) <u>เอสเชอริเชีย</u> <u>โคไล</u> โดยวิธีเอ็มพีเอ็น (MPN) ต้องน้อยกว่า 2.2 ต่อตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร

(6.3) ยีสต์และรา ต้องไม่เกิน 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คุณค่าทางโภชนาการของน้ำแครอท

ตารางที่ 2.1 คุณค่าทางโภชนาการของน้ำแครอท

คุณค่าทางโภชนาการ	ปริมาณ
โปรตีน (ร้อยละ)	10
ไขมัน (ร้อยละ)	1.5
คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ)	72
เหล็ก (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)	2.5
แคลเซียม (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)	215
วิตามินเอ (อินเตอร์เนชั่นแนลยูนิตต่อ 100 กรัม)	144,000
วิตามินซี (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)	35 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

ที่มา: Eddie, 2007

จากตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการของน้ำแครอท จะเห็นว่าน้ำแครอทเป็นแหล่งวิตามินเอ ซึ่งแหล่งของวิตามินเอนี้มาจากสารแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีนที่มีอยู่มากในแครอท โดยสารแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีนเป็นสารในกลุ่มของแคโรทีนอยด์

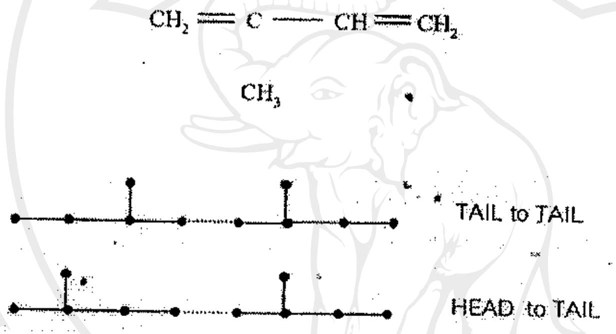
2.2 แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์ เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ที่มีคาร์บอนอะตอมอยู่ 40 อะตอม สูตรโครงสร้างพื้นฐานของแคโรทีนอยด์ จัดเป็นสารประกอบในกลุ่มเทอร์พีน (terpene group) เกิดจากหมู่ไอโซพีน 8 หน่วย มาเรียงต่อกันเป็นสายยาว โดยการเชื่อมต่อกันระหว่างหมู่ไอโซพรีนในโครงสร้างโมเลกุลมี 2 แบบ คือ แบบหัวโมเลกุลต่อกับท้ายโมเลกุล (head to tail) และท้ายโมเลกุลต่อท้ายโมเลกุล (tail to tail) (รูปที่3) การเชื่อมต่อระหว่างหมู่ไอโซพีนแบบท้ายโมเลกุลต่อท้ายโมเลกุล จะพบที่ส่วนกลางในโครงสร้างโมเลกุลแคโรทีนอยด์

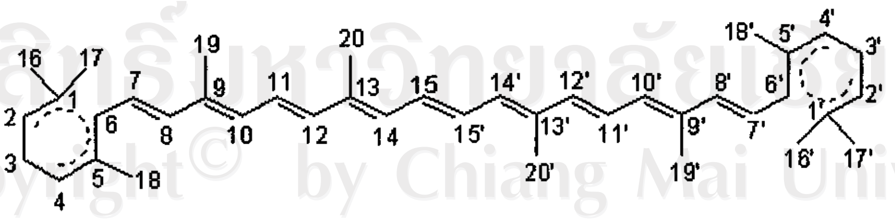
นอกจากนี้โครงสร้างโมเลกุลของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ยังประกอบด้วยวงแหวนที่มีคาร์บอนอยู่ 5 หรือ 6 อะตอม (ส่วนใหญ่ที่พบจะมี 6 อะตอม) เป็นวงแหวนแบบ cyclic โดยต่ออยู่ที่ปลายของโครงสร้างด้านใดด้านหนึ่ง หรือทั้งสองข้างของโครงสร้าง ตัวอย่างเช่น เบต้า-แคโรทีน (beta-carotene) แอลฟา-แคโรทีน (alpha-carotene) ไวโอเลริทริน (violerythrin) และ/หรืออาจมีอนุพันธุ์อื่นๆ ที่มีออกซิเจนอะตอมมาเกาะอยู่ด้วย ได้แก่ หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) คีโต (keto) อีพอกซี (epoxy) เมทอกซี (methoxy) หรือ หมู่กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid group) ตัวอย่างเช่น ลูทีน (lutein) ซึ่งเป็น C-30-dialdehyde เป็นต้น (Britton, 1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะการเชื่อมต่อกันของหมู่ไอโซพีน ทำให้เกิดการสมมาตรของโครงสร้างโมเลกุลของแคโรทีนอยด์ และพันธะคู่ในโครงสร้างอาจเกิดการหมุน หรือเปลี่ยนตำแหน่งของพันธะ (rotation) ในโครงสร้างได้ (Garry, 1996) ทำให้สารในกลุ่มแคโรทีนอยด์สามารถเปลี่ยนรูปแบบ (geometric) ได้หลายไอโซเมอร์ (isomer) คือ ไอโซเมอร์ E-Z โดย ไอโซเมอร์ E (E isomer) หมายถึง รูปแบบที่เป็นทรานส์ (*trans* form) ทั้งหมดเป็นรูปที่ถูกพบมากกว่าไอโซเมอร์ Z (Z isomer) หรือ รูปแบบที่เป็นซิส (*cis* form) โดยทั่วไป แคโรทีนอยด์อยู่ในรูปแบบที่เป็นทรานส์มีความคงตัวสูง เช่น เบต้า-แคโรทีน ที่พบโดยทั่วไป เป็นรูปแบบที่เป็นทรานส์ทั้งหมดถึง 90 เปอร์เซ็นต์ อีก 10 เปอร์เซ็นต์ จะอยู่ในรูปแบบที่เป็นซิส

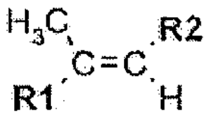


รูปที่ 2.1 รูปร่างของหมู่ไอโซพีนและ
ลักษณะการเชื่อมต่อกันระหว่างหมู่ไอโซพีน
(ที่มา: กัณณพนต์, 2538)

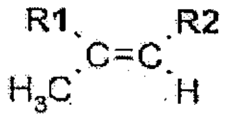


รูปที่ 2.2 โครงสร้างของแคโรทีนอยด์
(ที่มา: Britton, 1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



cis

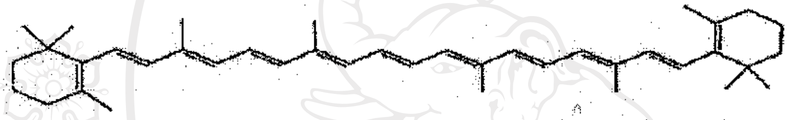


trans

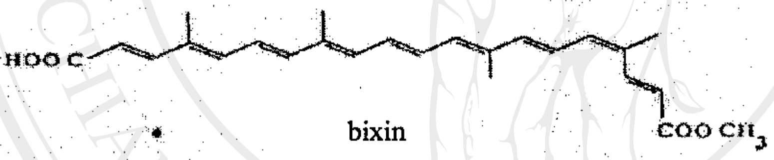
cis : ตำแหน่งของ R1 และ R2 ที่อยู่บนพันธะคู่จะอยู่ตรงข้ามกัน

trans : ตำแหน่งของ R1 และ R2 ที่อยู่บนพันธะคู่จะอยู่ด้านเดียวกัน

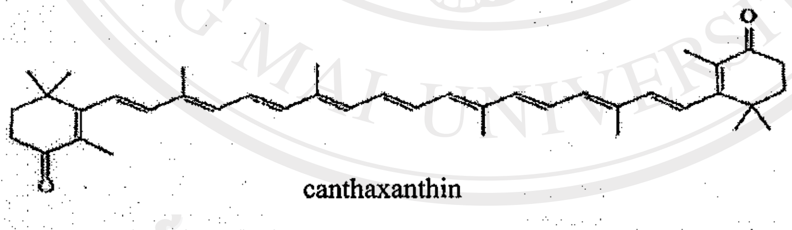
รูปที่ 2.3 ลักษณะรูปแบบ cis และ trans ในโครงสร้างของแคโรทีนอยด์
(ที่มา : Schoefs, 2002)



beta-carotene



bixin



canthaxanthin

capsanthin

รูปที่ 2.4 โครงสร้างของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์
(ที่มา: Garry, 1996 ; Britton, 1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.1 การจำแนกสารกลุ่มแคโรทีนอยด์

สารกลุ่มแคโรทีนอยด์สามารถแบ่งตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ดังนี้

(1) กลุ่มไฮโดรคาร์บอนแคโรทีน (hydrocarbon carotenes) เป็นกลุ่มที่โครงสร้างของโมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมกับไฮโดรเจนอะตอมเท่านั้น ตัวอย่างเช่น แอลฟาแคโรทีน (alpha-carotene) เบต้าแคโรทีน (beta-carotene) และไลโคปีน เป็นต้น

(2) กลุ่มออกซีจิเนเตดแซนโทฟิลส์ (oxygenated xanthophylls) เป็นกลุ่มของสารแคโร-ทีนอยด์ที่มีหมู่อนุพันธ์ที่ประกอบด้วยออกซิเจนอะตอมอยู่ในโครงสร้างของโมเลกุลด้วย ได้แก่ สารพวกแซนโทฟิลส์ (xanthophylls) เช่น ลูทีน (lutein) ซีแซนทีน (zeaxanthin) มีอนุพันธ์ของไฮดรอกซิล (นิธิยา, 2545)

นอกจากนี้ยังจำแนกกลุ่มของสารแคโรทีนอยด์ได้อีก 4 กลุ่ม คือ (Goodwin, 1980)

(1) โรโทรแคโรทีนอยด์ (Rotro-carotenoids) เป็นกลุ่มของแคโรทีนอยด์ที่พันธะเดี่ยวและคู่ในโครงสร้างเกิดการเปลี่ยนไปเป็นหนึ่งตำแหน่งทุกพันธะ

(2) ซีโค (Seco) และอะโพแคโรทีนอยด์ (Apocarotenoids) แคโรทีนอยด์ในกลุ่มนี้เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเป็น 2 แบบ คือ
   - ซีโคแคโรทีนอยด์ (Secocarotenoids) เป็นแคโรทีนอยด์ที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่วงแหวน แต่ไม่เกิดการสูญเสียคาร์บอนอะตอม
   - อะโพแคโรทีนอยด์ (Apocarotenoids) เป็นแคโรทีนอยด์ที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่สารพันธะ และมีการสูญเสียคาร์บอนอะตอม ทำให้สายของโครงสร้างโมเลกุลมีจำนวนคาร์บอนสั้นลง

(3) นอร์แคโรทีนอยด์ (Nor-carotenoids) เกิดการสูญเสียคาร์บอนอะตอมของโมเลกุล แต่ไม่ทำลายพันธะของโครงสร้าง

(4) ไฮเออร์แคโรทีนอยด์ (Higher carotenoids) เป็นกลุ่มของแคโรทีนอยด์ที่มีคาร์บอนอะตอม 45 หรือ 50 อะตอม

การแบ่งแคโรทีนอยด์ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่นั้น จะเห็นได้ว่ากลุ่มของออกซีจิเนเตดแซนโทรฟิลส์ มีความเป็นประจุ (polar) มากกว่ากลุ่มไฮโดรคาร์บอนแคโรทีน ดังนั้นจากสมบัตินี้เองเมื่อต้องการแยกแคโรทีนอยด์ 2 กลุ่มนี้ออกจากกัน ในการสกัดจึงให้ตัวทำละลายที่มีความเป็นประจุเข้ามาใช้เพื่อแยกสารทั้ง 2 กลุ่ม หากตัวทำละลายมีความเป็นประจุมากขึ้นสารกลุ่มในกลุ่มของแคโรทีนก็จะละลายในตัวทำละลายได้น้อยลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แคโรทีนอยด์เป็นสารที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยากระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) ของพืช โดยแคโรทีนอยด์จะอยู่รวมกับคลอโรฟิลล์ ในรูปสารเชิงซ้อนของรงควัตถุกับโปรตีน (pigment-protein complex) ในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) ซึ่งแคโรทีนอยด์เมื่ออยู่รวมกับโปรตีน จะทำให้ทั้งแคโรทีนอยด์และโปรตีนมีความเสถียรมากขึ้น แคโรทีนอยด์ที่อยู่ในเซลล์ของพืชนั้นมีหน้าที่ ดังนี้

(1) ช่วยในกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยแคโรทีนอยด์จะช่วยดูดกลืนแสง (light-harvesting) ในช่วงความยาวคลื่นแสงที่คลอโรฟิลล์ไม่สามารถดูดกลืนได้ แล้วเปลี่ยนเป็นพลังงานและถ่ายเทให้แก่คลอโรฟิลล์ เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงต่อไป

(2) ช่วยป้องกันและปกป้องเซลล์ของพืชจากการถูกทำลาย เนื่องจากปฏิกิริยาการสังเคราะห์แสงจะมีพลังงานเกิดขึ้นสูงมากและเกิดขึ้นรวดเร็ว แต่คลอโรฟิลล์ไม่สามารถดูดซับพลังงานที่เกิดขึ้นนี้ได้หมดทันที พลังงานที่มากเกินจะทำลายเซลล์ของพืช ซึ่งแคโรทีนอยด์จะไปรับพลังงานที่เกินนี้ แล้วจึงนำไปให้กับคลอโรฟิลล์ หรือไปรวมกับออกซิเจนเชิงเดี่ยว (singlet oxygen ($^1O_2$)) ไปทำลายพืช

หน้าที่ของแคโรทีนอยด์ที่ช่วยป้องกันการถูกทำลายของเซลล์เนื่องจากแสง จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์ โดยนำเบต้าแคโรทีนอยด์มาเป็นส่วนประกอบในลิปสติก สำหรับใช้ทาป้องกันแสงแดด (Wilhelm and Helmut, 1999) สำหรับในคนและสัตว์นั้นไม่สามารถผลิตสารแคโรทีนอยด์ได้ แต่สามารถดูดซึมเอาสารนี้จากอาหารที่บริโภคเข้าสู่ร่างกายได้ (นิธิยา, 2545)

2.2.2 แหล่งของแคโรทีนอยด์ (อนุสรณ์และสุรศักดิ์, 2534; กัณฌพนต์, 2538; อนุตตราและบุญตา, 2540)

นอกจากจะพบแคโรทีนอยด์ในพืชและสัตว์แล้ว ยังสามารถพบได้ในจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย รา และสาหร่ายอีกด้วย แคโรทีนอยด์พบได้หลายลักษณะ ดังนี้

(1) เป็นหยดไขมันเล็กๆ ในเซลล์เนื้อเยื่อพืช เช่น แครอท
(2) กระจายตัวเป็นอนุภาคคอลลอยด์ในส่วนที่เป็นไขมัน เช่น ปาลม์น้ำมัน
(3) จับกับโปรตีนในส่วนที่เป็นสารละลายในน้ำ (aqueous phase) เช่น ในผลไม้
(4) เกิดเอสเทอร์กับกรดไขมัน เช่น ในผลไม้สุก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.3 ประโยชน์ของสารแคโรทีนอยด์

(1) เป็นสารสี เนื่องจากโครงสร้างของแคโรทีนอยด์มีการเชื่อมต่อของพันธะคู่ (conjugated double bonds) เรียกว่าโครโมฟอร์ (chromophore) ทำให้แคโรทีนอยด์แต่ละชนิดดูดกลืนแสงที่ความ

ยาวคลื่นแตกต่างกัน จึงมีผลต่อสีที่ปรากฏของผลไม้ที่มีสารแคโรทีนอยด์เป็นส่วนประกอบ โดยสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์จะถูกนำไปใช้เป็นสีผสมอาหาร ตัวอย่าง เช่น เบต้า-แคโรทีน เบต้า-อะโพ-8'-แคโรทีนอล (alpha-apo-8'-carotenal) แซนโทฟิลล์ และแคนทาแซนทีน (canthaxanthin) ในสหรัฐอเมริกายอมให้ใช้สารทั้ง 4 ชนิดนี้ผสมในอาหารได้ (Gordon and Bauernfeind, 1982) ซึ่งสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ให้สีเหลือง-ส้ม และส้ม-แดง แก่ผลิตภัณฑ์อาหาร

ลักษณะของแคโรทีนอยด์ที่ใช้สีผสมอาหาร จะอยู่ในรูปสารละลายในน้ำมันหรือในน้ำ ตัวอย่างอาหารที่ใช้ เช่น ผลิตภัณฑ์เนย มาการีน และผลิตภัณฑ์ขนมอบ เป็นต้น และอาจเป็นสารที่กระจายตัวอยู่ในน้ำ ตัวอย่างอาหารที่ใช้ เช่น เครื่องดื่ม และไอศครีม (นิธิยา, 2545)

(2) เป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidant) เนื่องจากโครงสร้างของแคโรทีนอยด์มีพันธะคู่ที่สายของโมเลกุล ทำให้แคโรทีนอยด์มีความสามารถจับกับออกซิเจนเชิงเดี่ยว (singlet oxygen ($^1O_2$)) จึงป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจากออกซิเจนได้ โดยสารที่มีพันธะคู่มากยิ่งจับกับออกซิเจนได้ดี เช่น ไลโคพีน มีพันธะคู่ 11 คู่ จะจับออกซิเจนเชิงเดี่ยว $^1O_2$ ได้ดีกว่าเบต้าแคโรทีน ที่มีพันธะคู่ 9 คู่ นอกจากนี้โครงสร้างของแคโรทีนอยด์ที่มีหมู่อนุพันธ์ของออกซิเจนมาเกาะ จะมีความสามารถในการจับอนุมูลเพอรอกซิล peroxyl radical (ROO^o) ตัวอย่างเช่น ไวโอลาแซนทีน (violaxanthin) ซึ่งมีหมู่อนุพันธ์กลุ่มคีโตและไฮดรอกซิลมาเกาะ จะจับกับอนุมูลเพอรอกซิล (peroxyl radical) ได้ดีกว่าเบต้าแคโรทีน ซึ่งไม่มีหมู่อนุพันธ์ในโครงสร้างโมเลกุล จากคุณสมบัติดังกล่าว ทำให้มีการนำสารกลุ่มแคโรทีนอยด์มาใช้เป็นส่วนประกอบ หรือเคลือบผิวอาหาร เพื่อป้องกันการออกซิเดชัน ทำให้อาหารมีอายุการเก็บรักษานานขึ้น (Borenstein, 1979)

(3) เป็นสารโปรวิตามินเอ (provitamin A) กลุ่มของแคโรทีนอยด์ที่พบในปัจจุบันมีมากถึง 600 ชนิด แต่มีประมาณ 50-60 ชนิดเท่านั้นที่สามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอได้ (ตารางที่ 2) และแคโรทีนอยด์ที่พบปริมาณมากในอาหารมี 4 ชนิด ได้แก่ แอลฟา-เบต้า- และแกมมา-แคโรทีน (α-,β-,γ-carotene) และเบต้า-คริพโตแซนทิน (β-cryptoxanthin) (Ball, 1992)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.2 สารในกลุ่มแคโรทีนอยด์เมื่อเปรียบเทียบเป็น activity ของวิตามินเอ

แคโรทีนอยด์	Activity (%)
all-*trans*-β-carotene	100
9-*cis*-β-carotene	38
13-*cis*-β-carotene	53
all-*trans*-α-carotene	53
9-*cis*-α-carotene	13
13-*cis*-α-carotene	16
all-*trans*-cryptoxanthin	57
9-*cis*-cryptoxanthin	27
15-*cis*-cryptoxanthin	42
β-carotene 5,6-epoxide	21
β-carotene 5,8-epoxide	80
γ-carotene	42-50
β-zeacarotene	20-40

(ที่มา : กัณฌพนต์, 2538)

(4) ลดอัตราการเกิดโรค สืบเนื่องจากสมบัติต่างๆ ของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ จึงมีการวิจัยถึงชนิดของสารแคโรทีนอยด์เพื่อใช้ในการรักษาโรค ตัวอย่างเช่น เบต้าแคโรทีน พบว่าช่วยในการลดอัตราการเป็นมะเร็งปอดของกลุ่มเสี่ยง (Wilhelm and Helmut, 1999) นอกจากนี้ยังพบว่าแคโรทีนอยด์มีอิทธิพลต่อระบบภูมิคุ้มกัน ควบคุมการเจริญและเปลี่ยนแปลงของเซลล์ มีอิทธิพลใน gap junction communication (Hughes *et al.*, 1997) และยังช่วยป้องกันการเจ็บป่วยจากโรคหัวใจอีกด้วย (Vince *et al.*, 1999)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.4 การเสื่อมสลายของแคโรทีนอยด์

2.2.4.1 เกิดจากปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชัน (Isomerization) ปฏิกิริยานี้เกิดจากปัจจัยต่างๆ ดังนี้

(1) *ความร้อน* แคโรทีนอยด์ที่พบในธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นรูปแบบทรานส์ (*tran* form) หากได้รับแสงและมีความร้อนหรือรังสี จะทำให้โครงสร้างเกิดการบิดตัวไป 180 องศา เปลี่ยนเป็นรูปแบบซิส (*cis* form) ซึ่งรูปแบบซิส (*cis* form) จะไม่ค่อยเสถียร มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสั้นลง และมีค่าสัมประสิทธิ์ (molecular extinction coefficient) ต่ำ สีที่ปรากฏจะอ่อนกว่ารูปแบบทรานส์ (*trans* form) การเกิดเทอร์มอร์ไอโซเมอไรเซชัน (thermal isomerization) เป็นการ

เปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิต โดยอุณหภูมิสูงจะทำให้เกิดการสูญเสียแคโรทีนอยด์ และควรเก็บรักษาตัวอย่างอาหารที่มีสารแคโรทีนอยด์ที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยชะลอการสูญเสียแคโรทีนอยด์ไว้ได้ Lisiewska and Kmiecik (2000) รายงานว่าการเก็บรักษาชิ้นมะเขือเทศที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียสสูญเสียเบต้าแคโรทีนและสารประกอบอื่นๆ น้อยกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเท่ากัน

(2) *ความเป็นกรด* ในสภาพเป็นกรดทำให้เบต้าแคโรทีน เปลี่ยนเป็นไอโซเมอร์อีพอกไซด์ (epoxide isomer) ซึ่งเกิดจากการจับตัวของออกซิเจนที่พันธะคู่ของวงแหวนในโครงสร้าง เกิดเป็น 5,6-epoxide ซึ่งมีสีจางกว่าเบต้าแคโรทีน (อนุสรณ์และสุรศักดิ์, 2534; กัณณพนต์, 2538; อนุตตราและบุญตา, 2540)

2.2.4.2 เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน

(1) *ออกซิเจน* เมื่อแคโรทีนอยด์สัมผัสกับอากาศ ที่ตำแหน่งพันธะคู่ในโครงสร้างของโมเลกุล จะไปจับออกซิเจนเกิดเป็นสีน้ำตาลของไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide) สารประกอบคาร์บอนิล และสารระเหยอื่นๆ ปฏิกิริยานี้เป็น direct oxidation อัตราการสูญเสียแคโรทีนอยด์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ไม่ได้ขึ้นกับออกซิเจนเพียงอย่างเดียว แต่ขึ้นอยู่อุณหภูมิ ความเข้มของแสง และความร้อนเป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาด้วย การเก็บรักษาสารแคโรทีนอยด์ในสภาวะที่มีออกซิเจน เบต้าแคโรทีนจะสูญเสียเป็นอันดับแรก แคนต้าแซนทีนไวต่อการเกิดออกซิเดชันน้อยสุด และapo-carotenal มีอัตราการสูญเสียเร็วที่สุด แต่ bixin ที่สกัดได้จาก annatto มีความเสถียรมากเมื่อเก็บรักษาไว้ในสภาวะที่มีอากาศ

การป้องกันการออกซิเดชันจากออกซิเจน สามารถกระทำได้โดยการเติมสารต้านออกซิเดชัน (antioxidation) เช่น กรดแอสคอร์บิก และบิวทิวเลทไฮดรอกซีเทอลูอีน (Butylated hydroxytoluen ; BHT) เป็นต้น หรือไม่ให้อาหารสัมผัสกับอากาศขณะเก็บรักษา เช่น ใช้น้ำมันเคลือบผิวหรือบรรจุก๊าซเฉื่อยในภาชนะบรรจุ หรือบรรจุแบบสูญญากาศ (อนุสรณ์และสุรศักดิ์, 2534; กัณณพนต์, 2538; อนุตตราและบุญตา, 2540)

(2) *กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว* เนื่องจากกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวสามารถรวมตัวกับออกซิเจนได้ และทำให้แคโรทีนอยด์เกิดออกซิเดชันไปด้วย เรียกว่าการเกิดออกซิเดชันร่วม (co-oxidation) เป็นปฏิกิริยาแบบทางอ้อม (indirect oxidation) สามารถป้องกันได้โดยใช้กรดไขมันชนิดอิ่มตัวในการผสมกับแคโรทีนอยด์

(3) *การปนเปื้อนของโลหะ* อิออนของโลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้แคโรทีนอยด์เสื่อมสภาพ และถ้ามีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวรวมอยู่ด้วย การเสื่อมสลายจะยิ่งเร็วขึ้น ตัวอย่างเช่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

โลหะทองแดงจะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลโคพีนให้เร็วขึ้น 3.5 เท่า เนื่องจากอิออนของทองแดงจะไปเร่งให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radical) เร็วขึ้น

(4) *แสงสว่าง* ปฏิกิริยาออกซิเดชันเนื่องจากแสงสว่าง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีกลิ่น และรสชาติ การเกิดออกซิเดชันจากแสงสว่างจะรุนแรงมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับปริมาณของออกซิเจนในอากาศด้วย

(5) *เอนไซม์* การเสื่อมสลายของแคโรทีนอยด์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ จะเกิดขึ้นได้เนื่องจากแคโรทีนอยด์ที่อยู่ภายในเซลล์ในรูปของสารเชิงซ้อนของรงควัตถุกับโปรตีน (pigment-protein complex) ซึ่งมีความเสถียรมาก ดังนั้นต้องมีสารที่สามารถมาทำลายโครงสร้างนี้ได้ คือ เอนไซม์ เมื่อแคโรทีนอยด์อยู่ในรูปอิสระ ก็จะเกิดการเสื่อมสลายได้ง่าย เอนไซม์ที่ทำให้เกิดการสูญเสียแคโรทีนอยด์ มีดังนี้

5.1 เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase : POD) เอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารแคโรทีนอยด์ทั้งทางตรงและทางอ้อม

Carotenoid —(peroxidase)→ 5,6-Epoxide —(plant acid)→ 5,8-Epoxide

การเสื่อมสภาพทางอ้อม คือ การเกิดออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งมีผลกระทบทำให้แคโรทีนอยด์เกิดออกซิเดชันตามไปด้วย

5.2 ไลปอกซิเดส (Lipoxidase) เอนไซม์นี้จะทำให้ไขมันเกิดอนุมูลอิสระ และอนุมูลอิสระของไขมันนี้จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับแคโรทีนอยด์

5.3 ไลโปเปอร์ออกซิเดส (Lipoperoxidase) เอนไซม์นี้จะทำให้เกิดการสลายของแคโรทีนอยด์ต่อเมื่อมีเปอร์ออกไซด์ของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวรวมอยู่ด้วย ซึ่งเกิดจากเอนไซม์ไลปอกซิเดส หรือเกิดจากการออกซิเดชันโดยอาศัยเอนไซม์

(6) *น้ำ* น้ำเป็นส่วนประกอบที่ช่วยให้เอนไซม์ทำงานได้ดี หากตัวอย่างถูกกำจัดน้ำออกไปบางส่วนจะทำให้เอนไซม์ทำงานได้ลดน้อยลง แต่การที่ไม่มีน้ำอยู่ตัวอย่างเลยจะทำให้ผิวนอกของตัวอย่างมีโอกาสสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศได้มากขึ้น และหากน้ำในตัวอย่างเหลือน้อยเกินไป จะทำให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพมากขึ้น ที่สภาวะนี้เซลล์จะเกิดความเสียหายและตายลง เอนไซม์สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารที่เกิดการออกซิเดชันได้ง่ายขึ้น ดังนั้นตัวอย่างที่มีน้ำอยู่น้อยจะเกิดการสูญเสียแคโรทีนอยด์ได้ง่าย (อนุสรณ์และสุรศักดิ์, 2534 ; กัณฒพนต์, 2538 ; อนุตตราและบุญตา, 2540)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.5 การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์

การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่เป็นส่วนประกอบทางเคมีในอาหาร วิธีที่นิยมใช้กันส่วนใหญ่ คือ วิธีลิควิดโครมาโตกราฟี (Liquid Chromatography) โดยจะสกัดสารในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ออกมาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดมักเป็นตัวทำละลายผสมหลายชนิดที่มีขั้ว (polar) มากน้อยแตกต่างกัน ในการเลือกใช้ตัวทำละลายนั้นต้องจะต้องมีความระมัดระวัง เพราะตัวทำละลายบางชนิดเมื่อผสมกันแล้วอาจได้สารอื่นเกิดขึ้นได้ เช่น หากใช้คลอโรฟอร์มผสมกับเมทานอลในการสกัดจะเกิดเป็นกรดไฮโดรคลอริกขึ้น จึงไม่ใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดนี้ผสมกันในการสกัดแคโรทีนอยด์ หลักการพื้นฐานของวิธีลิควิดโครมาโตกราฟี (Liquid Chromatography) คือ การให้สารที่ต้องการแยกอยู่ในรูปของสารละลาย โดยนำตัวอย่างมาผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลาย จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปผ่านสารดูดซับ (Stationary phase) ซึ่งสารดูดซับจะอยู่ในรูปใดขึ้นอยู่กับชนิดของสารดูดซับและวิธีโครมาโตกราฟี (chromatography) ที่ใช้ สารละลายตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านสารดูดซับ โดยมีตัวทำละลายพาเคลื่อนที่ไป (mobile phase) สารที่เป็นส่วนประกอบในสารละลายชนิดใดที่ติดอยู่กับสารดูดซับได้ดี จะเคลื่อนที่ไปบนสารดูดซับได้ช้ากว่าสารที่ติดอยู่กับสารดูดซับได้ไม่ดี ดังนั้นสารประกอบที่ละลายอยู่ในสารละลายตัวอย่างจะแยกออกจากกันได้ ตามความสามารถในการจับอยู่กับสารดูดซับ วิธีลิควิดโครมาโตกราฟี (Liquid Chromatography) สามารถแบ่งออกได้หลายชนิด ได้แก่

(1) Open Column Chromatography (OCC) เป็นการบรรจุสารที่สามารถแยกสารในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายมาแล้ว ตัวอย่างของสารดูดซับที่ใช้ในการบรรจุในคอลัมน์ เช่น ซิลิกาเจล (silica gel) แมกนีเซียมออกไซด์ (MgO) และ MgO-Hyflo Supercel ซึ่งการวิเคราะห์สารในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ด้วยวิธีนี้จะแยกได้เพียงกลุ่มใหญ่ของแคโรทีนอยด์ คือ แคโรทีนและแซนโทฟิลล์ แต่วิธีนี้ก็เป็นที่ยอมรับในการวิเคราะห์ตามวิธีของ AOAC(2002)

(2.) Thin Layer Chromatography (TLC) เป็นการนำสารดูดซับที่ใช้ในการแยกไปเคลือบบนแผ่นกระจก แล้วให้สารละลายตัวอย่างที่สกัดมาวิ่งไปบนแผ่นเคลือบ วิธีนี้สามารถจำแนกสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ได้ถึงไอโซเมอร์ของมัน ว่าเป็นชนิด แอลฟา เบต้า และแกมมา แต่ยังไม่สามารถบอกได้ว่าอยู่ในรูปของ *trans* form หรือ *cis* form

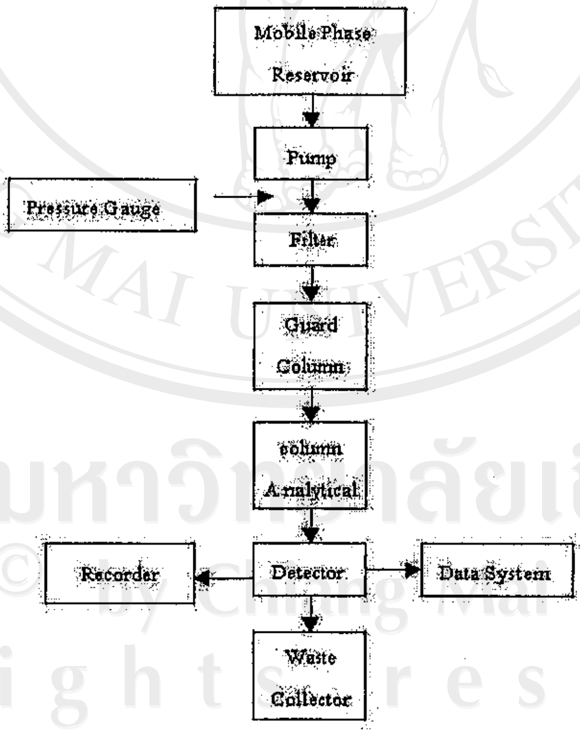
(3) High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก โดยใช้หลักการในการแยกเหมือนกับ Open Column Chromatography แต่วิธีนี้จะสามารถจำแนกชนิดของสารแคโรทีนอยด์ได้ละเอียดมาก ถึงระดับที่ สามารถแยก *trans* form หรือ *cis* form ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 หลักการแยกสารด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC เป็นเทคนิคการแยกสารประกอบ (Substances) โดยอาศัยหลักการความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบใน Stationary Phase ของคอลัมน์โดยมี Mobile Phase เป็นตัวพาไป เมื่อต่อเข้ากับ Detector จะสามารถตรวจวัดสารที่ออกมาจากคอลัมน์ (Analytes or Solutes) ได้อย่างต่อเนื่องสามารถตรวจวัดทั้งเชิงคุณภาพ (Qualitative Analysis) และเชิงปริมาณ (Quantitative Analysis) ส่วนใหญ่นิยมใช้วิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยยาก (Low Volatile Substation) หรือน้ำหนักโมเลกุลสูง(High Molecular Weight Compounds)

HPLC สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิด เช่น สารอินทรีย์ สารประกอบทางชีวภาพ โพลีเมอร์ คู่อิแนนทิโอเมอร์ สารประกอบที่เสียสภาพได้ง่าย สารประกอบที่ระเหยยาก ไอออนขนาดเล็ก ไมโครโมเลกุล ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ต้องเป็นของแข็งหรือของเหลว ต้องละลายได้ 100 % (กรองด้วย) การแยกสารจะประสบความสำเร็จได้ก็ต่อเมื่อสารมีอัตราการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์ สารประกอบที่ถูกแยกนั้นจะเคลื่อนที่ไปตามความยาวทั้งหมดของคอลัมน์ โดยมี Mobile Phase เป็นตัวพาไป



รูปที่ 2.5 ส่วนประกอบต่างๆ ของเครื่อง HPLC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(1) ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase reservoir)

เป็นขวดสำหรับใส่ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ความจุประมาณ 1 ลิตร แต่ใน Preparative HPLC ความจุของขวดควรจะมากกว่านี้ และจะมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการไล่อากาศที่ละลายอยู่ จุดประสงของการไล่อากาศ คือ ต้องการกำจัดแก๊สออกซิเจนซึ่งอาจจะทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ การไล่แก๊สจะต้องทำเมื่อตัวทำละลายเป็นสารมีขั้ว (Polar Solvents)

(2) ระบบของปั๊ม(Pumping System)

ในระบบมีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ที่จะไหลผ่านคอลัมน์ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานการไหลที่ว่านี้จะมากเมื่อใช้อนุภาคเล็กๆและคอลัมน์มีขนาดเล็กอีกด้วย จึงจำเป็นต้องใช้ความดันที่สูงดันเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลไป

ปั๊มแบ่งออกเป็น 2 ชนิด

2.1 ปั๊มเชิงกล (Mechanical pump) เป็นปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่

2.2 ปั๊มนิวเมติก (Pneumatic pump) เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่

(3) อุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวัดความดัน (Pressure Monitoring Devices)

อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับตรวจวัดความดันซึ่งอยู่ระหว่างทางเข้าของคอลัมน์กับปั๊ม อุปกรณ์ตรวจวัดนี้จะบอกความดันของเฟสเคลื่อนที่ก่อนเข้าสู่คอลัมน์ เป็นสิ่งที่บ่งบอกว่ามีการอุดตันหรือไม่หรือการทำงานของปั๊มล้มเหลวหรือไม่ นอกจากนี้ การทราบความดันของเครื่องจะช่วยทำให้การปรับพารามิเตอร์ต่าง ๆ เป็นไปอย่างเหมาะสมที่สุด

(4) Sample Introduction Devices

การผ่านสารตัวอย่างเข้าไปยัง LC คอลัมน์ นั้นมีความสำคัญค่อนข้างมากต่อการแยกสาร ทั้งนี้เนื่องจากสารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ควรจะอยู่ในลักษณะที่เป็นแถบที่แคบมากที่สุดเท่าที่จะเป็นได้ ดังนั้นวิธีการต่าง ๆ ที่จะใช้มีหลายวิธี แต่ที่นิยมใช้คือ microsampling valve ส่วนวิธีที่ง่ายที่สุดคือใช้วิธีฉีดสารตัวอย่างผ่าน septum ด้วย microsyringe และควรต้องระวังเนื่องจากความดันภายในสูง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(5) Microsampling Valve

การผ่านสารเข้า LC คอลัมน์โดยใช้ microsampling valve สารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปจะอยู่ในท่อซึ่งอยู่ภายนอกที่ต่อเข้ากับ valve นี้ microsampling valve ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันสามารถนำมาใช้กับสารตัวอย่างที่มีขนาดตั้งแต่ 0.5 ไมโครลิตร จนกระทั่งหลายมิลลิลิตร งวาล์วประเภทนี้ยังสามารถใช้งานได้ที่ความสูงถึง 5 ,000-6,000 พีเอสไอ (psi) โดยที่ไม่เกิดการรั่วไหล

(6) Guard column

ทำหน้าที่เหมือนกับคอลัมน์จึงดักสารที่ไม่ Elute หรืออนุภาคเล็ก ๆ เพื่อยืดอายุของคอลัมน์

(7) คอลัมน์ (Column) มีลักษณะทั่วไป ดังนี้

- คอลัมน์ทำด้วย Stainless steel
- เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก
- เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1 ,3,4.6 มิลลิเมตร
- ความยาว 10 ,12.5,15,25 เซนติเมตร
- ขนาดอนุภาค 3 ,5,10 ไมโครเมตร
- ปิดหัว-ท้ายด้วย Stainless steel gauze
- Reducing unions

ภายในคอลัมน์จะบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งจนเต็ม ซึ่งอนุภาคนี้จะต้องบรรจุให้แน่นและไม่มีช่องว่าง จะต้องใช้ปั๊มช่วยให้ตัวทำละลายไหลผ่าน อุณหภูมิของคอลัมน์ สามารถควบคุมได้โดยการติดตั้งคอลัมน์ไว้ในฮิตเตอร์คอลัมน์ (Heater Column) ปัจจุบันคมลัมน์มีขนาดเล็กลงเรียกว่าไมโครบอร์คมลัมน์ (Micro bore column)

(8) เครื่องตรวจวัด (Detector) โดยสิ่งที่ต้องการ คือ ความไวของเครื่องตรวจวัดซึ่งสามารถตรวจวัดสิ่งที่ออกมาจากคอลัมน์ได้อย่างต่อเนื่อง ดังนั้น เครื่องตรวจวัดในอุดมคติควรมีลักษณะดังนี้

- มีความไวสูง และให้สัญญาณตอบรับ (response) ที่คาดคะเนได้
- ให้สัญญาณตอบรับ(response) ได้กับสารทุกชนิด
- ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและอัตราเร็วของการไหลของเฟสเคลื่อนที่
- เชื่อถือได้และง่ายต่อการใช้งาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

• ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นและสัญญาณตอบรับของเครื่องตรวจวัดควรมีสภาพ เชิง เส้น(linearity) ในช่วงกว้าง

• ไม่ทำลายสาร

• ให้ข้อมูลเกี่ยวกับคุณภาพวิเคราะห์สำหรับ peak ที่ต้องการตรวจสอบ

8.1 ชนิดของเครื่องตรวจวัด

เครื่องตรวจวัดของลิควิดโครมาโตรกราฟี (Liquid Chromatrography) สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่

8.1.1 bulk property หรือ general detectors เป็นการ วัดการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางกายภาพของเฟสเคลื่อนที่รวมกับของตัวถูกละลาย เช่น refractive index และ conductivity detectors

เครื่องดิฟเฟอเรนเชียลรีแฟรกโตมิเตอร์ (Differential Refractometers) เป็นเครื่องที่นิยมมากใน HPLC รองลงมาจากเครื่องยูวี ดีเทคเตอร์ ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของดรรชนีหักเห (refractive index,RI) อย่างต่อเนื่อง ระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสเคลื่อนที่ที่มีสารประกอบของตัวถูกละลาย ละลายอยู่ ขณะผ่านออกจากคอลัมน์ สามารถให้สัญญาณกับตัวทำละลายได้ทั้งหมด ตราบที่ตัวถูกละลายมีค่าดรรชนีหักเหต่างจากเฟสเคลื่อนที่ เครื่อง RI ที่สำคัญมีอยู่ 3 ชนิด

(1.) Fresnel Refractometer

(2.) Deflection Refractometer

(3.) Interferometric Refractometer

8.1.2 Solute property หรือ selective detectors เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของตัวถูกละลายเพียงอย่างเดียวเท่านั้น เช่น UV-VIS , fluorescence หรือ electrochemical detectors เป็นต้น

8.1.2.1 ยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์(UV-VIS Detectors)

หลักการทำงานโดยอาศัยการดูดกลืนแสงยูวีของสารตัวอย่าง มีลักษณะที่พิเศษ คือ ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหลและอุณหภูมิ แต่ค่อนข้างมีความไวสูงกับสารประกอบอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ ยูวี-วิสิเบิลที่นิยมใช้ใน HPLC แบ่งเป็น 3 ชนิด

(1.) Fixed-wavelength UV detector

(2.) Variable UV-VIS detector

(3.) Photodiode-array detector

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8.1.2.2 ดีเทคเตอร์ฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent Detector)

เป็นเครื่องตรวจวัดที่มีสภาพความไวสูงเฉพาะ(selective) เนื่องจากมีความสามารถในการวัดฟลูออเรสเซนต์ที่ได้ออกมาจากตัวถูกละลายบางชนิดเมื่อถูกกระตุ้น (excited) ด้วยแสงยูวี ดีเทคเตอร์ชนิดนี้มีประโยชน์มากเมื่อนำมาตรวจหาสาร ในสารตัวอย่างทางชีวภาพ (biological samples) ต่าง ๆ ที่มีปริมาณน้อย ๆ

Patricia *et al.* (2005) ได้ศึกษาองค์ประกอบของแคโรทีนอยด์ในผักชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค HPLC โดยคอลัมน์ที่ใช้ในการทดลองเป็น C-18 reversed-phase เครื่องตรวจวัดเป็นแบบ UV-vis photodiode array detector สารละลายเคลื่อนที่ประกอบด้วย อะซีโตไนไตรท์ (Acetonitrile) ที่ผสมไตรเอทิลลามีน (Triethylamine) 0.05%, เมทานอล (Methanol) และเอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate) อัตราส่วน 60 : 20 : 20 และอัตราเร็วของการชะเท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ผลการทดลองพบว่า แครอทมีองค์ประกอบของแอลฟาแคโรทีน ปริมาณ 35.0 ไมโครกรัมต่อกรัม และเบต้าแคโรทีน ปริมาณ 61.5 ไมโครกรัมต่อกรัม และมีลูทิน ปริมาณ 5.1 ไมโครกรัมต่อกรัม

Marx *et al.* (2003) ได้ศึกษากระบวนการใช้ความร้อนที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลง ทรานส์ซิสไอโซเมอร์ไรเซชัน (*trans-cis* isomerization) ของสารเบต้าแคโรทีนในน้ำแครอท ด้วยเทคนิค HPLC สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ประกอบด้วย คอลัมน์ C-30 Reversed phase พบว่ากระบวนการพาสเจอไรส์เซชัน (Pasteurization) และสเตอริไลเซชัน (Sterilization) ที่ 121°ซ มีผลต่อการเกิด Isomerization เพียงเล็กน้อย แต่การลวกและการสเตอริไลเซชัน (Sterilization) ที่ 130°ซ จะส่งผลให้ระดับการเกิดไอโซเมอร์รูปแบบซิส (*cis*-isomer) เพิ่มสูงขึ้น และการเติมน้ำมันสกัดจากเมล็ดองุ่นทำให้เกิดไอโซเมอร์ไรเซชัน (Isomerization) เพิ่มขึ้นทั้งในน้ำแครอทที่ไม่ผ่านความร้อนและที่ผ่านความร้อน

Sant Ana *et al.* (1998)ได้วิเคราะห์หาองค์ประกอบของแคโรทีนอยด์ในแครอทที่ผ่านการแปรรูปในหลากหลายวิธี ด้วยเทคนิค HPLC สภาวะที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย คอลัมน์ reverse phase สารละลายเคลื่อนคือ เมทานอล (Methanol): อะซีโตไนไตรท์ (Acetonitrile) : เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate) ในอัตราส่วน 80:10:10 และ เครื่องตรวจวัดเป็นแบบ UV-vis detector ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 449 นาโนเมตร อัตราเร็วในการชะเท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อนาที ผลการทดลองพบว่าปริมาณแคโรทีนมีค่าอยู่ในช่วง 56.0-89.1 เปอร์เซ็นต์ และการทำแห้งแครอทส่งผลทำให้มีการสูญเสียแอลฟา-และเบต้า-แคโรทีนมากที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 การใช้ความร้อนในการถนอมอาหาร

การใช้ความร้อนแปรสภาพอาหาร (thermal processing) หมายถึง การใช้อุณหภูมิสูงเพื่อช่วยถนอมรักษาอาหาร โดยความร้อนจะทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้โทษและทำให้อาหารเสื่อมเสีย เอนไซม์ สารพิษ พยาธิ และแมลงต่างๆ ที่ไม่สามารถทนต่อความร้อนได้ การถนอมอาหารโดยใช้ความร้อนสามารถกระทำได้ 2 วิธี คือ การพาสเจอไรซ์ (pasteurization) และการสเตอริไลซ์ (sterilization)

2.4.1 การพาสเจอไรซ์ (pasteurization)

เป็นวิธีการถนอมอาหารโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิไม่สูงนักโดยมุ่งทำลายแบคทีเรียพวกที่ไม่สร้างสปอร์และไม่ก่อให้เกิดโรคกับมนุษย์ (pathogenic bateria) ส่วนจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ทนความร้อนของการพาสเจอไรซ์ได้นี้จะทำให้อาหารเสียได้ ดังนั้นอาหารที่ผ่านการพาสเจอไรซ์ต้องอาศัยความเย็นช่วยเก็บรักษา

กระบวนการพาสเจอไรซ์จากทำได้ 2 ระบบ คือ

1. ระบบช้าอุณหภูมิต่ำหรือ Low Temperature Long Time (LTLT) เป็นระบบที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เป็นวิธีที่ง่าย สามารถทำได้ในระดับครัวเรือน
2. ระบบเร็วอุณหภูมิสูงหรือ High Temperature Short Time (HTST) เป็นระบบที่ให้ความร้อนในระดับสูงขึ้นแต่ใช้เวลาสั้นลง เช่นใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที แล้วทำให้เย็นลงโดยเร็ว

2.4.2 การสเตอริไลซ์ (sterilization)

เป็นวิธีการถนอมอาหารโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงว่าการพาสเจอไรซ์ ซึ่งอาจเป็นอุณหภูมิภายใต้น้ำเดือดหรือว่าสูงกว่าเพื่อทำลายสิ่งมีชีวิตทั้งหลายรวมทั้งสปอร์ของจุลินทรีย์ให้หมดไป แต่ในทางอุตสาหกรรมอาหารสามารถทำได้เพียงให้ความร้อนที่จะทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสียและทำให้ผู้บริโภคปลอดภัย เมื่อบริโภคอาหารนั้นภายใต้สภาวะการเก็บรักษาและขนถ่ายโดยปกติ ปริมาณความร้อนที่ใช้ในระดับนี้เรียกว่า การฆ่าเชื้อที่ใช้ทางการค้า (commercial sterilization) ซึ่งเพียงพอที่จะทำลายจุลินทรีย์และสปอร์ที่ทนความร้อนมากที่สุด อาหารที่ได้จากการสเทอริไลซ์ถือได้ว่าเป็นอาหารที่ปลอดเชื้อ (commercial sterilized food) สามารถเก็บรักษาได้นานโดยไม่ต้องอาศัยห้องเย็น เช่น การทำอาหารกระป๋อง การสเทอริไลซ์น้ำนมวัวโดยกระบวนการยู.เอช.ที (UHT-Ultra High Temperature) นิยมใช้อุณหภูมิ 135-150 องศาเซลเซียส นาน 1- 4 วินาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Marx *et al.* (2003) ได้ศึกษากระบวนการใช้ความร้อนที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทรานส์-ซิสไอโซเมอร์ไรเซชัน (*trans-cis* isomerization) ของสารเบต้าแคโรทีนในน้ำแครอท พบว่ากระบวนการพาสเจอไรซ์ (Pasteurization) และสเทอริไลซ์ (Sterilization) ที่ 121°ซ มีผลต่อการเกิดไอโซเมอร์ไรเซชัน (Isomerization) เพียงเล็กน้อย แต่การลวกและการสเทอริไลซ์ (Sterilization) ที่ 130 องศาเซลเซียส จะส่งผลให้ระดับการเกิดรูปแบบที่เป็นซิส (*cis*-isomer) เพิ่มสูงขึ้น และการเติมน้ำมันสกัดจากเมล็ดองุ่นทำให้เกิดไอโซเมอร์ไรเซชัน (Isomerization) เพิ่มขึ้นทั้งในน้ำแครอทที่ไม่ผ่านความร้อนและที่ผ่านความร้อน

2.5 การใช้ความดันสูงในการถนอมอาหาร

เมื่อของเหลวในอาหารที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบหลักถูกกดดัน จะทำให้ปริมาตรโดยรวมของของเหลวนั้นลดลงเล็กน้อย ซึ่งจะเป็นผลทำให้สารละลายหรือสารแขวนลอยอยู่ในน้ำเกิดการเปลี่ยนแปลงให้เหมาะสมกับปริมาตรเล็กลง การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเพื่อปรับสมดุลของการเปลี่ยนแปลงสภาวะนี้ จะเป็นไปตามหลักของเลอชาเตอลิเอ (Le Chatelira's Principle) ซึ่งกล่าวไว้ว่า "เมื่อมีความเค้นบางอย่าง (การเปลี่ยนแปลงความดัน) ถูกนำมากระทำกับระบบที่อยู่ในสภาวะสมดุลปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นเข้าแทนที่สภาวะสมดุลในทิศทางที่จะไปลดความเค้นนั้น" ในกรณีของอาหารจะเกิดการเปลี่ยนแปลงหลักๆ เช่น การสร้างหรือทำลายพันธะที่ไม่ใช่โควาเลนต์ (non-covalent) อันได้แก่ พันธะไฮโดรเจน, พันธะเชิงอิออน และพันธะไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ส่วนพันธะโควาเลนต์ (Covalent) จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง แม้จะใช้ความดันสูงถึง 1000 เมกะปาสคาล ดังนั้นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ซึ่งมีพันธะที่ไม่ใช่โควาเลนต์ (non-covalent) เป็นพันธะที่มีความสำคัญต่อโครงสร้าง และการทำงานจะถูกทำลายทางโครงสร้าง และสูญเสียประสิทธิภาพการทำงาน ในขณะที่สารประกอบโมเลกุลขนาดเล็กที่ไม่มีพันธะที่ไม่ใช่โควาเลนต์ (non-covalent) เช่น วิตามิน กลิ่นรส จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ การใช้ความดันสูงสามารถหยุดยั้งขบวนการทางชีวเคมีของสิ่งมีชีวิตซึ่งมีโมเลกุลอันซับซ้อนของพันธะที่ไม่ใช่โควาเลนต์ (non-covalent) ซึ่งทำให้สามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ (แต่สปอร์ของแบคทีเรียบางชนิดสามารถทนความดันสูงได้) นอกจากนี้ยังยับยั้งแอคติวิตี้ของเอนไซม์โดยการใช้ความดันสูงจะทำให้สูญเสียคุณสมบัติดั้งเดิม (denature) ที่แตกต่างจากการให้ความร้อนอีกด้วย

ลักษณะพิเศษที่สำคัญที่สุดของการใช้ความดันสูง คือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของพันธะที่ไม่ใช่โควาเลนต์ (non-covalent) เท่านั้นไม่ทำให้พันธะโควาเลนต์ (covalent) เปลี่ยนแปลง จึงไม่ทำลายสารอาหารที่มีคุณค่า และไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษ (toxic factor) อันเนื่องมาจากการให้ความร้อน อาหารที่ผ่านการใช้ความดันสูงจะยังคงรักษารสชาติและกลิ่นรสตามธรรมชาติเอาไว้ แต่ในทาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลับกันก็จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธะโควาเลนต์ (covalent) ที่เป็นประโยชน์ เช่นการเกิดกลิ่นไหม้ (heating flavour) และปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (Mailard reaction) เป็นต้น

2.5.1 ผลของความดันสูงต่อจุลินทรีย์

ความดันสูงสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ โดยทั่วไปแบคทีเรียที่อยู่ในระยะ log phase จะทนต่อความดันสูงได้น้อยกว่า (มีความไว (sensitive) มากกว่า) เซลล์ที่อยู่ในระยะ stationary สปอร์และจุลินทรีย์ที่อยู่ในระยะ death phase อย่างไรก็ตามความดันสูงขนาดปานกลาง (ระหว่าง 300-600 เมกกะปาสคาล) จะสามารถยับยั้งการเจริญหรือทำลายเซลล์ปกติ (vegetative cells) ได้ Hoover *et al.* (1999)รายงานว่าการใช้ความดัน 350 เมกกะปาสคาล เป็นเวลา 30 นาที หรือ 400 เมกกะปาสคาล เป็นเวลา 5 นาที จะสามารถลดปริมาณเซลล์ปกติของแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อราได้ถึง 10 เท่า การใช้ความดันที่ระดับสูงมากจะทำให้สปอร์ของแบคทีเรียงอกและทำลายเซลล์ที่งอกนี้ เป็นที่รู้กันว่าความดันสูงทำให้แวคคิวโอล (vacuoles) ภายในเซลล์แตกและทำลายผนังเซลล์และเซลล์เมมเบรน โดย Knorr (1995) สันนิษฐานว่าอาจเกิดจากการที่ความดันสูงมีผลต่อเอนไซม์ภายในเซลล์เป็นผลให้เมตาบอลิซึมต่างๆ ถูกทำลาย อย่างไรก็ตามผลของความดันสูงต่อจุลินทรีย์สามารถสรุปเป็นข้อๆ ได้ดังนี้

2.5.1.1 ผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของจุลินทรีย์

โดยทั่วไปแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ที่ความดันระหว่าง 200-300 เอทีเอ็ม ส่วนจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ที่ความดันที่สูงกว่า 400-500 เอทีเอ็ม เรียกว่า barophiles ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะเจริญได้น้อยมากหรือไม่เจริญเลยที่ความดันในช่วง 300-400 เอทีเอ็ม ส่วนจุลินทีย์ที่จะเจริญในช่วงความดัน 1-500 เอทีเอ็ม นั้นเรียกว่าอียูรีบาริก (eurybaric) และจุลินทรีย์ชนิดบาโรดูริก (baroduric) จะรอดชีวิตแต่จะไม่สามารถเจริญได้ที่ความดันที่สูงตั้งแต่ 500-2000 เอทีเอ็ม ผลของความดันสูงต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของจุลินทรีย์ได้แก่

(1) ผลต่อการสร้างฟิลาเมนต์ (filament)

การสร้างฟิลาเมนต์เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เด่นชัดของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ เมื่อจุลินทรีย์เหล่านี้ได้รับความดันสูง เช่น *Escherichia coli* จะสร้างฟิลาเมนต์จำนวนมากที่ความดันในช่วง 240-400 เอทีเอ็ม และที่ความดัน 400 เอทีเอ็ม พบว่าเชื้อนี้จะเจริญและมีขนาดยาว 10-100 ไมโครเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ขนาดปกติ (1-2 ไมโครเมตร) ซึ่งเจริญที่ 1 เอทีเอ็ม โดยพบว่าฟิลาเมนต์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของความดันมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวที่ไม่มีปล้อง (single umsegmented cell) มีความกว้างประมาณ 0.6 ไมโครเมตร เชื้อ *Vibrio* spp. จะสร้างฟิลาเมนต์ที่มีขนาดยาว 5-8 เท่าของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซลล์ปกติที่เจริญที่ 1 เอทีเอ็ม ส่วน *Bacillus mycoides* จะมีขนาดยาวขึ้น 2-3 เท่า เมื่อให้ความดันที่ 270 เอทีเอ็ม และ *Serratia marinorubra* จะสร้างฟิลาเมนต์ที่ยาวถึง 200 ไมโครเมตร ที่ความดัน 600 เอทีเอ็ม เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติที่มีความยาว 0.6-1.5 ไมโครเมตร ที่เจริญที่ความดัน 1 เอทีเอ็ม การสร้างฟิลาเมนต์ของจุลินทรีย์เมื่อให้ความดันสูงจะมีความแตกต่างกันขึ้นกับสปีซีส์และสายพันธุ์ ในส่วนของปริมาณโปรตีนที่สร้างขึ้นของ *E.coli* ต่อหน่วยความยาวของเซลล์เมื่อให้ความดันสูงแตกต่างกัน พบว่ามีความใกล้เคียงกัน โดยปริมาณของอาร์เอ็นเอ (RNA) ในเซลล์เพิ่มขึ้นมากอย่างเห็นได้ชัดในขณะที่ดีเอ็นเอ (DNA) ของเซลล์มีปริมาณน้อยกว่าอย่างเห็นได้ชัดเช่นเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เจริงที่ความดันปกติ

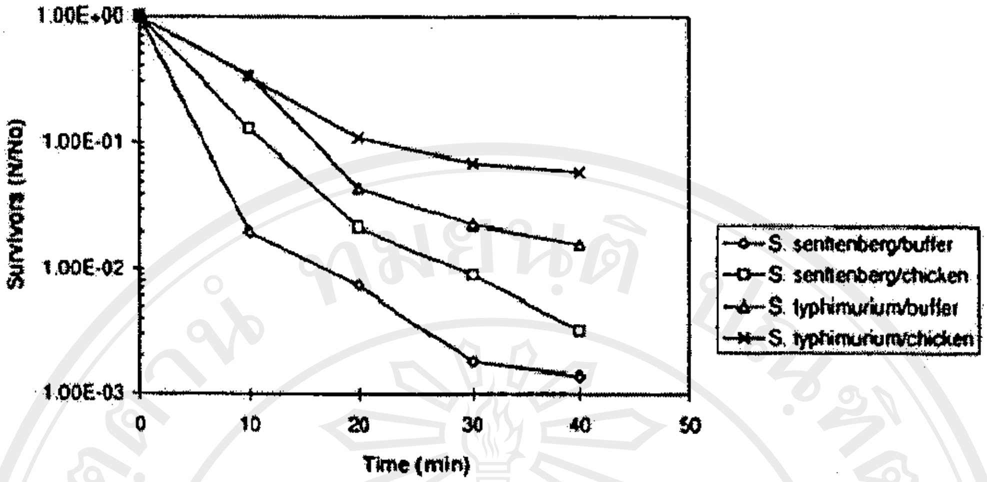
(2) การหยุดการเคลื่อนที่ (cessation of motility)

แบคทีเรียที่เคลื่อนที่ได้โดยส่วนใหญ่จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อให้ความดันต่อเนื่องที่ 200-400 เอทีเอ็มและที่ความดัน 100 เอทีเอ็ม พบว่า *E. coli, Vibrio* และ *Pseudomonas* จะยังคงมีแฟลกเจลลา (flagella) แต่เมื่อเพิ่มความดันเป็น 400 เอทีเอ็ม พบว่าเชื้อเหล่านี้จะสูญเสียอวัยวะนี้และในแบคทีเรียบางชนิดจะสามารถกลับมาเคลื่อนที่ได้อีกครั้ง

2.5.1.2 การทำลายจุลินทรีย์

ความดันสูงปานกลางมีผลทำให้อัตราการเจริญและการขยายพันธุ์ของจุลินทรีย์ลดลง ส่วนความดันที่สูงมากจะทำลายจุลินทรีย์ได้ ขนาดของความดันสูงที่สามารถยับยั้งการขยายพันธุ์และการเจริญจะมีค่าที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและสปีชีส์ (species) ของจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น การเจริญและการขยายพันธุ์ของ *E. coli* (ATTC 11303) จะถูกยับยั้งที่ความดันระหว่าง 100-500 เอทีเอ็ม และการขยายพันธุ์ (การเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิต) จะถูกยับยั้งมากกว่าการเจริญ (การเจริญเป็นการเพิ่มปริมาณชีวมวล (biomass) ซึ่งหาได้จากการวัดค่า optical density) Metrick *et al.* (1989) ศึกษาเปรียบเทียบการทนต่อความร้อนและความดันของ *Salmonella typhimurium* 7139 *S.senftenberg* 775W โดยเชื้อ *S. senftenberg* เป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อความร้อนและมีค่า D เท่ากับ 15 นาที ที่ 57.5 องศาเซลเซียส การศึกษาผลของความดันต่อเชื้อทั้งสองชนิดกระทำในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์และอาการทารกที่มีเนื้อไก่เป็นส่วนผสมหลักพบว่า ความดันสูงจะมีผลในการยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิดในบัฟเฟอร์มากกว่าในอาหารทารก ดังกราฟการรอดชีวิตของเชื้อในรูปที่ 6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 2.6 การรอดชีวิตของ Salmonella ในฟอสเฟสบัฟเฟอร์ 63 มิลลิโมล และอาหารทารกที่มีเนื้อไก่เป็นส่วนผสมจากการให้ความดันที่ 2,720 เอทีเอ็ม ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส

ที่มา : Metrick *et al.* (1989)

2.5.1.3 การทำลายสปอร์

การทำลายสปอร์ที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารสามารถทำได้โดยการใช้ความร้อนแต่จะมีผลเสียคือทำให้คุณภาพทางด้านต่างๆ ของผลิตภัณฑ์ลดลง การศึกษาการใช้ความดันสูงในการทำลายสปอร์ของ *Bacillus subtilis* ปริมาณเริ่มต้น 8 x10^4สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 93.6 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 1 เอทีเอ็ม พบว่าสามารถทำลายสปอร์ได้หมดภายในเวลา 1 ชั่วโมง แต่ถ้าเพิ่มความดันเป็น 600 เอทีเอ็ม ที่อุณหภูมิ 93.6 องศาเซลเซียส พบว่าต้องใช้เวลาถึง 4 ชั่งโมง เพื่อทำลายสปอร์ได้หมด ในทางกลับกันพบว่าที่อุณหภูมิต่ำ อัตราการทำลายสปอร์จะเพิ่มขึ้นเมื่อความดันสูงที่ใช้เพิ่มขึ้น โดยที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและความดัน 600 เอทีเอ็ม จะเร่งอัตราการทำลายสปอร์และพบสปอร์ที่รอดชีวิตปริมาณน้อยกว่า 10% ของจำนวนสปอร์เริ่มต้นหลังจากเวลาผ่านไป 48 ชั่งโมง (Johnson and Zobell, 1949) นอกจากนั้น Sale *et al.* (1969) ศึกษาการทำลายสปอร์ของ *Bacilllus* spp. โดยใช้ความดันสูงในช่วง 1,000 และ 8,000 เอทีเอ็ม พบว่าอัตราการทำลายสปอร์จะสูงกว่าเมื่อใช้ความดันสูงในระดับต่ำกว่า (ประมาณ 1,000 -3,000 เอทีเอ็ม) และเมื่อใช้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสร่วมด้วยพบว่าอัตราการทำลายสปอร์จะยิ่งเพิ่มมากขึ้นในช่วงความดันสูงระหว่าง 1,000 -3,000 เอทีเอ็ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.2 ผลของความดันสูงต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์

ความดันสูงสามารถทำลายหรือยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ มีรายงานผลของความดันสูงต่อซัคซิเนตฟอร์เมต (succinate formate) และมาเลตดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) ซึ่งมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ลดลง และเมื่อให้ความดันสูงถึง 1,000 เอทีเอ็ม เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้องจะสามารถทำลายเอนไซม์นี้ได้อย่างสมบูรณ์ Hoover *et al.* (1989) รายงานว่าปัจจัยที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์ด้วยความดันสูงได้แก่ค่าพีเอช (pH) ความเข้มข้นของสารตั้งต้น หน่วยย่อยของโครงสร้างเอนไซม์และอุณหภูมิขณะให้ความดันสูง อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าเอนไซม์บางชนิดสามารถคืนกิจกรรมหลังจากที่หยุดให้ความดันสูง เช่นแลคเทตดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) ใน *Bacillus stearothermophilus* ซึ่งเกิดการแยกของไดเมอร์ (dimer) ขณะได้รับความดันสูงและรวมตัวกันใหม่เมื่อหยุดให้ความดันสูง และพบว่าคุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ที่คืนกิจกรรมนี้ไม่แตกต่างจากเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการให้ความดันสูง

Ogawa *et al.* (1990) รายงานว่าการให้ความดันสูงระหว่าง 1,000 และ2,000 เอทีเอ็ม สามารถทำลายเอนไซม์เพคติเนสเทอร์เรส (pectinesterase) ได้เพียงเล็กน้อย การศึกษาผลของความดันสูงต่อเอนไซม์เพคติเนสเทอร์เรส (pectinesterase)ในน้ำส้ม (Satsuma mandarin juice) พบว่าจะสามารถทำลายกิจกรรมของเอนไซม์นี้ได้เมื่อให้ความดันสูงระหว่าง 3,000 – 4,000 เอทีเอ็ม และความดันสูง 3,000 เอทีเอ็ม หรือสูงกว่าสามารถทำลายกิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสเทอร์เรส (pectinesterase)บริสุทธิ์ได้เช่นเดียวกัน โดยทำลายกิจกรรมของเอนไซม์ได้อย่างถาวร (irreversible) และเอนไซม์นี้จะไม่คืนกิจกรรมระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสหรือในขณะลำเลียงขนส่ง นอกจากนั้นยังพบว่าของแข็งที่ละลายได้ชนิดต่างๆ ได้แก่น้ำตาล โปรตีนและไขมัน มีส่วนช่วยปกป้องการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์นี้จากการได้รับความดันสูงหรือความร้อน

มีรายงานว่าการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์เนื่องจากความดันสูงนั้นมีสาเหตุมาจากความดันสูงทำให้โครงสร้างภายในโมเลกุล (intramolecular structures) หรือทำให้บริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) เกิดการเปลี่ยนแปลง การใช้ความดันสูงระหว่าง 1,000 – 3,000 เอทีเอ็ม ในการยับยั้งพบว่าเอนไซม์บางชนิดอาจคืนกิจกรรม (reversible) ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระดับของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลเอนไซม์และการคืนกิจกรรมจะมีโอกาสเกิดน้อยลงถ้าใช้ความดันสูงเกินกว่า 3,000 เอทีเอ็ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลของความดันสูงต่อปฏิกิริยาชีวเคมี

Heremans (1995) รายงานว่าผลของการใช้ความดันสูงต่อระบบทางชีวภาพ ได้แก่การทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติ การทำให้ไขมันแข็งตัวและทำให้เมมเบรนแตกสลายซึ่งเป็นผลทำให้สามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ ในส่วนของโปรตีนนั้นโดยทั่วไปมีโครงสร้างอยู่ 4 ระดับได้แก่โครงสร้างระดับแรกซึ่งได้แก่เส้นสายของกรดอะมิโนที่ต่อกันเป็นสายโซ่ ซึ่งยังไม่มีรายงานว่าความดันสูงมีผลต่อพันธะโคเวเลนต์ (covalent bonds) โครงสร้างระดับที่สองได้แก่การที่สายโซ่ของโพลีเปปไตด์ (polypeptide chain) มาจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ทั้งภายในเส้นสายเดียวกันและระหว่างเส้นสาย โครงสร้างระดับที่สามได้แก่เส้นสายต่างๆ ในโครงสร้างที่สองมารวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน (globular shape) ด้วยพันธะนอนโคเวเลนต์ (noncovalent) ซึ่งคาดว่าความดันสูงมีผลในการทำลายพันธะนี้ ส่วนโครงสร้างระดับที่สี่ได้แก่การที่โปรตีนกลุ่มก้อนในโครงสร้างระดับที่สามด้วยพันธะนอนโคเวเลนต์ซึ่งไม่ทนต่อความดันสูงเช่นเดียวกันกับโครงสร้างในระดับที่สาม (Silva and Weber, 1993) ความดันสูงจะมีผลต่อปฏิกิริยาชีวเคมีโดยเฉพาะปฏิกิริยาที่สารตั้งต้นเกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อระบบมีปริมาตรเพิ่มขึ้นหรือลดลง Hoover *et al.* (1989) รายงานว่าความดันสูงจะทำให้ระยะห่างระหว่างโมเลกุลลดลงหรือทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ดีขึ้น ซึ่งปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องการสร้างพันธะไฮโดรเจนจะเกิดได้ดีขึ้นเมื่อความดันสูงขึ้น เนื่องจากพันธะดังกล่าวเกิดขึ้นเมื่อปริมาตรลดลงอย่างไรก็ตามมีบางรายงานกล่าวว่าความดันไม่มีผลต่อการเกิดพันธะไฮโดรเจนการใช้ความดันสูงทำให้โมเลกุลของโปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) ได้ การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเนื่องจากความดันสูง ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่โครงสร้างของโปรตีน ขนาดของความดันสูงที่ใช้ อุณหภูมิ ค่า pH และองค์ประกอบของตัวทำละลาย โปรตีนชนิด oligomeric ซึ่งมีเส้นสายกรดอะมิโนหลายเส้นจับตัวกันจะสูญเสียสภาพธรรมชาติเมื่อให้ความดันสูงในระดับต่ำ (ประมาณ 2,000 atm) ในขณะที่โปรตีนที่เป็นเส้นสายกรดอะมิโนต่อกันเพียงเส้นเดียว (single chain) สูญเสียสภาพธรรมชาติเมื่อให้ความดันสูงในระดับที่สูงกว่า 3,000 atm ปฏิกิริยาการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเนื่องจากความดันสูงนั้นบางครั้งอาจผันกลับได้ (reversible) แต่การกลับคืนสภาวะเดิม (renaturation) หลังจากหยุดให้ความดันสูงอาจกินเวลานาน

ผลของความดันสูงต่อความคงตัว (stability) ของโปรตีนนั้นเกิดขึ้นและเป็นไปตามกฎของ Le Chatelier ที่กล่าวว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาตรของระบบเมื่อความดันเพิ่มขึ้นทำให้เกิดการสร้างหรือทำลายพันธะเคมีเพื่อทำให้เกิดสภาวะสมดุล ความดันสูงมีผลต่อโครงสร้างของโปรตีนอย่างมากโดยเฉพาะพันธะ electrostatic และ hydrophobic โดยทำให้โปรตอน ของกลุ่มโมเลกุลที่มีประจุหลุดออก (deprotonation) และทำลายพันธะเกลือ (salt bridges) และพันธะ hydrophobic ภายในโครงสร้าง นอกจากนั้นการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของโมเลกุลโปรตีนยังเกิดขึ้นเนื่องจากการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยา hydration ที่มีน้ำเข้ามาเกี่ยวข้องซึ่งเกิดจากการที่มีปริมาตรลดลงและสายโซ่ของโปรตีนแยกและคลายตัวออกจากกันการสูญเสียสภาพของโปรตีนเนื่องมาจากความดันสูงนั้นมีความแตกต่างจากการสูญเสียสภาพ เนื่องมาจากการใช้ความร้อน โดยความดันสูงจะทำลายพันธะ hydrophobic และ ionic ของโมเลกุลโปรตีนและการคลายตัวของโมเลกุลโปรตีนจะทำให้ปริมาตรของโปรตีนลดลงประมาณ 2%

Johnston *et al.* (1992) ศึกษาผลของความดันสูงต่อโปรตีนในน้ำนม พบว่าความดันสูงทำให้โปรตีนในน้ำนมคลายตัวออกจากกันอย่างน้อย 8 วัน เมื่อเก็บรักษาน้ำนมที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ซึ่งทำให้มีผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ (functional properties) ของน้ำนม ในส่วนของการสูญเสียสภาพของโปรตีนเนื่องมาจากความร้อนนั้น Farr (1990) รายงานว่าเกิดขึ้นเนื่องจากการเกิดหรือการสลายตัวของพันธะโคเวเลนต์ (covalent bonds)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved