



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

“การเตรียมสารสกัดน้ำจากกากชา และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์”

โดย ศ. ดร. นันทวัน บุญยะประภัศร และคณะ

กันยายน 2550

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

“การเตรียมสารสกัดน้ำจากกากชา และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์”

คณะผู้วิจัย

ศ. ดร. นันทวัน บุญยะประภัศร
นางสาวประพิณศรา สอนเล็ก

สังกัด

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
สำนักงานประสานงานวิจัยและพัฒนา
“สมุนไพรเพื่อคุณภาพชีวิต”

ชุดโครงการ “สมุนไพรเพื่อคุณภาพชีวิต”

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

แบบสรุปโครงการวิจัย

โครงการ “การเตรียมสารสกัดน้ำจากกากชาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์” สัญญาเลขที่ RDG4920063

หัวหน้าโครงการ ศ. ดร. นันทวัน บุญยะประภัศร

หน่วยงาน สำนักงานผู้ประสานงานของโครงการวิจัยสมุนไพรเพื่อคุณภาพชีวิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนศรีอยุธยา เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

โทรศัพท์ 02-644-4566 โทรสาร 02-644-4566

e-mail pynby@mahidol.ac.th

3. ความเป็นมาและความสำคัญ

จากการประชุมร่วมกับนักวิจัยและสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับนำสารสกัดจากชาใช้ประโยชน์ พบว่าชามีประโยชน์ทั้งในด้านปศุสัตว์ ผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ ผลิตภัณฑ์ body care เครื่องสำอาง ยาภายนอก บรรจุภัณฑ์สำหรับอาหาร และกำจัดศัตรูพืช ทางสำนักงานผู้ประสานงานโครงการสมุนไพรเพื่อคุณภาพชีวิต จึงได้จัดทำกรอบงานการวิจัยชา โดยนำเอาวัสดุเหลือใช้จากการผลิตชามาใช้ประโยชน์ ได้แก่

1. กากชา ที่เหลือจากการผลิตเครื่องดื่มชาสำเร็จรูป
2. ชาเขียวใบแก่ที่มีคุณภาพต่ำไม่นิยมนำมาใช้เป็นชาชง

เนื่องจากการนำกากชาจากโรงงานมาผลิตสารสกัดในช่วงการศึกษาวิจัย มีความยุ่งยากในการขนากมาสกัดต่อ ทางสำนักงานจึงได้ประสานงานและจัดทำสารสกัดสำหรับทุกโครงการ และได้จัดทำผลิตภัณฑ์จากกากชาเพื่อใช้ทดสอบในสุกรและไก่

วัตถุประสงค์

1. เพื่อจัดเตรียมสารสกัดกากชาที่มีการควบคุมมาตรฐานเพื่อใช้ในการวิจัยโครงการชุดชา
2. เพื่อเตรียมวัสดุสำหรับรองคอกไก่
3. เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ feed additive
4. เพื่อประสานงานชุดโครงการย่อยให้ดำเนินไปได้
5. เพื่อสืบค้นข้อมูลเพื่อจัดทำชุดโครงการใหม่

ผลการวิจัย

ทางสำนักงานผู้ประสานงานได้ดำเนินการตามวัตถุประสงค์ ดังนี้

1. การเตรียมสารสกัดและตรวจสอบคุณภาพ

1.1 จัดเตรียมสารสกัดจากกากชา 1 lot โดยนำกากชา 121 ก.ก. ได้สารสกัดกากชา ด้วยน้ำ 12.4 ก.ก. และสารสกัดผสมแบ่ง 9.4 ก.ก. ซึ่งมี catechin และอนุพันธ์ $12.68 \pm 0.427\%$ และ $6.791 \pm 0.22\%$ ตามลำดับ สารสกัดกากชา 1 มก. มี antioxidant คิดเทียบเท่ากับ catechin hydrate 1.1071 ± 0.1245 มก. ส่วนสารสกัดกากชาผสมแบ่งมี Total antioxidant เทียบเท่ากับ catechin hydrate 0.6270 ± 0.0517 มก. ราคาต้นทุนสารสกัดกากชา 2,283.12 บาท/ก.ก. จากการขอให้ บริษัทคำนวณราคาขายจะได้ราคา 1,550 บาท/ก.ก.

1.2 เตรียมสารสกัดจากชาอัสสัม 10 ก.ก. ได้สารสกัด 1.5 ก.ก. สารสกัดมี catechin $7.91 \pm 0.24\%$ และมี antioxidant เทียบเป็น catechin hydrate 1.395 ± 0.093

1.3 การเตรียมสารสกัดชาไว้เพื่อดำเนินการในช่วงต่อไป จึงได้สกัดชาอัสสัมแทนกากชา เพราะค่าใช้จ่ายถูกกว่าในเรื่องค่าขนส่ง และการคำนวณน้ำหนักกากซึ่งรวมน้ำเข้าไปด้วย กากชา 100 ก.ก. ได้สารสกัด 7.6 ก.ก. ต้นทุนในการสกัดประมาณ 3,658 บาท

2. การเตรียมวัสดุรองคอกไก่ ไม่สามารถดำเนินการได้เนื่องจากขณะสกัดเป็นฤดูฝน โรงงาน ดากไม่ดีจึงเน่าเสีย ส่วนกากชาอัสสัมไม่เพียงพอดำเนินการ

3. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ feed additive จากการทดลองผสมแบ่งในขณะทำ spray drying เพื่อจะนำเอาสารสกัดที่ได้เพื่อไปผสมอาหารสัตว์เลย พบว่าใช้ไม่ได้ และเมื่อนำไปพัฒนา granule ก็ไม่ดีเท่าใช้สารสกัดโดยตรง จึงพัฒนาต่อโดยนำสารสกัดที่ไม่ได้ผสมแบ่งมาพัฒนาได้ผลิตภัณฑ์ granule ซึ่งคงตัวที่อุณหภูมิห้องดีพอสมควร แม้ catechin จะลดลง แต่ปริมาณ antioxidant ยังคงอยู่ จึงสามารถนำไปใช้ในการปศุสัตว์ได้

4. สารสกัดที่ได้นำไปสนับสนุนโครงการวิจัย 7 โครงการ ซึ่งทำให้งานวิจัยครอบคลุมการใช้ในสุกรและไก่ และโครงการพัฒนาน้ำยาบ้วนปาก และการนำไปใช้ร่วมกับน้ำมันตะไคร้เพื่อพัฒนาน้ำยาจุ่มเต้านม และนำไปใช้เรื่องการวิจัยผลิตภัณฑ์เพื่อช่วยความจำ

5. ได้พัฒนากรอบโครงการวิจัยใหม่ 2 เรื่องคือ เรื่องเปลือกส้ม และเรื่อง *Bacillus subtilis* เพื่อสนับสนุนการนำไปใช้ในการผลิตผักปลอดภัย และอาหารสุขภาพ

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สารสกัดที่ได้นำไปใช้ในโครงการชาทั้งหมด ทำให้สามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ และทดสอบผลของผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์ body care ตลอดจนอาจมีผู้ทางนำไปใช้พัฒนาผลิตภัณฑ์ กำจัดศัตรูพืช

2. ได้ผลิตภัณฑ์ feed additive ซึ่งจากผลเบื้องต้นทำให้สุกรโตเร็ว

3. ได้กรอบงานวิจัยใหม่เพิ่มเติม

หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. หน่วยงานวิจัยจากมหาวิทยาลัยต่างๆ เพื่อศึกษาต่อยอด
2. เอกชนด้านปศุสัตว์ถ้าผลการทดลองเป็นไปตามที่คาดหวัง จะสามารถใช้เลี้ยงสัตว์ โดยไม่ต้องใช้ยาปฏิชีวนะ

การประชาสัมพันธ์

ขอให้ชะลอเพื่อรอผลการทดสอบ

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	III
สารบัญรูป	V
บทคัดย่อภาษาไทย	1
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	2
บทนำ	3
Part I การเตรียมสกัดน้ำจากชา	
I. การเตรียมสกัดน้ำจากชา	7
I.1 การเตรียมสารสกัดจากชา	7
I.2 การเตรียมสารสกัดน้ำจากชาอัสสัม	8
II. การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ Total catechin ในสารสกัดจากกากชา	8
II.1 Peak identification	10
II.2 การวัดความแม่นยำ (precision)	10
II.3 Linearity	11
II.4 Limit of detection	11
III. การวิเคราะห์คุณภาพสารสกัด	11
III.1 การวิเคราะห์คุณภาพสารสกัดจากกากชา	11
III.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณ total catechin จากสารสกัดน้ำจากกากชา	11
III.1.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging activity) ของสารสกัดน้ำจากกากชา	16
III.1.3 การหาปริมาณสาร antioxidant ของสารสกัดจากกากชา	19
III.2 การวิเคราะห์คุณภาพของสารสกัดชาอัสสัม	21
IV. การจัดเตรียมสารสกัดให้แก่โครงการต่างๆ	22
Part II การพัฒนาสารเสริมอาหารสัตว์จากกากชา	24
I. การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของสารสกัดจากกากชา	24
I.1 ศึกษาการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (Particle size distribution) ตามวิธีของ USP XXVI	24
I.2 การศึกษา Tapped Density ตามวิธีของ USP XXVI	25
I.3 การศึกษา loss on drying และ moisture content	26
I.4 การศึกษา total ash และ acid insoluble ash	26
I.5 การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัด	28

สารบัญ (ต่อ)

Part II	การพัฒนาสารเสริมอาหารสัตว์จากกากชา (ต่อ)	หน้า
	I.6 การทดสอบคุณสมบัติในการไหล (Flowability by repose of angle)	28
	II. ทดลองตั้งตำรับที่เหมาะสม	29
	II.1 เตรียมตำรับแกรนูลของ สารสกัดจากกากชาโดยหาปริมาณสูงสุดที่สารสกัดถูกดูดซึม	29
	II.2 เตรียมตำรับแกรนูลของ สารสกัดจากกากชาโดยทดลองสื่อนิตต่างๆ	33
	II.3 ศึกษาขนาดของ sieve ที่ใช้ในการเตรียม wet granule และ dry granule และผลต่อการเกิด fine particle	35
	II.4 ศึกษาปริมาณการใช้ที่เหมาะสมของ 1%w/v PVP K-90	37
	III. การศึกษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์จากกากชา	39
	III.1 การวิเคราะห์หาค่า antioxidant ของผลิตภัณฑ์	39
	III.2. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญออกจากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณ total catechin ของผลิตภัณฑ์	39
	IV. การศึกษาความคงตัวของตำรับ	40
	IV.1 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของตำรับ	40
	IV.2 การศึกษาความคงตัวของสารสำคัญในตำรับผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์จากกากชา	45
	IV.2.1 ความคงตัวของ catechin ในผลิตภัณฑ์	45
	IV.2.2 ความคงตัวของ สาร antioxidant ในผลิตภัณฑ์	47
Part III	การทำกรอบวิจัยใหม่	51
	I. การทำกรอบวิจัยเรื่องเปลือกผิวส้ม	51
	การสกัดน้ำมันหอมระเหย และ flavonoids จากกากส้ม	52
	II. สรุปข้อมูลการวิจัยเรื่อง Antimicrobial compounds จาก <i>Bacillus subtilis</i> ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืช	56

สารบัญตาราง

Part I	หน้า
I-1 Gradient program ของระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์ catechin และอนุพันธ์	9
I-2 Gradient program ของระบบที่พัฒนาเพื่อใช้ในการวิเคราะห์สารสกัดจากกากชา	9
I-3 ค่า Precision ของ peak area ในการวิเคราะห์ (+) catechin hydrate ที่ความเข้มข้น 80 µl/ml จำนวน 5 ครั้ง	10
I-4 ปริมาณของ total catechin ในตัวอย่างสารสกัดน้ำจากกากชา	14
I-5 ปริมาณของ total catechin ในตัวอย่างสารสกัดน้ำของกากชาที่ผสม Modified starch	15
I-6 DPPH scavenging activity ของสารสกัดน้ำจากกากชา	18
I-7 ปริมาณสาร antioxidant ของสารสกัดกากชา (CHA) และสารสกัดชาที่เติมแป้ง (STR) คำนวณเปรียบเทียบกับ Trolox และ (+)-catechin hydrate โดยน้ำหนัก	20
I-8 ปริมาณสาร antioxidant ของสารสกัดน้ำจากชาอัสสัม	21
I-9 ปริมาณ total catechin ของสารสกัดน้ำจากชาอัสสัมจากการวิเคราะห์โดย HPLC	21
I-10 การจัดเตรียมสารสกัดน้ำจากกากชาให้แก่โครงการต่างๆ	22
I-11 การจัดเตรียมสารสกัดน้ำจากชาอัสสัมให้แก่โครงการต่างๆ	23
Part II	
II-1 การกระจายขนาดอนุภาคของสารสกัดน้ำจากกากชาชนิดเติมแป้งและไม่เติมแป้ง	24
II-2 ผลการศึกษา Tapped Density ของสารสกัดน้ำจากกากชาชนิดเติมแป้งและไม่เติมแป้ง	25
II-3 ผลการศึกษา loss on drying และ moisture content ของสารสกัดน้ำจากกากชาชนิดเติมแป้งและไม่เติมแป้ง	27
II-4 ผลการศึกษา ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสารสกัดน้ำจากกากชาชนิดเติมแป้งและไม่เติมแป้ง	28
II-5 ส่วนผสมของสูตรที่ 1-8	29
II-6 ส่วนผสมของสูตรที่ 9-13	33
II-7 น้ำหนักและเปอร์เซ็นต์ของขนาดอนุภาคหลังจากการเตรียมเป็นแกรนูลโดยการผ่านร่อนขนาดต่างๆ	36
II-8 แสดงปริมาตรที่เหมาะสมของ 1%w/v PVP K-90 เมื่อใช้เป็นสารช่วยยัดเกาะในตำรับ	37
II-9 ค่า antioxidant (IC ₅₀) และปริมาณ antioxidant ของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์จากกากชา	39

สารบัญตาราง (ต่อ)

Part II	หน้า
II-10 ปริมาณ total catechin ที่สกัดออกจากผลิตภัณฑ์โดยการสกัดด้วยอัลตราโซนิค ที่เวลาต่างๆ	40
II-11 การกระจายขนาดอนุภาคของแกรนูลที่เตรียมได้	41
II-12 ค่าในการทดสอบคุณสมบัติในการไหลของแกรนูลของสารสกัดจากกากชาชนิด ไม่เติมแป้ง (30%)	41
II-13 ปริมาณ % LOD และ % moisture content ของแกรนูลของสารสกัดจากกากชา ชนิดไม่เติมแป้ง (30%)	42
II-14 ปริมาณ % LOD, % moisture content, Flowability และ Color ของแกร- นูลของสารสกัดจากกากชาชนิดไม่เติมแป้ง (30%) เมื่อเวลาผ่านไป 4 เดือน	43
II-15 ปริมาณ total catechin ของผลิตภัณฑ์ที่เวลาต่างๆ	46
II-16 ปริมาณสาร antioxidant ของตำรับผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์	48
Part III	
III-1 ปริมาณสารสกัดเบืองต้น และน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากกาก และน้ำทิ้ง	54
III-2 Biocontrol โดยใช้ lipopeptide จาก <i>Bacillus subtilis</i>	59

สารบัญรูป

Part I	หน้า
I-1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากกากชาจากกากชาเขียว	7
I-2 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการเตรียมสารสกัดน้ำจากชาอัสสัม	8
I-3 HPLC chromatogram ของสารสกัดน้ำจากกากชาโดยใช้ C ₁₈ column และ gradient elution (โดยใช้ 10 % acetonitrile ใน 0.1 % Phosphoric acid)	9
I-4 Chromatogram ของสารสกัดน้ำจากกากชา spike ด้วยสารมาตรฐาน catechin (C), epicatechin (EC), epigallocatechin gallate (EGCG) และ epigallocatechin (EGC)	10
I-5 Chromatogram overlay ของ (+)-catechin hydrate ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน (60, 80, 100, 120 และ 140 มก./มล.)	12
I-6 Calibration curve ของ (+)-catechin hydrate ซึ่ง plot ระหว่างความเข้มข้น และ peak area	12
I-7 Chromatogram ของสารสกัดจากกากชา วิเคราะห์โดย column C ₁₈ (250x 4.6 mm) ขนาด particle 5 μ และใช้ gradient mobile phase คือ acetonitrile และ 0.1 % phosphoric acid	13
I-8 Chromatogram ของสารสกัดจากกากชาที่ผสม modified starch วิเคราะห์โดย column C ₁₈ (250x4.6 mm) ขนาด particle 5 μ และใช้ mobile phase คือ acetonitrile และ 0.1 % phosphoric acid	14
I-9 Calibration curve ของ (+)-catechin hydrate โดย plot ระหว่างความเข้มข้น และ peak area	15
I-10 Inhibition curve ของสารสกัดจากกากชา, สารสกัดจากกากชาที่เติมแป้ง, Trolox และ (+)-catechin hydrate	17
I-11 Dose response curve ของสารมาตรฐาน Trolox (●) และ (+)-catechin hydrate (○) สมการ linear regression ได้จากการ plot ระหว่าง ปริมาณสาร และ OD ₅₆₀	19
Part II	
II-1 granule จากสารสกัดน้ำจากกากชาสูตรที่ 1, 2, 3, 5, 6, 7	32
II-2 granule จากสารสกัดน้ำจากกากชาสูตรที่ 9, 10, 11, 12, 13	34
II-3 กราฟแสดงค่า %LOD ของแกรนูลสารสกัดจากกากชาชนิดไม่เติมแป้ง เมื่อเก็บนาน 4 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง และ 45°C	44

สารบัญรูป (ต่อ)

II-4	กราฟแสดงค่า Moisture content ของแกรนูลสารสกัดจากกากชาชนิดไม่เติม แป้งเมื่อเก็บนาน 4 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง และ 45°C	45
II-5	กราฟแสดงความคงตัวของ total catechin ในตำรับผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์ จากกากชา ที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 เดือน	47
II-6	ปริมาณ antioxidant ของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์ที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 เดือน เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและสภาวะเร่งเมื่อเทียบเป็น Trolox	49
II-7	ปริมาณ antioxidant ของตำรับผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์ที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 เดือน เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและสภาวะเร่ง เมื่อเปรียบเทียบกับ (+)- catechin hydrate	49
Part III		
III-1	แผนภูมิแสดงการแยกน้ำมันหอมระเหยและ limunoids จากกากส้ม	53
III-2	TLC pattern ของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของกากส้ม	54
III-3	Amino acid sequence ของ lipopeptide	58

บทคัดย่อ

เตรียมสารสกัดน้ำจากวัสดุเหลือใช้ในการผลิตชาและผลิตภัณฑ์ชา คือกากชาจากการเตรียมเครื่องดื่มชา และชาอัสสัมคุณภาพต่ำ โดยวิธีต้ม สารสกัดที่ได้นำมาหาปริมาณ Total catechin และอนุมูลอิสระ โดยคิดเทียบเป็นค่า Trolox และ (+)-catechin hydrate สารสกัดที่ได้ใช้ในการศึกษาพัฒนาผลิตภัณฑ์หลายอย่างรวมทั้งสารเสริมอาหารสัตว์ สารใช้ใน body care เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ และยาฆ่าแมลง ต้นทุนราคาสารสกัดกากชา และชาเขียว ราคา 2,283 และ 3,658 บาท/ก.ก. ตามลำดับ

การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัด ได้มีการทดลองทำผลิตภัณฑ์จากสารสกัด และสารสกัดผสมแป้ง (เพื่อป้องกันการขึ้น) พบว่าสูตรที่ดีที่สุดคือ สูตรที่เตรียมจากสารสกัดโดยตรง ซึ่งเมื่อทดลองความคงตัวพบว่าเมื่อตั้งทิ้งไว้ 4 เดือน ที่อุณหภูมิห้องที่ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณ Total catechin ลดลงเหลือ 90% และ 70% ตามลำดับ ส่วนปริมาณ Total oxidant คิดเป็น (+)-catechin hydrate เพิ่มขึ้น 188 และ 202% ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์นี้ยังคงใช้ได้กับ feed additive ซึ่งอาศัยปริมาณอนุมูลอิสระ แต่ในกรณีใช้ประโยชน์อื่นยังต้องพัฒนาผลิตภัณฑ์เพิ่มเติม

นอกจากการเตรียมสารสกัดจากชา และพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์ ได้มีการสืบค้นข้อมูล และทดลองนำกากส้มจากโรงงานมาดูลักษณะคุณภาพ ซึ่งพบว่ายังสามารถใช้ในการผลิตน้ำมันเปลือกผิวส้มได้ จึงเสนอแนะโรงงาน และได้ค้นข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับ *Bacillus subtilis* เพื่อพัฒนาใช้ในการกำจัดศัตรูพืช

Abstract

The water extracts were prepared from two waste products of tea production, marc of tea drink and Assam green tea (low quality grade), by boiling with water. The quality control of the extract was based on the total catechins and antioxidants (calculated as (+)-catechin hydrate and trolox). The extracts were used for several product development including feed additive, body care, cosmetic, health food and pesticides. The cost of marc and green tea extract are about 2,283 and 3,658 baht/kg.

Feed additive was developed as granule preparation and the best formula was set up for stability studies. At room temperature and 45°C, total catechin decreased to 90%, 70% while the antioxidant (calculated as (+)-catechin hydrate) increased to 188%, 202%, respectively. To use as feed additive the activity is based on antioxidant activity therefore the product was stable enough for this purpose.

Besides tea products the researcher tried to search and carry out preliminary studies on orange rinds and *Bacillus subtilis* in order to develop new projects.

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง

จากการประชุมร่วมกับนักวิจัยจากมหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยศิลปากร และมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และจากการสืบค้นข้อมูลพบว่า ชามีศักยภาพในเรื่องต่อไปนี้ คือ

1. ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์
 - feed additive
 - วัสดุรองพื้น
 - ฆ่าเชื้อ & ดับกลิ่นในคอกสัตว์
2. ผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ เพื่อลดคอเลสเตอรอล และต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ในรูปแบบ
 - เตียวย
 - ผสมกับโปรตีนจากถั่วเหลือง
3. ผลิตภัณฑ์บัวปาก
 - น้ำยาบัวปากแบบผงฟู
 - แผ่น film อมฆ่าเชื้อในปาก
 - ยาสีฟัน
4. เครื่องสำอาง และ Spa
 - ผลิตภัณฑ์ผงฟูเพื่อล้างเท้า (ก่อนนวด)
 - ผลิตภัณฑ์ gel ฆ่าเชื้อสำหรับล้างมือ (spa)
 - ผลิตภัณฑ์สำหรับกระตุ้นการงอกของผม
 - deodorant
5. ยาภายนอก
 - ด้านการอักเสบ ฆ่าเชื้อ
 - ยารักษาเต้านมอักเสบ
6. บรรจุภัณฑ์สำหรับอาหาร
 - ฆ่าเชื้อ
 - ดับกลิ่น
7. Pesticide
 - เชื้อรา
 - แมลง
 - ใช้ร่วมกับยาฆ่าแมลง

และผลการศึกษาเบื้องต้นที่ได้ดำเนินการในสำนักงานผู้ประสานงาน “การใช้สมุนไพรในการผลิตสัตว์” พบว่ากากชาที่เหลือจากการผลิตเครื่องดื่มชาเขียวยังมีศักยภาพอยู่ โดยยังมีฤทธิ์ antioxidant และเมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่ามีสารจำพวก EGC, C, EC, EGCG, ECG เหลืออยู่มาก เมื่อต้ม 1 ชม.

จากการสืบค้นข้อมูลการวิจัยเกี่ยวกับการผลิตสัตว์ พบว่ามีการทดลองใช้ในสัตว์ปีก และสุกร ดังนี้

ผลต่อสัตว์ปีก

ไก่ที่กินอาหารผสมด้วยผงชาเขียว 1, 2.5 และ 5% เมื่ออายุ 3-10 สัปดาห์ พบว่าเมื่ออายุ 10 สัปดาห์ น้ำหนักร่างกายจะลดลงตามปริมาณของชาเขียวในอาหารที่เพิ่มขึ้น ความแตกต่างของ feed conversion ระหว่างกลุ่มควบคุม (ไม่ได้กินอาหารผสมชาเขียว) และกลุ่มที่กินอาหารผสมชาเขียว 5% เท่ากับ 0.61 เปอร์เซนต์ของเนื้ออกและต้นขาที่ชำแหละแล้ว (dressing percentage) ของไก่ที่กินอาหารผสมชาเขียว 5% จะมีค่าต่ำสุด น้ำหนักไขมันที่ท้องลดลงตามปริมาณชาเขียวในอาหารที่เพิ่มขึ้น สีของเนื้ออกและต้นขาจะเข้มขึ้นตามปริมาณชาที่ผสมในอาหาร (Kaneko *et al.*, 2001) Ueda และคณะ ศึกษาพบว่าไก่ที่กินอาหารผสมด้วยชาโปนินจากชา หรือ quinine sulfate ขนาด 0.5 และ 1% นาน 12 ชม. จะมีผลลดการกินอาหารใน 4 ชม. เช่นกัน เมื่อลองให้ไก่เลือกกินอาหารระหว่างอาหารปกติ อาหารที่ผสมด้วยชาโปนินจากชา หรือ quinine sulfate ขนาด 0.5 และ 1% นาน 12 ชม. พบว่าภายใน 4 ชม. ไก่จะไม่กินอาหารที่ผสมด้วย quinine sulfate ไก่ชอบที่จะกินอาหารปกติและอาหารที่ผสมชาโปนินจากชามากกว่า และยังไม่พบความแตกต่างของการกินอาหารในไก่ที่กินอาหารปกติ และไก่ที่กินอาหารผสม ชาโปนิน 0.5% เมื่อให้ไก่กินอาหารปกติ และอาหารผสมชาโปนิน 0.5% วันละ 6 ชม. ในวันที่ 12 ของการทดลอง พบว่าการกินอาหารของไก่กินอาหารปกติระหว่าง 0-2 ชม. เป็นปกติ และ 2-6 ชม. ต่อมาจะเพิ่มขึ้น แต่ในไก่ที่กินอาหารผสมชาโปนิน ระหว่าง 0-2 และ 2-6 ชม. การกินอาหารอาหารลดลง เนื่องจากการกินอาหารผสมชาโปนินจะไปทำให้กระเพาะอาหารว่างช้าลง (delayed the crop emptying) ซึ่งแสดงว่ามีผลลดการกินอาหารที่ผสมด้วยชา คาดว่าเนื่องมาจากกระเพาะอาหารยังมีอาหารเหลืออยู่มากกว่าจากระสมของชาโปนินจากชา (Ueda *et al.*, 2002)

เมื่อแบ่งไก่เป็นกลุ่มๆ เป็นกลุ่มกินอาหารปกติ (กลุ่มควบคุม) กลุ่มไก่กินอาหารปกติผสมยาปฏิชีวนะ 0.05% chlortetracycline กลุ่มไก่ที่กินอาหารปกติผสม 0.5%, 1% และ 2% ของกากชา (tea byproduct) ทุกกลุ่มนาน 6 สัปดาห์ พบว่าไก่กลุ่มที่กินอาหารผสมยาปฏิชีวนะจะมีน้ำหนักร่างกายสูงกว่าทุกกลุ่ม ไม่พบความแตกต่างของการกินอาหารและ feed efficiency ระหว่างกลุ่มศึกษา การเพิ่มกากชามีแนวโน้มลด LDL-cholesterol ในเลือดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างกันในกลุ่มศึกษา อาหารที่ผสมกากชาจะเพิ่ม docosahexaenoic acid (DHA) ในเลือด และลดปริมาณคลอเลสเทอรอลในเนื้อไก่ ระดับของ lipid peroxidation ใน

เนื้อไก่จะลดลงในกลุ่มไก่ที่กินอาหารผสมกากชา และยาปฏิชีวนะ แต่โปรตีนในเนื้อไก่ทั้งสองกลุ่มจะลดลงเล็กน้อย ปริมาณไขมันที่ท้องจะเพิ่มขึ้นในไก่ที่กินอาหารผสมกากชา เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Yang *et al.*, 2003)

ไก่ที่กินอาหารที่ผสมด้วยสาร polyphenol จากชา มีผลช่วยลดการเกิดการเจริญเติบโต และการเกิดอนุมูลอิสระในไก่ที่กินอาหารผสม corticosterone 10 และ 20 มก./กก. โดยจะช่วยลดปริมาณไขมันที่ท้อง ระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด และน้ำหนักตับที่เพิ่มขึ้น ลดการเกิดอนุมูลอิสระในกล้ามเนื้อและตับ และลดปริมาณ corticosterone ในเลือด (Eid *et al.*, 2003)

ของเหลวที่ประกอบด้วยใบชา 5-15%, เมล็ด *Crataegus pinnatifida* 55-65%, ถั่ว *Canarium album* 15-25%, *Nux Armeniacae Amarum* 2-10% และสารสกัดจาก *Helicteres angustifolia* เมื่อให้สัตว์ปีกหรือปศุสัตว์กินจะช่วยป้องกัน และรักษาโรคที่เกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรีย โดยไม่พบผลข้างเคียงใดๆ (Zheng, 2005)

ผลต่อสุกร

การศึกษาผลของพลังงานในอาหารต่อการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของหมู ร่วมกับผสม/ไม่ผสมสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ คือ α -tocopheryl acetate (TA) (200 มก. α -TA/กก.) หรือ catechins จากชาเขียว (GTC) (สารสกัดจากชาเขียว 200 มก./กก.) ต่อลักษณะของหมูและคุณภาพของกล้ามเนื้อ longissimus dorsi (LD) ในหมูพันธุ์ Landrace หรือ Duroc พบว่าสายพันธุ์หมูไม่มีผลต่อลักษณะหมู (pig performance) แต่จะมีผลต่อคุณภาพของเนื้อหมู กล้ามเนื้อหมู Duroc จะมีไขมันในกล้ามเนื้อ ถั่ว และระดับกรดไขมัน monounsaturated fatty acid สูงกว่า และมีความชื้นต่ำกว่าหมู Landrace ระดับของ lipid oxidation และ pigment oxidation ในเนื้อหมู Landrace จะสูงขึ้นในช่วงแรกของการศึกษา หมูที่กินอาหารที่ให้พลังงานต่ำจะมีอัตราการเติบโตลดลง เพราะความหนาของไขมันที่หลังต่ำกว่า การลดระยะเวลาการกินอาหารที่ให้พลังงานต่ำ หรือการเพิ่มพลังงานของอาหารให้หมูกินก่อนที่จะฆ่า ทำให้การเติบโตของหมูเหมาะสม อาหารที่เสริมด้วย α -TA หรือ GTC จะเพิ่มระดับ α -tocopherol ในกล้ามเนื้อ LD ระดับ lipid oxidation จะต่ำตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาเนื้อไว้ในตู้เย็น กิน α -TA และ GTC ไม่มีผลต่อสีของเนื้อหมู หรือองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อหมู ดังนั้นกล่าวได้ว่าอาหารที่เสริมด้วย α -TA หรือ GTC จะไปช่วยลดการเกิด lipid oxidation ในเนื้อหมูได้ (Mason *et al.*, 2005)

สาร Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) จากชาเขียวมีผลต่อระบบสืบพันธุ์ของหมู EGCG ความเข้มข้น 5 และ 50 มก./มล. จะไปยับยั้งการแบ่งตัวของ granulosa cell ที่ได้จาก follicles ของหมู ยับยั้งการสร้างสเตียรอยด์ และ VEGF ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในการสร้างเส้นเลือดและการผลิต superoxide anion โดยเซลล์ granulosa cells แต่จะไปกระตุ้นระดับ hydrogen peroxide และ superoxide dismutase (Basini *et al.*, 2005)

สาร Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) จากชาเขียว ความเข้มข้น 5 และ 50 มกค./มล. จะลดการสร้าง vascular endothelial growth factor (VEGF) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเจริญเติบโตของหลอดเลือดในรังไข่ และ EGCG ความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการแบ่งตัวของ granulosa cell ของหมู ดังนั้นควรระมัดระวังการใช้ EGCG ผสมในอาหารสัตว์ (Giuseppina *et al.*, 2005)

อาหารสุกรที่ประกอบด้วยอาหารเหลวที่ได้จากการหมักผสมของเศษขนมปัง นม น้ำผลไม้ และ lactic acid แบคทีเรีย และผสมด้วย paste จากใบชา ให้สุกร (crossbred piglets) อายุ 3 เดือน กินนาน 2 สัปดาห์ อูจจาระสุกรที่ได้จะมี lactic acid แบคทีเรีย และ Enterobacteria สูง และกลิ่นอูจจาระลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับสุกรที่กินแต่อาหารเหลวอย่างเดียว (Kuroshima *et al.*, 2006)

จากข้อมูลการวิจัยเบื้องต้น และข้อมูลที่ได้จากการสืบค้น สำนักงานจึงได้จัดทำกรอบชุดโครงการฯ ตามแผนภูมิ

ทางสำนักงานผู้ประสานงานฯ ได้พยายามประสานให้มีผู้วิจัยชุดหนึ่งทำหน้าที่ประสานงาน และทำ feed additive ไปด้วย แต่ไม่สำเร็จ เพื่อให้ทันกับแผนงานฯ ทางสำนักงานผู้ประสานงานฯ จึงขอดำเนินการในบางส่วนเองคือ

1. ในส่วนของการเตรียมสารสกัดจากชา ทางสำนักงานฯ จะดำเนินการติดต่อขอกากชาจากโรงงานเครื่องต้มชาเขียว ส่งไปสกัดด้วยน้ำ และทำ spray dried
2. นำสารสกัดแห้งที่ได้ไปวิเคราะห์คุณภาพโดยวิเคราะห์
 - Antioxidant
 - ปริมาณ Catechin & อนุพันธ์
3. นำกากชาที่ได้ไปตากแห้ง และบด เพื่อนำไปทดลองทำวัสดุรองคอกไก่ เพื่อลดเชื้อและกลิ่น
4. นำผลิตภัณฑ์จากกากชาที่ได้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ผสมอาหารสัตว์ โดยควบคุมคุณภาพ และศึกษาความคงตัว
5. เตรียมสารสกัด water extract ให้ชุดโครงการต่างๆ ของชา

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อจัดเตรียมสารสกัดจากกากชาที่มีการควบคุมมาตรฐานเพื่อใช้ในการวิจัยชุดโครงการฯ
2. เพื่อเตรียมวัสดุสำหรับรองคอกไก่
3. เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ feed additive
4. เพื่อประสานงานชุดโครงการย่อยของโครงการฯ ให้ดำเนินไปได้
5. สืบค้นข้อมูลเพื่อจัดทำชุดโครงการใหม่

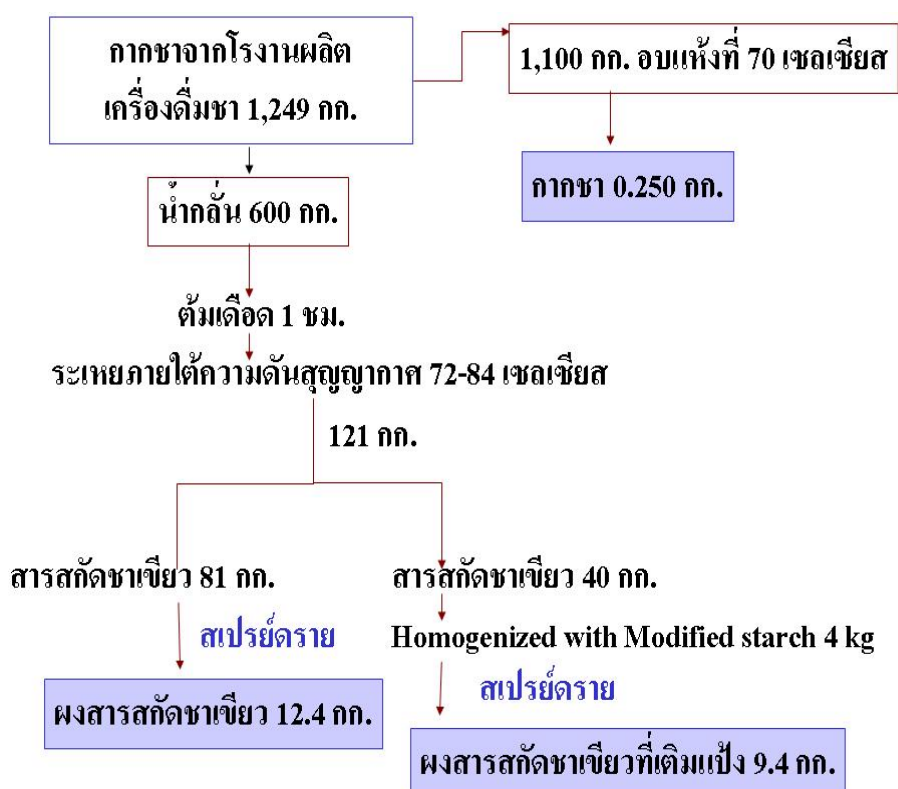
Part I

การเตรียมสารสกัดชา

I. การเตรียมสกัดน้ำจากชา

I.1 การเตรียมสารสกัดกากชา

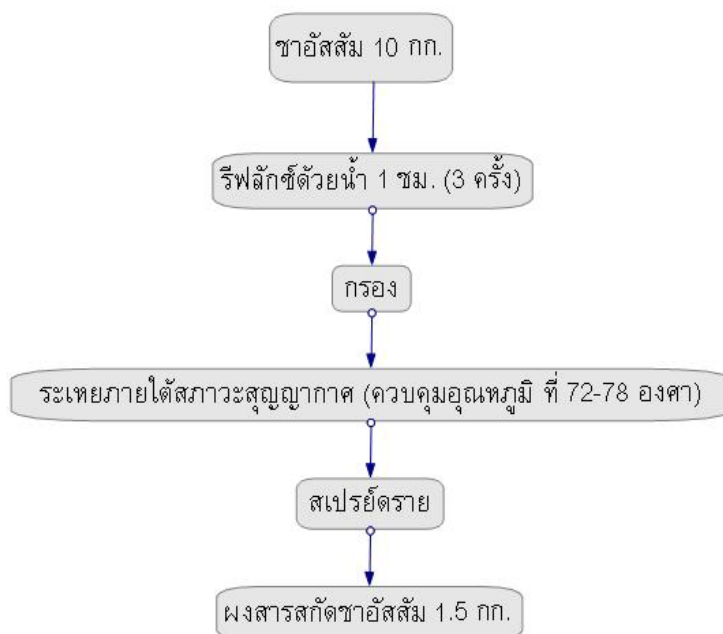
นำกากชาจากโรงงานผลิตเครื่องดื่มชา ไปสกัดด้วยการต้มในน้ำเดือด (600 กิโลกรัม) เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งภายใต้ความดันสุญญากาศจนได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น จำนวน 121 กิโลกรัม จากนั้นแบ่งมา 40 กิโลกรัม มาผสมกับ modified starch จำนวน 4 กิโลกรัม และทำให้แห้งโดยวิธี spray dry จนได้สารสกัดที่ผสม modified starch จำนวน 9.4 กิโลกรัม ส่วนสารสกัดเข้มข้นที่เหลืออีก 81 กิโลกรัม นั้นนำไปทำให้แห้งโดยวิธี spray dry เช่นเดียวกัน และได้สารสกัดแห้งจำนวนทั้งสิ้น 12.4 กิโลกรัม ซึ่งวิธีการเตรียมสารสกัดสรุปได้ดังแผนภูมิในรูปที่ I-1



รูปที่ I-1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากกากชาจากกากชาเขียว

I.2 การเตรียมสารสกัดน้ำจากชาอัสสัม

ในการศึกษาจะนำผงชาอัสสัมแห้งมาทำการสกัดด้วยน้ำเช่นเดียวกับการเตรียมสารสกัดจากกากชา โดยมีขั้นตอนการเตรียมสารสกัดชาอัสสัมดังรูปที่ I-2 โดยสกัดเป็น 2 lot lot แรก 10 ก.ก. และ lot ที่ 2 100 ก.ก.



รูปที่ I-2 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการเตรียมสารสกัดน้ำจากชาอัสสัม

ผลการทดลอง

จากการทดลองใช้ผงใบชาแห้ง 10 กิโลกรัม พบว่าได้สารสกัดทั้งสิ้น 1.5 กิโลกรัม คิดเป็นร้อยละ 15 ของน้ำหนักแห้ง และ 100 กิโลกรัม ได้สารสกัด 7.6 กิโลกรัม คิดเป็นร้อยละ 7.6%

II. การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ Total catechin ในสารสกัดจากกากชา

ได้มีการทดลองพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ total catechin ในสารสกัดกากชาโดยพัฒนาจากวิธี Standard Operating Protocol ของ Botanical Center for Age-related Disease (<http://www.cfs.purdue.edu/fn/bot/Downloads/PDF/greentea-6-06.pdf>) ซึ่งใช้ HPLC โดยใช้ column C₁₈ (250x4.6 mm) ขนาด particle 5 μ และใช้ Mobile phase คือ acetonitrile และ 0.1% phosphoric acid โดยใช้ gradient program ดังตารางที่ I-1 แต่เนื่องจากแยกไม่ดีจึงได้ปรับ gradient program ต่อ

ตารางที่ I-1 Gradient program ใช้ในการวิเคราะห์ Catechin และอนุพันธ์จากชา

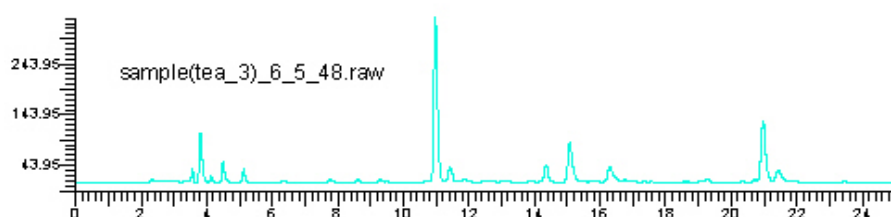
Time	Flow rate (ml/min)	% Acetonitrile	% Phosphoric acid
0	1.0	10	90
20	1.0	25	75
8	1.0	10	90

ผลการทดลอง

ผลการพัฒนาได้ gradient program ที่เหมาะสม คือ รายละเอียดในตารางที่ I-2 และได้ chromatogram ดังรูปที่ I-3

ตารางที่ I-2 Gradient program ของระบบที่พัฒนาเพื่อใช้ในการวิเคราะห์สารสกัดจากกากชา

Time	Flow rate (ml/min)	% Acetonitrile	% Phosphoric acid
2	1.0	10	90
10	1.0	10	90
20	1.0	20	80
10	1.0	10	90
2	1.0	10	2



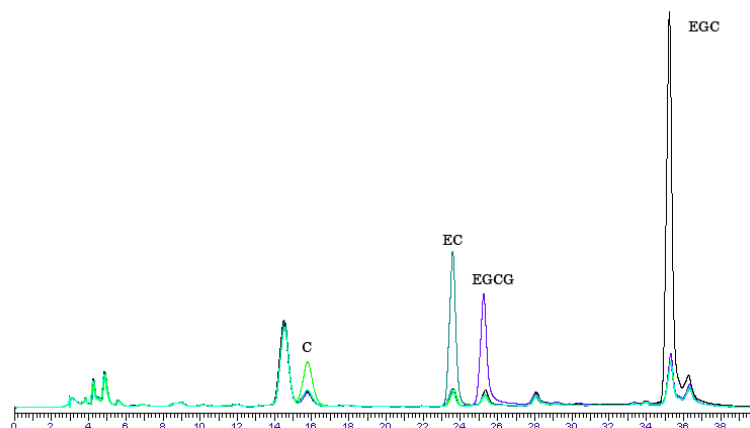
รูปที่ I-3 HPLC chromatogram ของสารสกัดน้ำจากกากชาโดยใช้ C₁₈ column และ gradient elution (โดยใช้ 10 % acetonitrile ใน 0.1 % Phosphoric acid)

II.1 Peak identification

การ identify ทำได้โดยเปรียบเทียบ retention time กับ reference standard และการทดลอง spike reference โดยการเติมสารมาตรฐานลงไปในตัวอย่่างสารสกัดชา (spike) และ

ตรวจดู peak ที่สูงขึ้นใน chromatogram นั้น เปรียบเทียบกับ chromatogram ของสารสกัดที่ไม่ได้เติม standard

สารมาตรฐานที่เติมได้แก่ catechin (C), epicatechin (EC), epigallocatechin gallate (EGCG) และ epicatechin gallate (ECG) ได้ chromatogram ของสารสกัดชาพร้อมกับสารมาตรฐานมาซ้อนทับกัน ดังรูปที่ I-4 แสดงให้เห็น peak ที่สูงขึ้น



รูปที่ I-4 chromatogram ของสารสกัดน้ำจากกาชา spike ด้วยสารมาตรฐาน catechin (C), epicatechin (EC), epigallocatechin gallate (EGCG) และ epicatechin (ECG)

II.2 การวัดความแม่นยำ (precision)

ทดลองฉีดสาร standard (+)-catechin hydrate ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (80 µg/ml) 5 ซ้ำ นำมาคำนวณเป็นค่า precision

ตารางที่ I-3 ค่า Precision ของ peak area ในการวิเคราะห์ (+)-catechin hydrate ที่ความเข้มข้น 80 µg/ml จำนวน 5 ครั้ง

Run	Area
1	507420.38
2	506051.98
3	505069.00
4	506660.11
5	505258.04
Average	506091.90
SD	978.6422
% CV	0.001934

I I . 3 L i n e a r i t y

นำ peak area ของ standard ที่ความเข้มข้น 60, 80, 100, 120 และ 140 µg/ml มา plot calibration curve พบว่า linearity ของการวิเคราะห์ทั้งสองครั้งได้ ค่า $R^2 = 0.9992$

II.4 Limit of detection

ความเข้มข้นต่ำสุดที่เราสามารถวัดได้โดยในการทดลองนี้ ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์คือ 5 µg/ml

III. การวิเคราะห์คุณภาพสารสกัด

III.1 การวิเคราะห์คุณภาพสารสกัดจากกากชา

III.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณ total catechin จากสารสกัดน้ำกากชา

วิเคราะห์ปริมาณ Total catechin จากสารสกัดน้ำจากกากชา โดยเทคนิค HPLC โดยใช้ column C₁₈ (250x4.6 mm) ขนาด particle 5 µ และใช้ mobile phase คือ acetonitrile และ 0.1 % phosphoric acid ตามวิธีที่พัฒนาไว้

การเตรียมสารตัวอย่าง

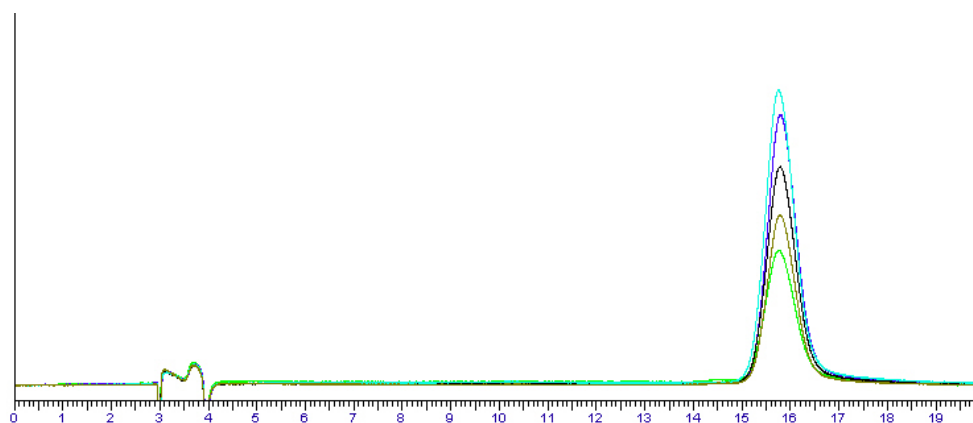
ชั่งผงชา 10 มก. ละลายน้ำและ sonicate 5 นาที จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 5 มล. แล้วนำไป centrifuge นำส่วนใสมากรองผ่าน membrane 0.2 mm นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

การเตรียมสารมาตรฐาน

ในการวิเคราะห์หาปริมาณนี้ ใช้ (+)-catechin hydrate เป็นสารมาตรฐานใน โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 60, 80, 100, 120, และ 140 มก./ มล. และนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อหาค่า peak area

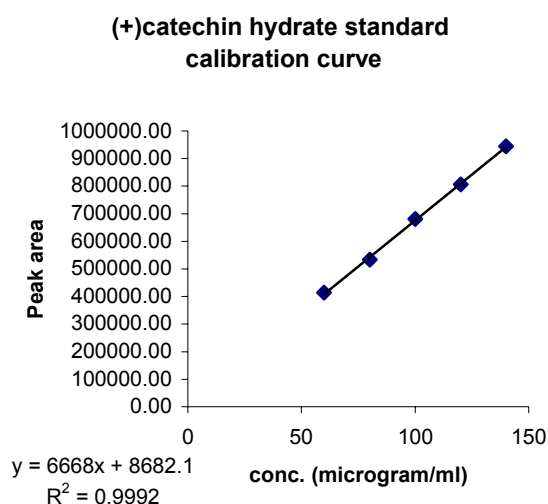
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

Chromatogram ของ (+)-catechin hydrate แสดงดังรูปที่ I-5 Chromatogram ของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยค่า peak area ของแต่ละความเข้มข้นจะนำไปใช้สร้างกราฟมาตรฐาน



รูปที่ I-5 Chromatogram overlay ของ (+)-catechin hydrate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (60, 80, 100, 120, และ 140 มก./ มล.)

กราฟมาตรฐาน ของ (+)-Catechin hydrate ซึ่ง plot จากสารมาตรฐาน 5 ความเข้มข้น และ peak area ของที่ได้จากการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ I-6



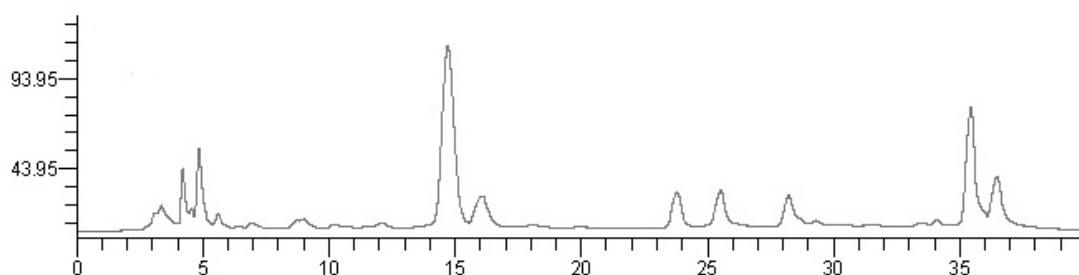
รูปที่ I-6 Calibration curve ของ (+)-catechin hydrate โดย plot ระหว่างความเข้มข้น และ peak area

จากสมการเส้นตรง $y = 6668x + 8682.1$ จะนำมาใช้ในการคำนวณความเข้มข้น (C, concentration of the individual catechin determined by linear regression analysis of (+)-catechin (mg/ml)) ของแต่ละ peak ของตัวอย่าง จากนั้นนำค่า C ที่ได้จากกราฟมาตรฐานมาคำนวณหาปริมาณของ total catechin ในตัวอย่างผงชาโดยใช้สมการ

$$\%(w/w) \text{ analyte} = C \times FV \times d \times F \times 100 / W$$

- C = concentration of the individual catechin determined by linear regression analysis of (+)-catechin (mg/ml)
- FV = final volume of sample (ml)
- D = dilution factor
- W = weight of sample (mg)
- F = correction factor for the individual catechin response vs. (+)-catechin
- F = 1.00 for (+)-catechin hydrate
- F = 1.020 for (+)-epicatechin (EC)
- F = 0.382 for (-)-epicatechin gallate (ECG)
- F = 0.543 for (-)-epigallocatechin gallate (EGCG)

ปริมาณของ total catechin ในตัวอย่างผงชาที่สุ่มมา จำนวน 10 ตัวอย่างอยู่ในช่วง 12.2826-13.6119% (ตารางที่ I-4)



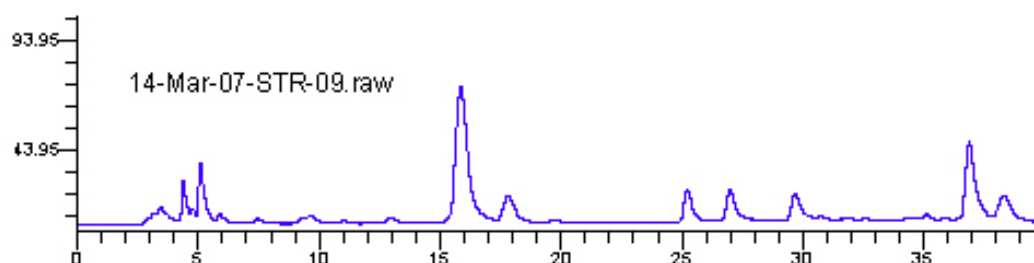
รูปที่ I-7 Chromatogram ของสารสกัดจากกาชา วิเคราะห์โดย column C_{18} (250x 4.6 mm) ขนาด particle 5 μ และใช้ gradient mobile phase คือ acetonitrile และ 0.1 % phosphoric acid

ตารางที่ I-4 ปริมาณของ total catechin ในตัวอย่างสารสกัดน้ำจากกากชา

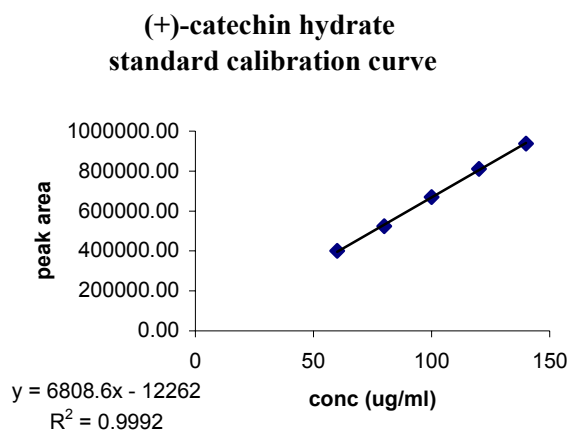
ตัวอย่าง	Wt. (mg)	% (w/w)				total catechin (% w/w)
		C	EC	EGCG	ECG	
cha001	10.80	3.461	3.426	1.788	3.449	12.123
cha002	10.80	3.887	3.490	1.775	3.622	12.774
cha003	10.20	3.691	3.542	1.904	3.622	12.758
cha004	10.20	3.522	3.404	1.883	3.570	12.379
cha005	10.60	3.588	3.567	1.879	3.667	12.701
cha006	10.30	3.711	3.705	1.844	3.835	13.095
cha007	10.20	3.737	3.583	1.894	3.819	13.033
cha008	10.20	3.385	3.438	1.858	3.746	12.427
cha009	10.20	3.850	3.587	1.860	4.138	13.436
cha010	10.30	3.480	3.599	1.852	3.207	12.138
					Average	12.686
					SD	0.427
					%CV	3.366

Catechin (C), Epicatechin (EC), Epigallocatechin gallate (EGCG), Epicatechin gallate (ECG)

การวิเคราะห์สารสกัดที่ผสมแป้งใช้วิธีวิเคราะห์เช่นเดียวกัน chromatogram ของสารสกัดกากชาที่ผสมแป้งแสดงในรูปที่ I-8 และ standard calibration curve ของการวิเคราะห์ในรูปที่ I-9



รูปที่ I-8 Chromatogram ของสารสกัดจากกากชาที่ผสม modified starch วิเคราะห์โดย column C₁₈ (250x4.6 mm) ขนาด particle 5 μ และใช้ mobile phase คือ acetonitrile และ 0.1 % phosphoric acid



รูปที่ I-9 Calibration curve ของ (+)-catechin hydrate โดย plot ระหว่างความเข้มข้น และ peak area

การคำนวณปริมาณ total catechin ของสารสกัดที่เติมแป้งทำได้เช่นเดียวกับสารสกัดที่ไม่เติมแป้งซึ่งปริมาณ total catechin แสดงดังตารางที่ I-5

ตารางที่ I-5 ปริมาณของ total catechin ในตัวอย่างสารสกัดน้ำของกากชาที่ผสม Modified starch

ตัวอย่าง	Wt. (mg)	% (w/w)				total catechin (% w/w)
		C	EC	EGCG	ECG	
STR1	10.00	2.442	2.319	1.360	0.749	6.870
STR2	10.20	2.481	2.308	1.141	0.445	6.374
STR3	10.00	2.509	2.164	1.220	0.782	6.675
STR4	10.00	2.554	2.381	1.256	0.829	7.020
STR5	10.00	2.588	2.311	1.341	0.697	6.937
STR6	10.00	2.563	2.258	1.324	0.723	6.869
STR7	10.20	2.442	2.229	1.356	0.805	6.832
STR8	10.30	2.278	2.168	1.283	0.806	6.535
STR9	10.10	2.497	2.344	1.304	0.862	7.007
					Average	6.791
					SD	0.22
					%CV	3.24

Catechin (C), Epicatechin (EC), Epigallocatechin gallate (EGCG), Epicatechin gallate (ECG)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

Catechin ในสารสกัดน้ำจากกากชาสามารถแยกได้ดี ด้วย HPLC column ชนิด C₁₈ (250x4.6 mm) ขนาด particle 5 μ และใช้ Mobile phase คือ gradient ระหว่าง acetonitrile และ 0.1% phosphoric acid โดยใช้ gradient program ดังตารางที่ 1-2 โดยสามารถแยกสาร catechin (C), epicatechin (EC), epigallocatechin gallate (EGCG) และ epicatechin gallate (ECG) ได้อย่างชัดเจน และนำ peak area ของสาร catechin ดังกล่าวมาคำนวณเป็นปริมาณ total catechin ของสารสกัด พบว่าสารสกัดน้ำจากกากชามีปริมาณ total catechin คิดเป็น 12.69 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักสารสกัด และพบว่าสารสกัดน้ำจากกากชาที่มีองค์ประกอบของ modified starch มีปริมาณ total catechin คิดเป็น 6.79 ± 0.22 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักสารสกัด

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ catechin ของสารสกัดกากชา และสารสกัดผสมแป้ง จะเห็นว่าการผสมแป้งลงไปทำให้ผลการวิเคราะห์ไม่ดี อาจเนื่องมาจากเกิด error ขณะสกัดจากแป้ง อย่างไรก็ตามเมื่อนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้องเสียเวลายุ่งยากกว่าในการพัฒนาสูตร ดังนั้นจึงไม่ใช้สารสกัดที่ผสมแป้ง

III.1.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging activity) ของสารสกัดน้ำจากกากชา

การทดลอง

Antioxidant ของสารสกัดน้ำจากกากชาสามารถวิเคราะห์ได้โดยวิธีของ Ancerwicz J. และคณะ (Free Radic Biol Med 1998;25(1):133-20) free radical scavenging activity ของสารสกัดที่มีต่อ DPPH โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (standard antioxidant agent) ซึ่งในที่นี้ใช้ Trolox และ (+)-catechin hydrate ซึ่งเป็นหนึ่งในสารออกฤทธิ์สำคัญของชา

การเตรียมสารมาตรฐาน Trolox

เตรียม stock ใน methanol ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml นำ stock มา 20 μ l ปรับปริมาตรเป็น 5 ml ใน volumetric flask ได้เป็นความเข้มข้นเริ่มต้น 8 μ g/ml จากนั้นนำมา 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 μ l เพื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย 1 mM DPPH (20 μ l) ใน 96-well plate และปรับความเข้มข้นเป็น 1.60, 2.13, 2.67, 3.20, 3.73, 4.27, และ 4.80 μ g/ml ตามลำดับ ปฏิกิริยาของแต่ละความเข้มข้นทำสามซ้ำ และวัดค่า OD₅₆₀ โดย Elisa-plate reader และคำนวณหา IC₅₀

การเตรียมสารมาตรฐาน (+)-catechin hydrate

เตรียม stock ใน methanol ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml จากนั้นปิเปตมา 20 μ l แล้วจึงปรับปริมาตรเป็น 5 ml ใน volumetric flask ได้เป็นความเข้มข้นเริ่มต้น 20 μ g/ml จากนั้นนำมา 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 μ l เพื่อทำปฏิกิริยากับ 1 mM DPPH และปรับความเข้มข้น

(+)-catechin hydrate เป็น 4.00, 5.33, 6.67, 8.00, 9.33, 10.67 และ 12.0 µg/ml ตามลำดับ แต่ละความเข้มข้นทำสามซ้ำ และวัดค่า OD₅₆₀ โดย Elisa-plate reader และคำนวณหา IC₅₀

การเตรียมสารละลายสารสกัดน้ำจากชา

เตรียมเตรียม stock ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml ในน้ำ จากนั้นปิเปตมา 20 µl แล้วจึงปรับปริมาตรเป็น 5 ml ด้วย methanol โดยใช้ volumetric flask ได้เป็นความเข้มข้นเริ่มต้น 20 µg/ml นำมา 60, 80, 100, 120, 140, 160 และ 180 µl มาทำปฏิกิริยากับ 1 mM DPPH (20 µl) ใน 96-well plate ได้เป็นความเข้มข้น 4.00, 5.33, 6.67, 8.00, 9.33, 10.67 และ 12.0 µg/ml ตามลำดับ และ วัด OD₅₆₀ จากค่า OD₅₆₀ คำนวณค่า % inhibition และ plot เป็น inhibition curve และคำนวณหา IC₅₀ จากสมการ

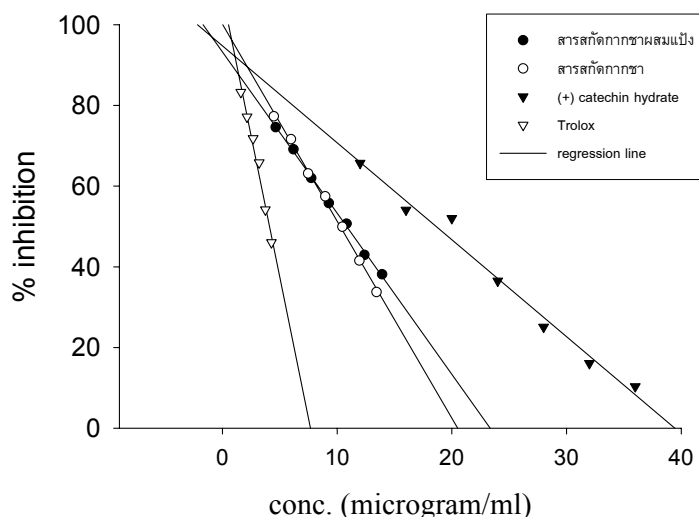
$$\% \text{ inhibition} = 100 - \left\{ \left[\frac{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}})}{\text{OD}_{\text{control}}} \right] \times 100 \right\}$$

OD_{control} = OD₅₆₀ ของปฏิกิริยาที่ไม่มีตัวอย่าง

OD_{sample} = OD₅₆₀ ของปฏิกิริยาที่มีตัวอย่าง

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. Inhibition curve ของสารสกัดจากชา และสารมาตรฐานดังรูปที่ I-10



รูปที่ I-10 Inhibition curve ของสารสกัดจากชา (○) สารสกัดจากชาที่เติมแป้ง (●)

Trolox (▽) และ (+)-catechin hydrate (▼)

2. ค่า % inhibition ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ของสารสกัดน้ำจากกากชาและสกัดน้ำจากกากชาผสมแป้ง ได้ 9.18 ± 0.65 % และ 11.57 ± 1.1 % ตามลำดับ (ตารางที่ I-6)

ตารางที่ I-6 DPPH scavenging activity ของสารสกัดน้ำจากกากชา ตารางแสดงค่า % inhibition ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ของสารสกัดน้ำจากกากชา(CHAs) และสารสกัดน้ำจากกากชาที่เติมแป้ง (STRs)

SAMPLE	IC_{50} (ug/ml)
CHA1	8.7366
CHA2	9.5356
CHA3	7.9137
CHA4	9.6786
CHA5	8.5966
CHA6	9.6941
CHA7	8.7664
CHA8	10.2696
CHA9	8.9775
CHA10	9.1873
CHA11	9.8213
CHA12	8.9611
Average	9.1782
SD	0.6493
STR1	13.35533
STR2	10.82614
STR3	11.49696
STR4	9.63998
STR5	13.00559
STR6	11.38277
STR7	11.13957
STR8	11.36437
STR9	11.88193
Average	11.56585
SD	1.11197
Trolox1	4.03050
(+)-catechin hydrate	9.82635

สารสกัดน้ำจากกากชาที่มี DPPH scavenging activity ที่ 50 เปอร์เซ็นต์คิดเป็น 9.18 มก./มล. และสารสกัดน้ำจากกากชาที่มีองค์ประกอบของ modified starch มี DPPH scavenging activity ที่ 50 เปอร์เซ็นต์คิดเป็น 11.57 มก./มล. โดยมีความแรงเป็น 0.44 เท่าของ Trolox ($IC_{50} = 4.03$ มก./มล.) ในขณะที่สารสกัดน้ำจากกากชาที่มีองค์ประกอบของ modified starch มีความแรงเป็น 0.35 เท่าของ trolox

พบว่าสารสกัดน้ำจากกากชาที่มี DPPH scavenging activity ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ใกล้เคียงกับ (+)-catechin hydrate ($IC_{50} = 9.83$ มก./มล.) และสารสกัดน้ำจากกากชาที่เติม modified starch มี DPPH scavenging activity ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 0.85 เปอร์เซ็นต์ของ (+)-catechin hydrate

III.1.3 การหาปริมาณสาร antioxidant ของสารสกัดกากชา

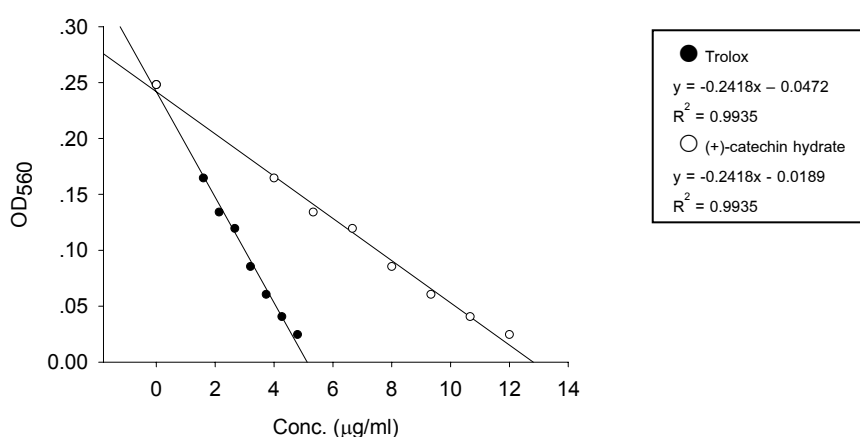
การทดลอง

1. เตรียมปฏิกิริยาของสารมาตรฐานตามข้างต้นจากนั้น นำไปวัด OD_{560} โดยเครื่อง Elisa Reader หลังจากทิ้งให้เกิดปฏิกิริยา 10 นาที จากนั้นนำค่า OD ที่ได้มา plot กับความเข้มข้นได้เป็น Dose response curve ของสารมาตรฐานทั้งสองชนิด

2. นำสารละลายกากชา (20 $\mu\text{g/ml}$) 100 μl ทำปฏิกิริยากับ DPPH ใน 96-well plate โดยปริมาตรสุดท้ายเป็น 300 μl คิดเป็นความเข้มข้น 6.67 $\mu\text{g/ml}$ นำไปวัด OD_{560} โดยเครื่อง Elisa Reader หลังจากทิ้งให้เกิดปฏิกิริยา 10 นาที ค่า OD_{560} ของตัวอย่างกากชาที่ได้ไปแทนที่สมการที่ได้จาก dose response curve ของสารมาตรฐาน จะได้ปริมาณสาร antioxidant ของกากชา

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. Dose response curve ของสารมาตรฐาน Trolox และ (+)-catechin hydrate



รูปที่ I-11 Dose response curve ของสารมาตรฐาน Trolox (●) และ (+)-catechin hydrate (○) สมการ linear regression ได้จากการ plot ระหว่าง ปริมาณสารและ OD_{560}

2. ปริมาณสาร antioxidant ในสารสกัดชา เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox และ (+)-catechin hydrate คำนวณได้จากสมการเส้นตรงที่ได้จาก dose response curve

ตารางที่ I-7 ปริมาณสาร Antioxidant ของสารสกัดกากชา (CHA) และสารสกัดชาที่เต็มแป้ง (STR) คำนวณเปรียบเทียบกับ Trolox และ (+)-catechin hydrate โดยน้ำหนัก

sample	ปริมาณของ antioxidant ของสารสกัด (1 มก.) เทียบเป็น Trolox (มก.)	ปริมาณของ antioxidant ของสารสกัด (1 มก.) เทียบเป็น (+)-catechin hydrate (มก.)
CHA1	0.4918	1.1544
CHA2	0.4625	1.0842
CHA3	0.6127	1.4421
CHA4	0.4226	0.9788
CHA5	0.4907	1.1570
CHA6	0.4290	1.0011
CHA7	0.5055	1.1912
CHA8	0.4332	1.0048
CHA9	0.4649	1.0936
CHA10	0.4594	1.0622
CHA11	0.4473	1.0395
CHA12	0.4654	1.0768
average	0.4737	1.1071
sd	0.0508	0.1245
STR1	0.3715	0.5765
STR2	0.4561	0.7204
STR3	0.3731	0.5935
STR4	0.3900	0.6261
STR5	0.3740	0.5743
STR6	0.3999	0.6356
STR7	0.4485	0.6998
STR8	0.3871	0.6178
STR9	0.3763	0.5994
avrage	0.3974	0.6270
sd	0.0326	0.0517

เมื่อคำนวณหาปริมาณสาร antioxidant ของสารสกัดทั้งสองชนิดพบว่าสารสกัดน้ำจากกากชา 1 มก. มีค่าความเป็น antioxidant คิดเป็น Trolox 0.47 มก. และ 1 มก. ของสารสกัดมีค่าความเป็น antioxidant คิดเป็น (+)-catechin hydrate 1.1 มก.

พบว่าสารสกัดน้ำจากกากชาที่มีส่วนผสมของ Modified starch 1 มก. มีสาร antioxidant คิดเป็น Trolox 0.40 มก. และ 1 มก. ของสารสกัดมีสาร antioxidant คิดเป็น (+)-catechin hydrate 0.63 มก.

III.2 การวิเคราะห์คุณภาพของสารสกัดชาอัสสัม

นำสารสกัดชาอัสสัมมาวิเคราะห์คุณภาพเช่นเดียวกับสารสกัดจากกากชาโดยวิเคราะห์หาปริมาณสาร antioxidant และ total catechin

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

สารสกัดน้ำชาอัสสัม 1 มก. จะมีปริมาณ antioxidant เทียบเท่า trolox 2.50 มก. และสารสกัด 1 มก. และมีปริมาณ antioxidant เทียบเท่า (+)-catechin hydrate 1.38 มก. (ตารางที่ I-8)

การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดมีค่า DPPH scavenging activity ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 25.94 มก./มล. และสารสกัดมีปริมาณ total catechin คิดเป็นร้อยละ 7.96 โดยน้ำหนักสารสกัด (ตารางที่ I-9)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสาร antioxidant ในสารสกัดกากชา และสารสกัดชาเขียว จะเห็นว่าสารสกัดกากชามีคุณภาพดีกว่าทั้งฤทธิ์ antioxidant และ ปริมาณ total catechin รวมทั้ง EGCG และ ECG ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกากชาเป็นที่ได้จากชาที่คุณภาพดีกว่าชาอัสสัม และในการผลิตเครื่องดื่มชาใช้ความร้อน 80 องศา 10 นาทีจึงยังเหลือสารสำคัญอีกมาก

ตารางที่ I-8 ปริมาณสาร antioxidant ของสารสกัดน้ำจากชาอัสสัม

ตัวอย่าง	DPPH scavenging activity (IC ₅₀ , µg/ml)	ปริมาณของ antioxidant ของสารสกัด (1 มก.) เทียบเป็น Trolox (มก.)	ปริมาณของ antioxidant ของสารสกัด (1 มก.) เทียบเป็น (+)-catechin hydrate (มก.)
ชาอัสสัม 1	25.12	2.508	1.380
ชาอัสสัม 2	24.57	2.574	1.494
ชาอัสสัม 3	27.30	2.451	1.310
เฉลี่ย	25.66	2.511	1.395
SD	1.44	0.0616	0.093
Trolox	4.77	-	-
(+)-catechin hydrate	9.83	-	-

ตารางที่ I-9 ปริมาณ total catechin ของสารสกัดน้ำจากชาอัสสัมจากการวิเคราะห์โดย HPLC

ตัวอย่าง	% (w/w)				total catechin (% w/w)
	C	EC	EGCG	ECG	
ชาอัสสัม 1	1.6099	4.1816	1.0518	1.3425	8.1858
ชาอัสสัม 2	1.6019	4.2086	0.9797	1.1670	7.9572
ชาอัสสัม 3	1.5456	3.9803	0.9460	1.1313	7.6032
เฉลี่ย	1.5858	4.1235	0.9925	1.2136	7.9154
SD	0.035	0.125	0.054	0.113	0.294

Catechin (C), Epicatechin (EC), Epigallocatechin gallate (EGCG), Epicatechin gallate (ECG)

IV. การจัดเตรียมสารสกัดให้แก่โครงการต่าง ๆ

ได้จัดเตรียมสารสกัดน้ำจากชาและชาอัสสัมให้แก่โครงการต่างทั้งสิ้น 8 โครงการตั้งรายละเอียดในตารางที่ I-10 และจัดเตรียมสารสกัดน้ำจากชาอัสสัม 2 โครงการ ดังรายละเอียดในตารางที่ I-11

ตารางที่ I-10 การจัดเตรียมสารสกัดน้ำจากชาให้แก่โครงการต่าง ๆ

ลำดับ	ชื่อโครงการ	ปริมาณสารสกัด (กก.)
1	การพัฒนาผลิตภัณฑ์สำหรับผลิตภัณฑ์สำหรับผิวพรรณของสารสกัดจากกากชา (รศ. ดร. พจวรรณ ลาวัณย์ประเสริฐ)	1.20
2	ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราในเรือนเพาะเห็ดหอม	0.45
3	การศึกษาประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากกากชาสำหรับใช้ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ (รศ. น.ส.พ ดร. ทวีศักดิ์ ส่งเสริม)	0.95
4	การศึกษาสถานภาพปัจจุบันของชาในประเทศไทย (อ. ดร. สายลม สัมพันธ์เวชโสภา)	1.50
5	การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากกากชาสำหรับใช้ในช่องปาก (ผศ. ดร. มัลลิกา ชมนาวัง)	0.20
6	การตั้งตำรับและควบคุมคุณภาพอาหารไก่ชนิดเม็ดที่มีสารสกัดพริก กะเพรา โหระพา (รศ. ดร. ศักดิ์ชัย วิทยาอารีย์กุล)	0.20
7	เพื่อเตรียม feed additive	6.50
8	การพัฒนาสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจรแกรนูลให้เป็นสารเสริมอาหารสำหรับสัตว์ (รศ. ดร. วัชรวิ คุณกิตติ)	0.50

ตารางที่ I-11 การจัดเตรียมสารสกัดน้ำจากชาอัสสัมให้แก่โครงการต่างๆ

ลำดับ	ชื่อโครงการ	ปริมาณสารสกัด (กก.)
1	การศึกษาสถานภาพปัจจุบันของชาในประเทศไทย (อ. ดร. สายลม สัมพันธ์เวชโสภา)	0.50
2	การตั้งตำรับและควบคุมคุณภาพอาหารไก่ชนิดเม็ดที่มีสารสกัดพริก กะเพรา โหระพา (รศ. ดร. ศักดิ์ชัย วิทยาอารีย์กุล)	0.20

Part II

การพัฒนาสารเสริมอาหารสัตว์จากกากชา

I. การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของสารสกัดจากกากชา

การศึกษาคูณสมบัติเบื้องต้นของสารสกัดจากกากชาทั้งชนิดไม่เติมแป้งและเติมแป้ง ประเมินโดยใช้วิธีของ USP XXVI ส่วนการวัดปริมาณ total ash และ acid insoluble ash ใช้วิธี AOAC, 1990

ผลการทดลอง

I.1 ศึกษาการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (Particle size distribution) ตามวิธีของ USP XXVI

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากกากชาทั้ง 2 ชนิด คือชนิด เติมแป้งและไม่เติมแป้ง มีขนาดอนุภาคที่ใกล้เคียงกัน คือ มากกว่า 80% ของ ผงสารสกัดที่สามารถผ่าน ตะแกรงขนาด เบอร์ 80 (ตารางที่ II-1)

ตารางที่ II-1 การกระจายขนาดอนุภาคของสารสกัดน้ำจากกากชาชนิดเติมแป้งและไม่เติมแป้ง

สารสกัดจากกากชา (ชนิดไม่เติมแป้ง)			
Time	% on sieve, Mesh size		
	No. 100	No. 80	No.60
1	15.98	81.89	2.13
2	15.84	81.86	2.3
3	15.64	81.94	2.42
4	15.23	81.78	2.99
5	15.45	81.68	2.87
6	15.74	81.86	2.4
Average	15.65	81.84	2.52
SD	0.27	0.09	0.34
RSD	1.74	0.11	13.39

สารสกัดจากกากชา (ชนิดเติมแป้ง)			
Time	% on sieve, Mesh size		
	No. 100	No. 80	No.60
1	14.85	82.15	3
2	14.68	82.12	3.2
3	14.75	82.56	2.69
4	14.53	82.03	3.44
5	14.95	82.23	2.82
6	14.84	82.34	2.82
Average	14.77	82.24	3
SD	0.15	0.19	0.28
RSD	1	0.23	9.38

I.2 การศึกษา Tapped Density ตามวิธีของ USP XXVI

จากการศึกษาพบว่าค่า bulk density และ tapped density ของสารสกัดจากกากชาทั้ง 2 ชนิด คือ ชนิดเต็มแป้ง และ ไม่เต็มแป้ง ไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ II-2)

ตารางที่ II-2 ผลการศึกษา Tapped Density ของสารสกัดน้ำจากกากชาชนิดเต็มแป้งและไม่เต็มแป้ง

● สารสกัดจากกากชา (ชนิดไม่เต็มแป้ง)

No.	Weight (g.) of sample in 100 ml. Cylinder	Volume after tapped			
		BD*	500 times	750 times	TD**
1	24.49	0.2449	83	83	0.2951
2	24.66	0.2466	81	81	0.3044
Average	24.58	0.2458			0.2998
SD	0.1202	0.0012			0.0066
%RSD	0.4891	0.4891			2.2137

● สารสกัดจากกากชา (ชนิดเต็มแป้ง)

No.	Weight (g.) of sample in 100 ml. Cylinder	Volume after tapped			
		BD*	500 times	750 times	TD**
1	24.80	0.248	82	80	0.3100
2	24.85	0.2485	81.5	79	0.3146
Average	24.83	0.2483			0.3123
SD	0.0354	0.0004			0.0032
%RSD	0.1424	0.1424			1.0319

* BD = Bulk Density (g/ml.), **TD = Tapped Density (g/ml.)

I.3 การศึกษา loss on drying และ moisture content

จากการศึกษาพบว่า loss on drying และ moisture content ของสารสกัดจากกากชา ทั้ง 2 ชนิด คือ ชนิดเต็มแป้ง และ ไม่เต็มแป้ง ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ค่า SD ของ สารสกัด จากกากชาชนิดเต็มแป้ง มีค่า SD สูงกว่าสารสกัดน้ำจากกากชาที่ไม่เต็มแป้ง ซึ่งน่าจะเป็นผล จากแป้งที่เต็มลงไปในสารสกัด (ตารางที่ II-3)

I.4 การศึกษา total ash

การศึกษาพบว่า Total ash = 7.83 % of its weight

ตารางที่ II-3 ผลการศึกษา loss on drying และ moisture content ของสารสกัดน้ำจากกากชา ชนิดเต็มแป้งและไม่เต็มแป้ง

● สารสกัดจากกากชา (ชนิดไม่เต็มแป้ง)

No	W (g)	W ₁ (g)	W ₂ (g)	%LOD	%Moisture content
1	50.8776	51.8902	51.8576	3.2194	3.3265
2	54.0680	55.0720	55.0397	3.2171	3.3241
3	51.7344	52.7469	52.7136	3.2889	3.4007
4	54.0129	55.0173	54.9840	3.3154	3.4291
5	59.2507	60.2605	60.2264	3.3769	3.4949
6	59.8984	60.8967	60.8643	3.2455	3.3544
			Average	3.2772	3.3883
			SD	0.0624	0.0668
			%RSD	1.9049	1.9701

● สารสกัดจากกากชา (ชนิดเต็มแป้ง)

No	W (g)	W ₁ (g)	W ₂ (g)	%LOD	%Moisture content
1	57.2884	58.2825	58.2504	3.2291	3.3368
2	55.1843	56.1816	56.1486	3.3089	3.4222
3	49.5593	50.5562	50.5229	3.3404	3.4558
4	54.8403	55.8455	55.8136	3.1735	3.2775
5	49.4106	50.4126	50.3770	3.5529	3.6838
6	49.2047	50.2086	50.1766	3.1876	3.2925
7	50.7464	51.7483	51.7148	3.3436	3.4593
8	51.9224	52.9260	52.8941	3.1786	3.2829
9	59.0315	60.0315	59.9986	3.2900	3.4019
10	50.5463	51.5423	51.5102	3.2229	3.3302
			Average	3.2827	3.3943
			SD	0.1150	0.1231
			%RSD	3.5037	3.6277

เมื่อ: W = น้ำหนัก (กรัม) ของ ภาชนะ, W₁ = น้ำหนัก (กรัม) ของ ภาชนะ + น้ำหนักของ ตัวอย่าง (ก่อนอบ), W₂ = น้ำหนัก (กรัม) ของ ภาชนะ + น้ำหนักของตัวอย่าง (หลังอบ)

1.5 การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัด

สารสกัดน้ำจากกากชาทั้ง 2 ชนิด คือ ชนิดเต็มแป้งและไม่เต็มแป้ง ให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ II-4)

ตารางที่ II-4 ผลการศึกษา ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสารสกัดน้ำจากกากชาชนิดเต็มแป้งและไม่เต็มแป้ง

สารสกัดจากกากชา (ชนิดไม่เต็มแป้ง)		
No	Weight of sample (g)	pH
1	1.0019	5.13
2	1.0015	5.13
3	1.0068	5.12
4	1.0063	5.12
5	1.006	5.13
6	1.0023	5.14
7	1.0038	5.14
8	1.0030	5.14
9	1.0060	5.14
10	1.0031	5.14
Average	1.0041	5.13
SD	0.002	0.0082
%RSD	0.2005	0.1604

สารสกัดจากกากชา (ชนิดเต็มแป้ง)		
No	Wt. of sample (g)	pH
1	1.0014	5.16
2	1.0028	5.15
3	1.0032	5.15
4	1.0045	5.14
5	1.0033	5.14
6	1.0058	5.15
7	1.0010	5.15
8	1.0023	5.15
9	1.0087	5.15
10	1.0062	5.15
Average	1.0039	5.15
SD	0.0024	0.0057
%RDS	0.2385	0.1102

1.6 การทดสอบคุณสมบัติในการไหล (Flowability by repose of angle)

พบว่าสารสกัดจากกากชาทั้ง 2 ชนิด คือ ชนิดเต็มแป้งและไม่เต็มแป้ง ไม่สามารถวัดมุมที่เกิดจากการไหลได้ เนื่องจากทั้ง 2 ชนิด ไม่ไหลหลังจากเทสารผ่านกรวย

II. ทดลองตั้งตำรับที่เหมาะสม

II.1 เตรียมตำรับแกรนูลของ สารสกัดจากกากชาโดยหาปริมาณสูงสุดของสารสกัดที่ถูกดูดซับ

ทดลองใช้สือเป็น corn starch และใช้น้ำเป็น binder ดังแสดงในตารางที่ II-5 โดยเตรียมเป็น Damp mass โดยการนวดในโกร่ง

ตารางที่ II-5 แสดงส่วนผสมของสูตรที่ 1-8

รายการ	สารสกัดจากกากชา (ชนิดไม่เติมแป้ง)				สารสกัดจากกากชา (ชนิดเติมแป้ง)			
	สูตรที่ 1 (g)	สูตรที่ 2 (g)	สูตรที่ 3 (g)	สูตรที่ 4 (g)	สูตรที่ 5 (g)	สูตรที่ 6 (g)	สูตรที่ 7 (g)	สูตรที่ 8 (g)
สารสกัดจากกากชา	10	20	30	40	10	20	30	40
Corn starch	90	80	70	60	90	80	70	60
น้ำ	30	25	20	-	33	28	25	-

ผลการทดลอง

1. สูตรที่ 1

- สามารถเตรียมเป็น damp mass และ wet granule โดยแรงผ่าน sieve 2 mm. ได้อย่างง่าย
- หลังจากอบแห้งแล้ว เมื่อนำมาเตรียม dry granule โดยผ่าน sieve 14 mesh พบว่ามีลักษณะเป็นผงหยาบมากกว่าเป็นตัวหนอน และมี fine particle อยู่เป็นจำนวนมาก (รูปที่ II-1)

2. สูตรที่ 2

- สามารถเตรียมเป็น damp mass และ wet granule โดยแรงผ่าน sieve 2 mm. ได้อย่างง่าย มี damp mass ติดที่ใบพัดบ้างเล็กน้อย
- หลังจากอบแห้งแล้ว เมื่อนำมาเตรียม dry granule โดยผ่าน sieve 14 mesh พบว่ามีลักษณะเป็นตัวหนอนมากกว่า สูตรที่ 1 แต่ก็ยังมี fine particle ปนอยู่พอสมควร (รูปที่ II-1)

3. สูตรที่ 3

- สามารถเตรียมเป็น damp mass ได้ แต่เมื่อเตรียมเป็น wet granule โดยแรงผ่าน sieve 2 mm. พบว่าผ่านได้ยากมาก เนื่องจากเนื้อ mass เหนียวมาก, ตัวหนอนที่ได้ยาวมาก และ damp mass ติดตามใบพัดปริมาณมาก

- หลังจากอบแห้งแล้ว เมื่อนำมาเตรียม dry granule โดยผ่าน sieve 14 mesh พบว่ามีลักษณะเป็นตัวหอนมากกว่า สูตรที่ 1 และ 2 แกรนูลที่ได้มีความแข็งแรงมากกว่า แต่ก็มี fine particle ปนอยู่มากเช่นกัน (รูปที่ II-1)

4. สูตรที่ 4

- ไม่สามารถเตรียมเป็น damp mass ได้เนื่องจากเมื่อเติมน้ำลงไปเพียงเล็กน้อยเนื้อของสารก็เหนียวมากจนไม่สามารถผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันได้

5. สูตรที่ 5

- สามารถเตรียมเป็น damp mass และ wet granule โดยแรงผ่าน sieve 2 mm. ได้อย่างง่าย
- หลังจากอบแห้งแล้ว เมื่อนำมาเตรียม dry granule โดยผ่าน sieve 14 mesh พบว่ามีลักษณะเป็นผงหยาบมากกว่าเป็นตัวหอน และมี fine particle อยู่ (รูปที่ II-1)

6. สูตรที่ 6

- สามารถเตรียมเป็น damp mass และ wet granule โดยแรงผ่าน sieve 2 mm. เริ่มมีการติดตามใบพัดบ้าง
- หลังจากอบแห้งแล้ว เมื่อนำมาเตรียม dry granule โดยผ่าน sieve 14 mesh พบว่ามีลักษณะเป็นตัวหอนมากกว่า สูตรที่ 1 แต่ก็ยังมี fine particle ปนอยู่ (รูปที่ II-1)

7. สูตรที่ 7

- สามารถเตรียมเป็น damp mass ได้ แต่เมื่อเตรียมเป็น wet granule โดยแรงผ่าน sieve 2 mm. พบว่าผ่านได้ยากมาก แต่ก็ยังง่ายกว่าสูตรที่ 3 ซึ่งสารสกัดจากกากชาชนิดที่ไม่ใส่แป้ง เนื่องจากเนื้อ mass เหนียวมาก, ตัวหอนที่ได้ก็ยาวมาก และ damp mass ติดตามใบพัด
- หลังจากอบแห้งแล้ว เมื่อนำมาเตรียม dry granule โดยผ่าน sieve 14 mesh พบว่ามีลักษณะเป็นตัวหอนมากกว่า สูตรที่ 1 และ 2 แกรนูลที่ได้มีความแข็งแรงมากกว่า แต่ก็มี fine particle ปนอยู่มากเช่นกัน (รูปที่ II-1)

8. สูตรที่ 8

- ไม่สามารถเตรียมเป็น Damp mass ได้เนื่องจากเมื่อเติมน้ำลงไปเพียงเล็กน้อยเนื้อของสารก็เหนียวมากจนไม่สามารถผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันได้

วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองทั้ง 8 สูตรนี้เพื่อหาปริมาณสารสกัดสูงสุดที่สามารถดูดซับได้ พบว่าสูตรตำรับที่ 1-4 ซึ่งเป็นการศึกษาปริมาณสูงสุดของสารสกัดจากกากชาชนิดไม่เติมแป้ง ที่สามารถตั้งเป็นตำรับได้ โดยเมื่อเพิ่มปริมาณสารสกัดในตำรับจาก 10 และ 20% เป็น 30% พบว่า

ปริมาณ fine particle ลดลง แต่เมื่อเพิ่มปริมาณถึง 40% กลับไม่สามารถเตรียมเป็น damp mass ได้ ทั้งนี้เป็นเพราะเหนียวเกินไป เนื่องจากสารสกัดจากกากชาที่มีลักษณะเหนียวเมื่อเปียกน้ำ จึงให้คุณสมบัติเป็นสารช่วยยัดเกาะ ดังนั้น %ในตำรับที่เพิ่มสูงขึ้นก็ทำให้คุณสมบัติในการเป็นสารช่วยยัดเกาะสูงขึ้นเช่นกัน จากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่าแบ่งข้าวโพดดูดซับสารสกัดได้สูงสุด 30%

จากสูตรตำรับที่ 5-8 เป็นการการศึกษาปริมาณสูงสุดที่แบ่งข้าวโพดจะดูดซับสารสกัดจากกากชาชนิดเต็มแบ่ง ซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณสารสกัดขึ้นเรื่อยๆจาก 10 และ 20% เป็น 30% พบว่าปริมาณ fine particle ลดลงแต่ยังมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ 30% สารสกัดจากกากชาชนิดไม่เต็มแบ่ง และเมื่อเพิ่มถึง 40% พบว่าที่ 40%ของสารสกัดจากกากชาในตำรับไม่สามารถเตรียมเป็น damp mass ได้เช่นกัน

ดังนั้น จากการทดลองทั้ง 8 สูตร จึงเลือก สูตรที่ 3 คือ 30%สารสกัดจากกากชา ชนิดไม่เต็มแบ่งมาทำการศึกษาในการทดลองต่อไป



สูตรที่ 1



สูตรที่ 2



สูตรที่ 3



สูตรที่ 5



สูตรที่ 6



สูตรที่ 7

รูปที่ II-1 granule จากสารสกัดน้ำจากกากชาสูตรที่ 1, 2, 3, 5, 6, 7

II.2 เตรียมตำรับแกรนูลของ สารสกัดจากกากชาโดยทดลองสื่อชนิดต่าง ๆ

โดยเลือก โดยใช้สื่อเป็น corn starch, tricalcium phosphate และ lactose ใช้ PVP K-90 เป็น Binder ใช้ Isopropyl alcohol (IPA) หรือน้ำ เป็นตัวทำละลาย ดังแสดงในตารางที่ II-6

ตารางที่ II-6 ส่วนผสมของสูตรที่ 9-13

ลำดับ	รายการ	สูตรที่ 9 (g)	สูตรที่ 10 (g)	สูตรที่ 11 (g)	สูตรที่ 12 (g)	สูตรที่ 13 (g)
1	สารสกัดจากกากชา	30	30	50	50	50
2	tricalcium phosphate	35	-	-	-	-
3	lactose	-	40	-	-	-
4	corn starch	35	30	48	45	40
5	น้ำ	12.48	10.05	-	-	-
6	PVP K-90	-	-	2	5	10
7	IPA	-	-	30	30	30

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สูตรที่ 9

- ตัวหนอนที่ได้จากการเตรียม wet granule ยาวมาก เหมือนไส้เดือน และ damp mass m ได้ก็เหนียวมาก ๆ ทำให้รีดออกมาได้ไม่หมด จึงไม่ได้ อบเพื่อ แร้งแห้งต่อไป (รูปที่ II-2)

2. สูตรที่ 10

- สามารถเตรียมเป็น damp mass และ wet granule โดยแรงผ่าน sieve 2 mm. ได้อย่างง่าย
- หลังจากอบแห้งแล้ว เมื่อนำมาเตรียม dry granule โดยผ่าน sieve 14 mesh พบว่ามีลักษณะเป็นตัวหนอนมากกว่า สูตรที่ 1 แต่ก็ยังมี fine particle ปนอยู่ เป็นพอสมควร (รูปที่ II-2)

3. สูตรที่ 11

- สามารถเตรียมเป็น damp mass แต่ไม่สามารถเตรียมเป็น wet granule ได้ เนื่องจาก ผงร่วนมากเกาะตัวกันได้น้อยมาก (รูปที่ II-2)

4. สูตรที่ 12

- สามารถเตรียมเป็น damp mass แต่ก็ไม่สามารถเตรียมเป็น wet granule ได้ เนื่องจาก ผงร่วนมากเกาะตัวกันได้นิดๆ ถึงแม้จะใช้ % PVP K-90 เพิ่มขึ้นแล้ว

ก็ตาม และเมื่ออบแห้งแล้วพอจับดู ร่วนเป็นผงจึงไม่ได้ทำการแรงแห้ง (รูปที่ II-2)

5. สูตรที่ 13

- สามารถเตรียมเป็น Damp mass และ Wet granule โดยแรงผ่าน sieve 2 mm. ได้อย่างง่าย แต่ ตัวหนอนที่ได้ยาวมากเหมือนไส้เดือน
- หลังจากอบแห้งแล้ว เมื่อนำมาเตรียม Dry Granule โดยผ่าน sieve 14 mesh พบว่ามีลักษณะเป็นผงหยาบมากกว่าเป็นตัวหนอน และมี fine particle อยู่ (รูปที่ II-2)



สูตรที่ 9



สูตรที่ 10



สูตรที่ 11



สูตรที่ 12



สูตรที่ 13

รูปที่ II-2 granule จากสารสกัดน้ำจากกากชาสูตรที่ 9, 10, 11, 12, 13

เนื่องจากแป้งข้าวโพดมีคุณสมบัติในการยึดเกาะต่ำ ทำให้แกรนูลที่ได้มีลักษณะเปราะ ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองปรับสูตรโดยใช้สารช่วยเติมเต็มตัวอื่นมาผสมกับแป้งข้าวโพด โดยสูตรตำรับที่ 9 เป็นการค่อยๆเติม Tricalcium phosphate จนมีอัตราส่วน 50 : 50 และตำรับที่ 10 เป็นการค่อยๆเติม Lactose จนมีอัตราส่วน 40 : 30 พบว่าไม่สามารถเพิ่มความแข็งแรงให้กับ Dry granule ได้ตามที่ต้องการ จึงกลับไปใช้แป้งข้าวโพดเป็นสารเติมเต็มเหมือนเดิมโดยเปลี่ยนสารช่วยยึดเกาะจากน้ำมาเป็น PVP K-90 และใช้ตัวทำละลายเป็น Isopropanol แทนน้ำ เนื่องจากหากใช้น้ำจะทำให้ damp mass ที่ได้นั้นยวบจนไม่สามารถผสมได้ ซึ่งในการทดลองได้ค่อยๆเพิ่มปริมาณสารสกัดจากกากชา เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากสารสกัดจากกากชาเองเวลาเปียกจะแสดงคุณสมบัติในการเป็นสารช่วยยึดเกาะ แต่ เมื่อเพิ่มปริมาณขึ้นถึง 50% ของสูตรไม่สามารถผสมให้เป็น damp mass เนื่องจากการยึดเกาะไม่ดี จึงได้ทำการเพิ่มความเข้มข้นของ % PVP K-90 จนถึง 10% เพื่อให้สามารถเตรียมเป็น dry granule ได้ จากผลการทดลองไม่สามารถเตรียมเป็น dry granule ได้ตามต้องการ เนื่องจากเมื่ออบแห้งแล้ว สารผสมที่ได้เสียการยึดเกาะกลายเป็นผงร่วน

ดังนั้นจึงกลับไปใช้สูตรที่ 3 โดยเปลี่ยนขนาดแรงเพื่อลดการเกิด fine particle ในขณะเตรียม dry granule

II.3 ศึกษาขนาดของ sieve ที่ใช้ในการเตรียม wet granule และ dry granule และผลต่อการเกิด fine particle

โดยในการศึกษาใช้สูตรที่มีสารสกัดจากกากชา 30% ทั้งชนิดเติมแป้งและไม่เติมแป้ง และใช้ sieve 2 mm. (No.10) ในการเตรียม wet granule เนื่องจากถ้าใช้ sieve 4 mm.(No.8), damp mass จะไหลลงมาหมดโดยไม่เกิดเป็นตัวหอนเลย หลังจากเตรียม wet granule จึงนำไปอบแห้ง ทำ dry granule ไปร่อนผ่าน sieve No. 12, 14, 16 น้ำแกรนูลที่ได้ไปทดสอบ particle size distribution

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาพบว่า

1. ตำรับทั้ง 2 สูตรที่ใส่แป้ง (สูตรที่ 7) และไม่ใส่แป้ง (สูตรที่ 3) สามารถลดการเกิด fine particle จากการเตรียม dry granule ได้โดยเลือก sieve ที่ใช้ในการเตรียมให้มีขนาดเล็กกว่า ตอนเตรียม wet granule ประมาณ 1 เบอร์ คือ ผ่าน sieve 2 mm. (No.10) แล้วผ่าน sieve No. 12
2. ในกรณีที่ใช้ Sieve No.16 ในการเตรียม dry granule จะเห็นว่าขนาดอนุภาคของแกรนูลที่ได้มีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอแต่ก็มี fine particle ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าการใช้แรงเบอร์ที่ใหญ่กว่า
3. เนื่องจากในตำรับใช้ corn starch เป็นสื่อ จึงให้เกิด fine particle ได้ง่ายเวลาที่ผ่านร่อนแห้งดังนั้นในตำรับจึงควรมีการเติมสารช่วยยึดเกาะเพิ่ม เช่น เจลลาติน, PVP K-90

ผลดังแสดงในตารางที่ II-7

ตารางที่ II-7 น้ำหนักและเปอร์เซ็นต์ของขนาดอนุภาคหลังจากการเตรียมเป็นแกรนูล โดยการผ่านร่อนขนาดต่างๆ

Particle size distribution	แกรนูลสารสกัดจากกากชา ไม่ใส่แป้ง (30%)				แกรนูลสารสกัดจากกากชา ใส่แป้ง (30%)			
	Dry granule with sieve no.				Dry granule with sieve no.			
	No. 14		No. 12		No. 16		No. 12	
	Wt. (g)	% w/w	Wt. (g)	% w/w	Wt. (g)	% w/w	Wt. (g)	% w/w
Fine particle	2.3	5.64	1.93	4.31	6.41	7.03	1.55	3.42
ขนาดที่ ผ่าน Sieve # 80	18.74	19.95	6.42	14.36	24.91	27.31	8.93	19.68
ขนาดที่ ผ่าน Sieve # 40	22.75	24.22	7.5	17.78	23.23	25.43	9.64	21.25
ขนาดที่ผ่าน Sieve # 30	47.13	50.18	28.84	64.53	36.67	40.2	25.24	55.64
Total	93.92		44.69		91.22		45.36	
% Loss	6.08		5.31		8.78		4.64	

จากการศึกษาเพื่อเลือกใช้น้ำขนาด sieve ที่เหมาะสมที่จะทำให้เกิด fine particle น้อยที่สุดนั้นขั้นตอนการเตรียม dry granule และแกรนูลที่ได้สามารถเข้ากันได้ดีกับวัตถุดิบอาหารสัตว์ เนื่องจากวัตถุดิบอาหารสัตว์ จะมีขนาดเฉลี่ยที่ 1-3 มิลลิเมตร ซึ่งอยู่ในช่วง Sieve No.6-18 (ข้อมูลจาก ฝ่ายวิชาการอาหารสัตว์, บริษัทเบทาโกรโคโร จำกัด(มหาชน))

ในการทดลองได้เลือกใช้ sieve No. 12, 14 และ 16 ซึ่งมีขนาด 1.7, 1.4 และ 1.18 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ซึ่งจากการทดลองการเตรียม dry granule ด้วย Sieve No. 12 จะให้ fine particle น้อยที่สุด และ Dry granule ที่ได้ มีขนาดเฉลี่ยประมาณ 1.7 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นขนาดที่สามารถเข้ากับวัตถุดิบอื่นๆ ได้ดี จึงเลือกเตรียม wet granule ด้วย Sieve No. 10 (2.0 มิลลิเมตร) และเตรียม dry granule ด้วย Sieve No. 12 (1.7 มิลลิเมตร)

การทดลองต่อไปจึงเป็นการทดลองเพื่อเพิ่มความแรงให้กับ Dry granule โดยใช้ PVP K-90 เป็นสารช่วยยึดเกาะ

II.4 ศึกษาปริมาณการใช้ที่เหมาะสมของ 1%w/v PVP K-90

เพื่อใช้เป็นสารช่วยยึดเกาะ ในการเตรียมตำรับแกรนูลของ 30% สารสกัดจากกากชา ชนิดไม่เต็มแป้ง พบว่าปริมาณที่เหมาะสมคือ 13 ml/100g (ตารางที่ II-8)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลองพบว่าใช้ 1% w/v PVP K-90 13 ml ได้ผลดีที่สุด (ตารางที่ II-8)

ตารางที่ II-8 แสดงปริมาณที่เหมาะสมของ 1%w/v PVP K-90 เมื่อใช้เป็นสารช่วยยึดเกาะในตำรับ

สารผสม 100 กรัม	1%w/v PVP K- 90 (mL.)	ผลที่ได้
(สารสกัดจากกากชา 30%+แป้ง ข้าวโพด 70%)	5	ปริมาณที่ใช้ในตำรับยังไม่เพียงพอในการเป็นสารช่วยยึดเกาะ Damp mass ที่ได้เมื่อผ่านแรงเปียกก็จะไหลง่าย และเมื่ออบแห้งแล้วก็คล้ายผงร่วนๆ ไม่สามารถนำมาแรงแห้งต่อได้
	10	ปริมาณที่ใช้ในตำรับสามารถให้ Damp mass แต่เมื่อนำไปผ่านแรงเปียกก็ยังคงไหลง่าย และเมื่ออบแห้งแล้วนำมาผ่านแรงแห้งแกรนูลที่มีลักษณะเป็นผงหยาบมากกว่าเป็นแกรนูล
	11	ปริมาณที่ใช้ในตำรับสามารถให้ Damp mass แต่เมื่อนำไปผ่านแรงเปียกก็ยังคงไหลง่าย และเมื่ออบแห้งแล้วนำมาผ่านแรงแห้งแกรนูลที่มีลักษณะเป็นแกรนูลมากขึ้น แต่ก็ยังมีผงหยาบมากอยู่

ตารางที่ II-8 แสดงปริมาณที่เหมาะสมของ 1%w/v PVP K-90 เมื่อใช้เป็นสารช่วยยึดเกาะในตำรับ (ต่อ)

สารผสม 100 กรัม	1%w/v PVP K- 90 (mL.)	ผลที่ได้
สารสกัดจากกากชา 30%+แป้งข้าวโพด 70%)	12	ปริมาณที่ใช้ในตำรับสามารถให้ Damp mass เมื่อนำไปผ่านแรงเปียก ให้ตัวหนอนที่ค่อนข้างยาว และเมื่ออบแห้งแล้วนำมาผ่านแรงแห้งแกรนูลที่มีลักษณะเป็นแกรนูลที่ดีขึ้น แต่ก็ยังมีผงหยาบปนอยู่
	13	ปริมาณที่ใช้ในตำรับสามารถให้ Damp mass เมื่อนำไปผ่านแรงเปียกจะให้ตัวหนอนที่ยาว มี Damp mass ติดตามใบพัดบ้าง และเมื่ออบแห้งแล้วนำมาผ่านแรงแห้งแกรนูลที่ได้มีลักษณะเป็นแกรนูลมากขึ้น มีผงปนน้อยลง
	14	ปริมาณที่ใช้ในตำรับสามารถให้ Damp mass เมื่อนำไปผ่านแรงเปียกจะให้ตัวหนอนที่ยาว มี Damp mass ติดตามใบพัดพอสมควร และมี Damp mass เข้าไปอุดตันรูของแรงมาก จนตัวหนอนช่วงท้ายเล็กลง และเมื่ออบแห้งแล้วนำมาผ่านแรงแห้งแกรนูลที่ได้มีลักษณะเป็นแกรนูลมากขึ้น แต่ก็ยังมีผงหยาบปน
	15	ปริมาณที่ใช้ในตำรับสามารถให้ Damp mass เมื่อนำไปผ่านแรงเปียกจะให้ตัวหนอนที่ยาว แต่ Damp mass ติดตามใบพัดมาก และอุดตันตามรูของแรงจน ผ่านได้ไม่หมดเมื่ออบแห้งแล้วนำมาผ่านแรงแห้งแกรนูลที่ได้มีลักษณะเป็นแกรนูลมากขึ้น
	20	ปริมาณที่ใช้ในตำรับสามารถให้ Damp mass ที่สวຍแต่เมื่อนำมาผ่านแรงเปียกแล้วไม่สามารถผ่านได้ทั้งหมดเนื่องจาก Damp mass เมื่อโดนบดด้วยใบพัดจะยิ่งเหนียวติดใบพัดจนไม่สามารถหมุนต่อได้ และทำให้รูของแรงเกิดการอุดตัน

จากการศึกษาเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมของสารช่วยยึดเกาะเพิ่มเติม โดยนำสูตรที่ 3 มาทำการศึกษาต่อ เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบกับ สูตรที่ใช้สารสกัดจากกากชาชนิดเดิมแป้ง 30% สารสกัดชนิดไม่เต็มแป้งจะให้สารสำคัญที่มีปริมาณสูงกว่า สารช่วยยึดเกาะเพิ่มเติมที่นำมาศึกษา คือ 1%w/v PVP K-90 เนื่องจาก ต้องการให้สารช่วยยึดเกาะที่มีประสิทธิภาพดี ใช้ปริมาณน้อย

โดยทดลองเพิ่มปริมาณจาก 5 ถึง 20 มิลลิลิตร และพบว่าปริมาณที่เหมาะสมในการเตรียมตำรับคือ 13 มิลลิลิตร เนื่องจากให้ dry granule ที่แกร่งมากขึ้น และมี fine particle น้อยมาก

ดังนั้นจึงใช้สูตรที่เหมาะสมสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์ ซึ่งประกอบด้วย 30% สารสกัดจากกากชาชนิดไม่เต็มแป้ง และใช้แป้งข้าวโพดเป็นสื่อ 1%w/v PVP K-90 เป็นสารช่วยยัดเกาะ จึงนำมาศึกษาความคงตัวของตำรับต่อไป

III. การศึกษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์จากกากชา

III.1 การวิเคราะห์หาค่า antioxidant ของผลิตภัณฑ์

วิเคราะห์หา antioxidant ของตำรับผลิตภัณฑ์โดยทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับวัตถุดิบ วิธีวิเคราะห์ตามหัวข้อ II และ III (part I)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาพบว่าผลิตภัณฑ์มี IC_{50} และปริมาณ antioxidant ดังตาราง

ตารางที่ II-9 ค่า antioxidant (IC_{50}) และปริมาณ antioxidant ของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์จากกากชา

ตัวอย่าง	DPPH scavenging activity (IC_{50} , $\mu g/ml$)	ปริมาณของ antioxidant ในผลิตภัณฑ์ (1 มก.) เทียบเป็น Trolox (มก.)	ปริมาณของ antioxidant ในผลิตภัณฑ์ (1 มก.) เทียบเป็น (+)-catechin hydrate (มก.)
ผลิตภัณฑ์ lot 1	24.372 ± 1.041	0.231 ± 0.006	0.150 ± 0.106
ผลิตภัณฑ์ lot 2	26.238 ± 1.343	0.202 ± 0.014	0.113 ± 0.246
ผลิตภัณฑ์ lot 3	22.896 ± 0.134	0.239 ± 0.015	0.164 ± 0.258
Trolox	4.77 ± 0.076	-	-
(+)-catechin hydrate	2.74 ± 0.014	-	-

III.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญออกจากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณ total catechin ของผลิตภัณฑ์

เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณ total catechin ในตำรับผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์จากกากชา การทดลองโดยใช้น้ำหนักผลิตภัณฑ์ให้ได้ 30 มก. นำไปละลายด้วยน้ำและอัลตราโซนิก ที่เวลาต่างๆ กัน คือ 5, 10, 15 และ 20 นาที ตามลำดับ ในแต่ละการทดลองทำสามซ้ำ จากนั้นนำไปวิเคราะห์โดย HPLC ตามวิธีเดียวกับการวิเคราะห์วัตถุดิบ (part I ข้อ I.3)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

เนื่องจากในผลิตภัณฑ์ประกอบด้วยสารสกัดน้ำจากกากชา 30% โดยน้ำหนัก เมื่อคำนวณกลับไปก็จะได้ percent recovery ดังแสดงในตารางที่ II-10 จากการทดลองพบว่าการสกัดด้วยวิธีอัลตราโซนิกเป็นเวลา 20 นาที สามารถสกัดสารสกัดออกจากผลิตภัณฑ์ได้ ร้อยละ 97.25

ตารางที่ II-10 ปริมาณ total catechin ที่สกัดออกจากผลิตภัณฑ์โดยการสกัดด้วยอัลตราโซนิก ที่เวลาต่างๆ โดยในแต่ละการทดลองทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

วิธีการสกัด	% (w/w)				Total catechin % (w/w)	% recovery
	C	EC	EGCG	ECG		
5 min	1.0725	0.9370	0.4685	0.8247	3.3027	85.56
10 min	1.0757	0.9195	0.4759	0.8829	3.3541	86.89
15 min	1.0824	0.9213	0.4710	0.8870	3.3617	87.09
20 min	1.2689	0.9512	0.5648	0.9688	3.7538	97.25

Catechin (C), Epicatechin (EC), Epigallocatechin gallate (EGCG), Epicatechin gallate (ECG)

IV. การศึกษาความคงตัวของตำรับ

ทำผลิตภัณฑ์ granule ที่ได้ pack ใส่ถุง foil และเก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้อง และ 45°C นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ทุกเดือนเป็นเวลา 4 เดือน โดยประเมินผลการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและสารสำคัญ

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

IV.1 การศึกษาความคงตัวทางกายภาพของตำรับ

เตรียมตำรับ แกรนูลของสารสกัดจากกากชาชนิดไม่เติมแป้ง(30%) โดยใช้ 1% PVP K90 13 ml/100g เป็นสารช่วยยึดเกาะในตำรับ เพื่อทำการศึกษาความคงตัวของตำรับ และทำการศึกษาคูณลักษณะทางกายภาพ ของแกรนูลที่ได้ ดังนี้

1. ลักษณะของแกรนูลที่ได้ มีลักษณะเป็นแกรนูลที่มีการกระจายขนาดของแกรนูลส่วนใหญ่ (80%) อยู่ในช่วง 30-40 Mesh ดังตารางที่ II-11

ตารางที่ II-11 การกระจายขนาดอนุภาคของแกรนูลที่เตรียมได้

Sieve size	Wt. (g.)	% w/v
Fine particle	2.5	2.52
Sieve # 80	12.84	12.97
Sieve # 40	19.84	20.03
Sieve # 30	63.85	64.48
Total	99.03	

2. คุณสมบัติในการไหล (Flowability by repose of angle) จากการวัด ความสูงและรัศมีของกอง 3 ครั้ง ค่าเฉลี่ย คือ 30.20 ซึ่งจัดอยู่ในช่วงของ Mildly cohesive ดังแสดงในตารางที่ II-12

ตารางที่ II-12 ค่าในการทดสอบคุณสมบัติในการไหลของแกรนูลของสารสกัดจากกากชาชนิดไม่เต็มแป้ง (30%)

ครั้งที่	ความสูงของกอง	รัศมีของกอง (เฉลี่ย)	θ
1	4.1	7.16	29.80
2	4.2	7.10	30.61
3	4.1	7.05	30.18
ค่าเฉลี่ย			30.20

3. การศึกษา loss on drying และ moisture content

ผลการศึกษาของตัวอย่างที่สุ่มมาจำนวน 10 ตัวอย่าง โดยค่า loss on drying คือ $5.22 \pm 0.32\%$ และ ค่า moisture content คือ $5.51 \pm 0.35\%$ (ตารางที่ II-13)

ตารางที่ II-13 ปริมาณ % LOD และ % moisture content ของแกรนูลของสารสกัดจากกากชาชนิดไม่เต็มแป้ง (30%)

No	W (g)	W1 (g)	W2 (g)	%LOD	%Moisture content
1	53.4560	54.5074	54.4492	5.5355	5.8598
2	52.7670	53.7353	53.6798	5.7317	6.0802
3	54.8908	55.9481	55.8895	5.5424	5.8676
4	49.6715	50.6049	50.5568	5.1532	5.4332
5	55.7775	56.7713	56.7215	5.0111	5.2754
6	59.2662	60.2528	60.2041	4.9361	5.1925
7	53.1119	54.1269	54.0784	4.7783	5.0181
8	54.3281	55.3335	55.2798	5.3412	5.6425
9	51.7953	52.8037	52.7542	4.9088	5.1622
10	53.6156	54.6199	54.5668	5.2873	5.5824
Average				5.2226	5.5114
SD				0.3171	0.3532
%RSD				6.0721	6.4090

4. การศึกษาความคงตัวเป็นเวลา 4 เดือน เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

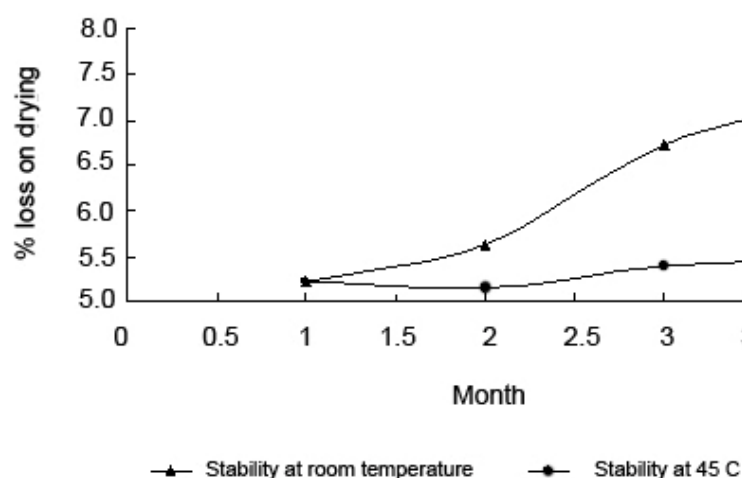
ผลการศึกษาคุนสมบัติทางกายภาพของแกรนูลที่เก็บไว้ที่ 2 สภาวะคือ อุณหภูมิห้อง และที่ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสสภาวะละ 3 ตัวอย่าง แสดงใน ตารางที่ II-14

ตารางที่ II-14 ปริมาณ % LOD, % moisture content, Flowability และ Color ของ
แกรนูลของสารสกัดจากกากชาชนิดไม่เติมแป้ง (30%) เมื่อเวลาผ่านไป 4 เดือน

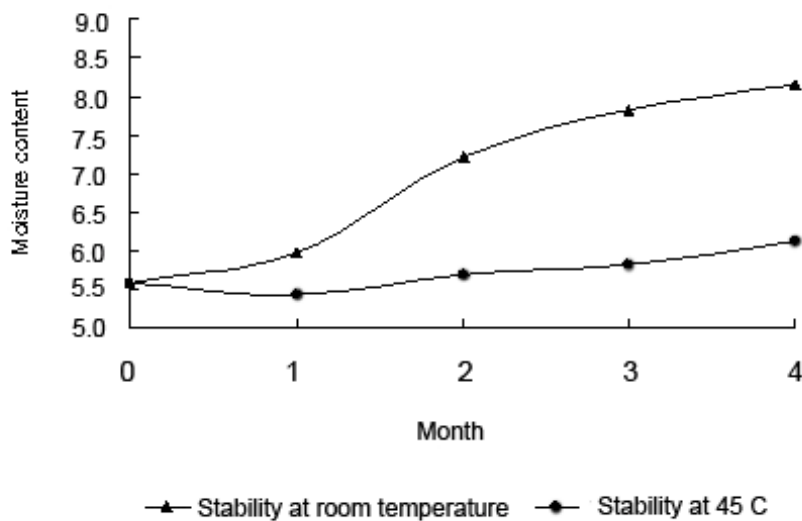
อุณหภูมิห้อง	Month				
	0	1	2	3	4
%LOD	5.22 ± 0.32	5.63 ± 0.13	6.72 ± 0.05	7.25 ± 0.05	7.54 ± 0.008
%Moisture content	5.51 ± 0.35	5.97 ± 0.15	7.21 ± 0.06	7.82 ± 0.06	8.16 ± 0.01
Flowability	Mildly cohesive, ($\theta = 30.2$)	Mildly cohesive, ($\theta = 29.8$)	Free flow, ($\theta = 29.6$)	Free flow, ($\theta = 28.8$)	Free flow, ($\theta = 28.1$)
Color	Slightly dark Brown	Slightly dark Brown	Slightly dark Brown	Slightly dark Brown	Slightly dark Brown
อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	Month				
	0	1	2	3	4
%LOD	5.22 ± 0.32	5.15 ± 0.03	5.39 ± 0.05	5.50 ± 0.06	5.78 ± 0.03
%Moisture content	5.51 ± 0.35	5.43 ± 0.04	5.70 ± 0.05	5.82 ± 0.07	6.14 ± 0.04
Flowability	Mildly cohesive, ($\theta = 30.2$)	Free flow, ($\theta = 29.8$)	Free flow, ($\theta = 29.7$)	Free flow, ($\theta = 29.8$)	Free flow, ($\theta = 29.6$)
Color	Slightly dark Brown	Slightly dark Brown	Slightly dark Brown	Slightly dark Brown	Slightly dark Brown

จากการศึกษาความคงตัวของแกรนูลสารสกัดจากกากชาชนิดไม่เติมแป้ง (30%) เป็นเวลา 4 เดือน โดยการศึกษาจากค่า loss on drying แสดงในกราฟรูปที่ II-3 และค่า moisture content แสดงในกราฟรูปที่ II-4 โดยการ plot ระหว่าง %LOD และเวลา สามารถสรุปผลได้ว่า

1. ในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องนั้น แกรนูลจะมีค่า loss on drying และค่า moisture content ที่เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากความชื้นที่มีอยู่ภายในห้องผ่านเข้าไปในภายในถุงพอลิที่ใช้ในการเก็บรักษาได้ อีกทั้งความชื้นที่เพิ่มขึ้นจะถูกดูดซับโดยสารสกัดจากกากชาในตำรับเนื่องจากสารสกัดจากกากชาสามารถดูดความชื้นได้ ตามข้อมูลเมื่อเก็บสารสกัดจากกากชาที่อุณหภูมิห้องนาน 4 เดือน สารสกัดจะมี ค่า %loss on drying และค่า Moisture content เป็น $5.59 \pm 0.04\%$ และ $5.92 \pm 0.05\%$ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นจากเดิม คือ $3.28 \pm 0.06\%$ และ $3.39 \pm 0.07\%$ ตามลำดับ ดังนั้นในการป้องกันความชื้นถุงพอลิที่ใช้ควรต้องใช้ถุงที่คุณภาพสูงขึ้น และป้องกันความชื้นได้ดีกว่าที่ใช้ทั่วไปในโรงงานผลิตอาหารสัตว์
2. ในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสนั้น ค่า loss on drying และค่า moisture content มีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นเช่นกันแต่น้อยกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสนั้น เป็นสภาวะที่มีความชื้นคงที่ (50%RH) จึงทำให้โอกาสในการดูดความชื้นของแกรนูลน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ II-3 กราฟแสดงค่า %LOD ของแกรนูลสารสกัดจากกากชาชนิดไม่เต็มแป้ง (30%) เมื่อเก็บนาน 4 เดือน ที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 45°C



รูปที่ II-4 กราฟแสดงค่า Moisture content ของแกรนูลสารสกัดจากกากชาชนิดไม่เติมแป้ง (30%) เมื่อเก็บนาน 4 เดือน ที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 45 °C

- เมื่อความชื้นเพิ่มขึ้นทำให้คุณสมบัติในการไหลของแกรนูลดีขึ้นจากเดิมเล็กน้อย คือ จาก Mildly cohesive เป็น free flow (เห็นได้จากค่า θ ที่ลดลงเล็กน้อย) เนื่องจากเมื่อแกรนูลมีความชื้นที่เพิ่มขึ้นทำให้ผิวสัมผัสระหว่างเกรวที่ใช้ในการทดลองและแกรนูลมีความฝืดลดลง
- ความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา และ ความชื้นที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อสีของแกรนูล ซึ่งตลอดระยะเวลา 4 เดือน สีของแกรนูลยังคงเป็นสีน้ำตาล

IV.2 การศึกษาความคงตัวของสารสำคัญในตำรับผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์จากกากชา

IV.2.1 ความคงตัวของ catechin ในผลิตภัณฑ์

ความคงตัวของตำรับผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์จากกากชาทำที่อุณหภูมิห้อง และที่สภาวะเร่ง (45 °C) ที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 เดือนตามลำดับ วิเคราะห์หาความคงตัวของ total catechin ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์โดยใช้ HPLC ในสภาวะเดียวกับการวิเคราะห์วัตถุติด (part I ข้อ I.3) และใช้สภาวะการสกัดตามข้อ III.2.2.1 โดยการอุลตราโซนิกเป็นเวลา 20 นาที นำไปปรับปริมาตรเป็น 5 มล. centrifuge ที่ 12,000 รอบ/นาที แล้วจึงกรองด้วย syringe filter ขนาด 0.2 ไมครอน ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยแต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ ปริมาณ total catechin ของผลิตภัณฑ์ที่เวลาต่างๆแสดงในตารางที่ II-15

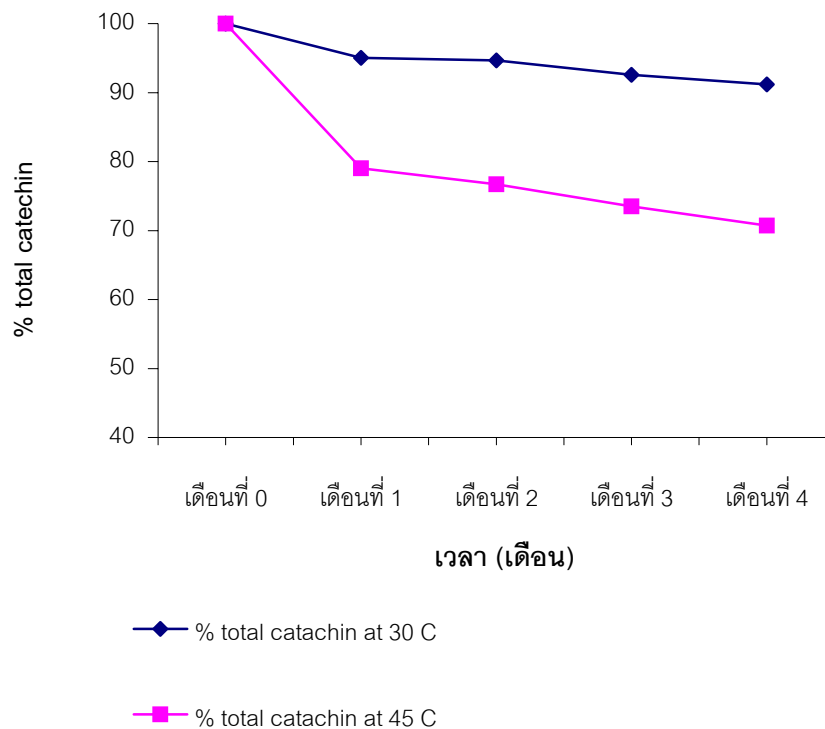
ความคงตัวของ catechin ในผลิตภัณฑ์แสดงในกราฟรูปที่ II-3 โดย plot ระหว่าง % of total catechin (โดยคิดที่ เดือนที่ 0 เป็น 100 %) และเวลา พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปแนวโน้มของปริมาณ total catechin ในผลิตภัณฑ์มีปริมาณลดลง ในเดือนที่ 4 หลังจากการศึกษาความคงตัว

พบว่าที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณ total catechin ลดลงไป ร้อยละ 8.82 ในขณะที่ที่สภาวะเร่ง (45°C) ปริมาณ total catechin ในตำรับผลิตภัณฑ์ลดลงไป ร้อยละ 29.30

ตารางที่ II-15 ปริมาณ total catechin ของผลิตภัณฑ์ที่เวลาต่างๆ

อุณหภูมิห้อง	Month				
	0	1	2	3	4
C	1.269 $\pm$ 0.053	1.219 $\pm$ 0.004	1.207 $\pm$ 0.030	1.152 $\pm$ 0.023	1.125 $\pm$ 0.038
EC	0.951 $\pm$ 0.050	0.961 $\pm$ 0.031	0.928 $\pm$ 0.035	0.915 $\pm$ 0.005	0.904 $\pm$ 0.039
EGCG	0.565 $\pm$ 0.041	0.516 $\pm$ 0.040	0.538 $\pm$ 0.015	0.531 $\pm$ 0.014	0.525 $\pm$ 0.006
ECG	0.969 $\pm$ 0.048	0.871 $\pm$ 0.022	0.881 $\pm$ 0.008	0.877 $\pm$ 0.026	0.868 $\pm$ 0.013
Total catechin (% w/w)	3.754 $\pm$ 0.183	3.567 $\pm$ 0.071	3.554 $\pm$ 0.078	3.476 $\pm$ 0.054	3.423 $\pm$ 0.092
% ที่คงเหลือ	100.00	95.02	94.67	92.59	91.18
อุณหภูมิ 45 องศา เซลเซียส	Month				
	0	1	2	3	4
C	1.269 $\pm$ 0.053	0.933 $\pm$ 0.013	0.887 $\pm$ 0.029	0.854 $\pm$ 0.012	0.806 $\pm$ 0.028
EC	0.951 $\pm$ 0.050	0.753 $\pm$ 0.017	0.727 $\pm$ 0.026	0.706 $\pm$ 0.033	0.680 $\pm$ 0.017
EGCG	0.565 $\pm$ 0.041	0.515 $\pm$ 0.006	0.514 $\pm$ 0.031	0.467 $\pm$ 0.023	0.461 $\pm$ 0.017
ECG	0.969 $\pm$ 0.048	0.764 $\pm$ 0.020	0.751 $\pm$ 0.004	0.733 $\pm$ 0.004	0.708 $\pm$ 0.006
total catechin (% w/w)	3.754 $\pm$ 0.183	2.966 $\pm$ 0.028	2.880 $\pm$ 0.077	2.760 $\pm$ 0.059	2.054 $\pm$ 0.052
% ที่คงเหลือ	100.00	79.01	76.72	73.52	70.70

Catechin (C), Epicatechin (EC), Epigallocatechin gallate (EGCG), Epicatechin gallate (ECG)



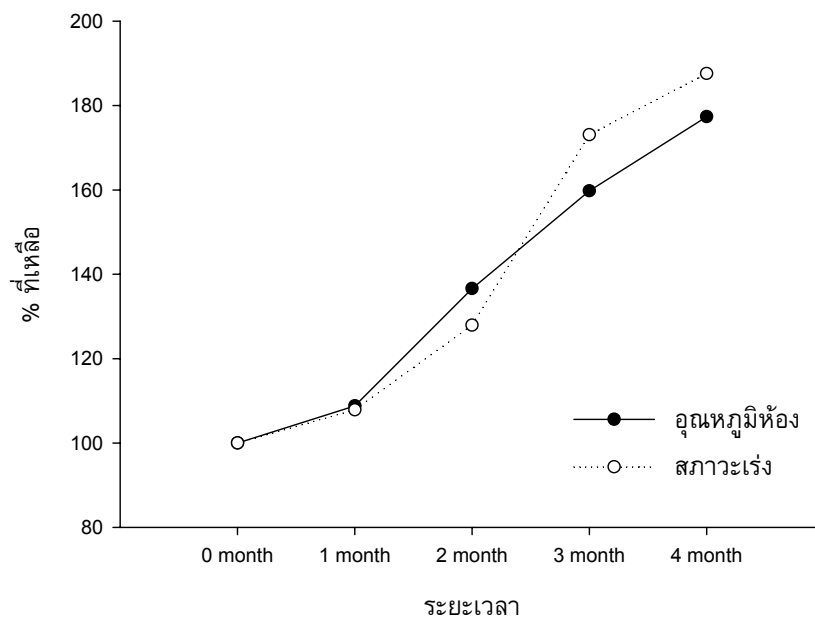
รูปที่ II-5 กราฟแสดงความคงตัวของตำรับผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์จากกากชา plot ระหว่าง percentage of total catechin กับเวลาเดือนที่ 0, 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ

IV.2.1 ความคงตัวของสาร antioxidant ในผลิตภัณฑ์

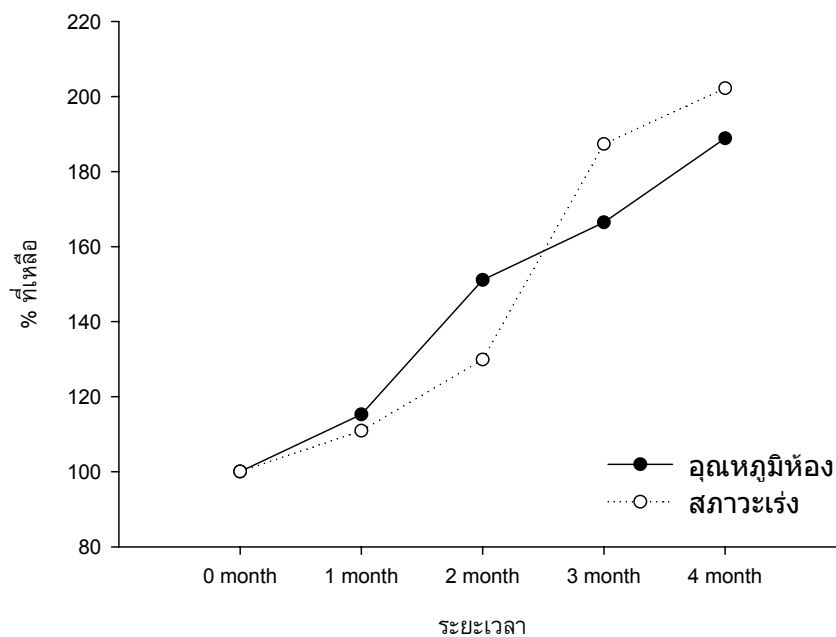
โดยวิเคราะห์ DPPH scavenging activity (IC_{50}) และความเป็น antioxidant ดังตารางที่ II-16 และเปรียบเทียบร้อยละของ DPPH scavenging activity ที่เหลือในผลิตภัณฑ์ดังตารางที่ II-17 แนวโน้มของความคงตัวของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์แสดงในรูปที่ II-6

ตารางที่ II-16 ปริมาณสาร antioxidant ของตำรับผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์

ตัวอย่าง	DPPH scavenging activity	ปริมาณของ antioxidant เปรียบเทียบกับ Trolox (มก.)		ปริมาณของ antioxidant เปรียบเทียบกับ (+)-catechin hydrate (มก.)	
	IC ₅₀ (µg/ml)	ปริมาณของ antioxidant ใน ตำรับ (มก.)	% ที่เหลือ	ปริมาณของ antioxidant ใน ตำรับ (มก.)	% ที่เหลือ
อุณหภูมิตั้ง					
0 month	29.496 ±1.574	0.491 ±0.018	100.000	0.4453 ±0.021	100.000
1 month	28.525 ±2.275	0.535 ±0.012	108.799	0.5129 ±0.014	115.258
2 month	26.396 ±1.581	0.672 ±0.023	136.623	0.6724 ±0.027	151.106
3 month	21.763 ±3.690	0.786 ±0.009	159.788	0.7407 ±0.011	166.459
4 month	21.316 ±1.879	0.873 ±0.016	177.371	0.8403 ±0.019	188.840
สภาวะเร่ง					
0 month	29.496 ±1.574	0.491 ±0.018	100.000	0.4453 ±0.021	100.061
1 month	27.089 ±0.579	0.531 ±0.012	107.855	0.494 ±0.013	110.906
2 month	21.110 ±1.840	0.630 ±0.047	127.950	0.578 ±0.054	129.890
3 month	20.688 ±0.377	0.852 ±0.038	173.086	0.834 ±0.044	187.341
4 month	19.591 ±0.531	0.923 ±0.025	187.585	0.900 ±0.028	202.205
Trolox	4.77 ±0.174	-	-	-	-
(+)-catechin hydrate	9.83 ±0.082	-	-	-	-



รูปที่ II-6 ปริมาณ antioxidant ของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์ ที่อุณหภูมิห้องและสภาวะเร่ง เมื่อเก็บไว้ที่ 1, 2, 3 และ 4 เดือน เมื่อคิดเป็น Trolox



รูปที่ II-7 ปริมาณ antioxidant ของตำรับผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์ ที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 เดือนเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและสภาวะเร่ง เมื่อคำนวณเป็น (+)-catechin hydrate

จากการศึกษาความคงตัวของสาร antioxidant พบว่ามี antioxidant ในผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป ในเดือนที่ 4 หลังจากการศึกษาความคงตัวโดยปริมาณ antioxidant เพิ่มขึ้นจาก 100% เป็น 188.84 และ 202.205% ที่อุณหภูมิห้องและ ที่สภาวะเร่ง (45°C) ตามลำดับ การที่ปริมาณ catechin และอนุพันธ์ลดลงแต่ฤทธิ์ antioxidant เพิ่มขึ้นแสดงว่าสารที่ได้จากการสลายตัวยังมีคุณสมบัติเป็น antioxidant อยู่และการนำไปใช้ประโยชน์ โดยใช้เป็น antioxidant เป็นมาตรฐานจึงยังใช้ได้

จากข้อมูลการวิเคราะห์ปริมาณ Total catechin ในแกรนูลสารสกัดจากกากชาชนิดไม่เติมแป้ง (30%) สามารถสรุปผลได้ว่า

1. จากผลการวิเคราะห์ %Total catechin ในแกรนูลสารสกัดจากกากชาชนิดไม่เติมแป้ง (30%) เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะเห็นว่าปริมาณ %Total catechin แสดงแนวโน้มลดลงในการเก็บทั้ง 2 สภาวะ โดยการเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส %Total catechin จะลดลงมากกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
2. จากข้อมูลเปรียบเทียบปริมาณ %Total catechin, ค่า Loss on drying และค่า moisture content จากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สามารถสรุปได้ว่า อุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลต่อการลดปริมาณ %Total catechin มากกว่าปริมาณความชื้น
3. ดังนั้นควรทำการศึกษาต่อเนื่องในเดือนที่ 6, 9, 12, 18 และ 24 เพื่อศึกษาการลดลงของปริมาณ %Total catechin เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เพื่อการประเมินว่าในการเก็บรักษานั้นอาจต้องทำการเคลือบแกรนูลของสารสกัดจากกากชาหรือไม่ในกรณีที่ต้องการผลจาก catechin และอนุพันธ์ แต่ถ้าต้องการผลจากการเป็น antioxidant อาจไม่จำเป็น
4. จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในการศึกษายังไม่ดีพอที่จะป้องกันผลิตภัณฑ์ ควรเป็นถุงคุณภาพดีขึ้นเช่น หนาขึ้น หรือเคลือบหนาขึ้น หรืออาจจะต้องเคลือบแกรนูลหนาขึ้น

Part III

การทำการอบวิจัยใหม่

I. การทำการอบวิจัยเรื่องเปลือกผิวส้ม

เนื่องจากบริษัท Tipco ได้เสนอโจทย์วิจัยการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้จากโรงงานน้ำผลไม้ และผลไม้กระป๋อง โดยขอให้ดูความเป็นไปได้เรื่องของกากส้มเขียวหวาน และสับปะรดกระป๋อง ทางสำนักงานได้ดำเนินการตรวจสอบข้อมูล และประเมินความเป็นไปได้ในเรื่องการนำ Waste product มาใช้ประโยชน์ พบความเป็นไปได้ในด้านต่างๆ ดังนี้

1. เปลือกส้มใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยใช้เลี้ยงปลาสัตว์ แต่พบว่าการใช้กากส้มสดมีปัญหาในด้านการขนส่งและการเน่าเสียระหว่างการเก็บรักษา เนื่องจากกากส้มสดมีน้ำเป็นองค์ประกอบสูง จึงมีการบีบน้ำออกทำเป็นผลิตภัณฑ์ขายเป็นอาหารสัตว์ และน้ำที่ได้จากการบีบซึ่งพบว่ามีปริมาณน้ำตาลสูงยังสามารถนำไปใช้ผลิตแอลกอฮอล์ได้อีกด้วย

2. น้ำมันหอมระเหยจากเปลือก ผิวเปลือกพืชตระกูลส้มมีต่อมน้ำมันจำนวนมากและภายในต่อมน้ำมันนี้มีน้ำมันหอมระเหยเป็นหลักซึ่งนับว่าเป็น by-product ที่มีความสำคัญในด้าน

- เป็นสารให้ flavor ในน้ำส้ม
- ใช้มาเชื่อมปิดในสัตว์ปีก
- personal care, perfume
- food & beverage

3. d-Limonene พบมากในน้ำมันจากเปลือกพืชตระกูลส้ม โดย d-Limonene แยกได้จากน้ำมันที่ได้จากการบีบ หรือได้จาก citrus waste streams d-Limonene สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการเป็น feed stock for adhesives, degreasers, flavor, cleaners, solvent or diluents for the flavors (Goodrich R.M., 2006)

4. Flavonoid & Limonoid เป็นองค์ประกอบหลักของส้มซึ่งมีประโยชน์ในด้านผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านมะเร็ง

จากการเดินทางไปสำรวจที่โรงงานเพื่อดูการผลิตและเก็บตัวอย่าง มาทดลองศึกษาความเป็นไปได้ โดยทำการทดลองเบื้องต้นต่อไปนี้

การสกัดน้ำมันหอมระเหย และ flavonoids จากกากส้ม

การศึกษานี้เป็นการหาปริมาณสารสกัดเบื้องต้นและหาปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากกากส้มในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม โดยทำการหาปริมาณสารสกัดเบื้องต้นและน้ำมันหอมระเหยทั้งจากกากเปลือกส้ม (peels) และน้ำทิ้งจากกากส้ม (molasses)

ตัวอย่างกากส้ม

1. กากส้มที่ออกจากเครื่องคั้นทางหน้าเครื่อง (4.5 kg)
2. กากส้มหลังเครื่องคั้น (2.0 kg)
3. น้ำเปลือกหลังเครื่องเป็นน้ำที่ได้จากข้อ 2 มาบีบ (1 L)
4. น้ำสายยางหน้าหน้าเครื่องคือน้ำส้มที่หกออกมาจากหน้าเครื่อง (1 L)
5. น้ำเปลือกไหลลงจากสกรูคอนเวย์เยอร์ก่อนส่งลงสายพานทิ้ง (1 L)

วิธีทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดเบื้องต้น

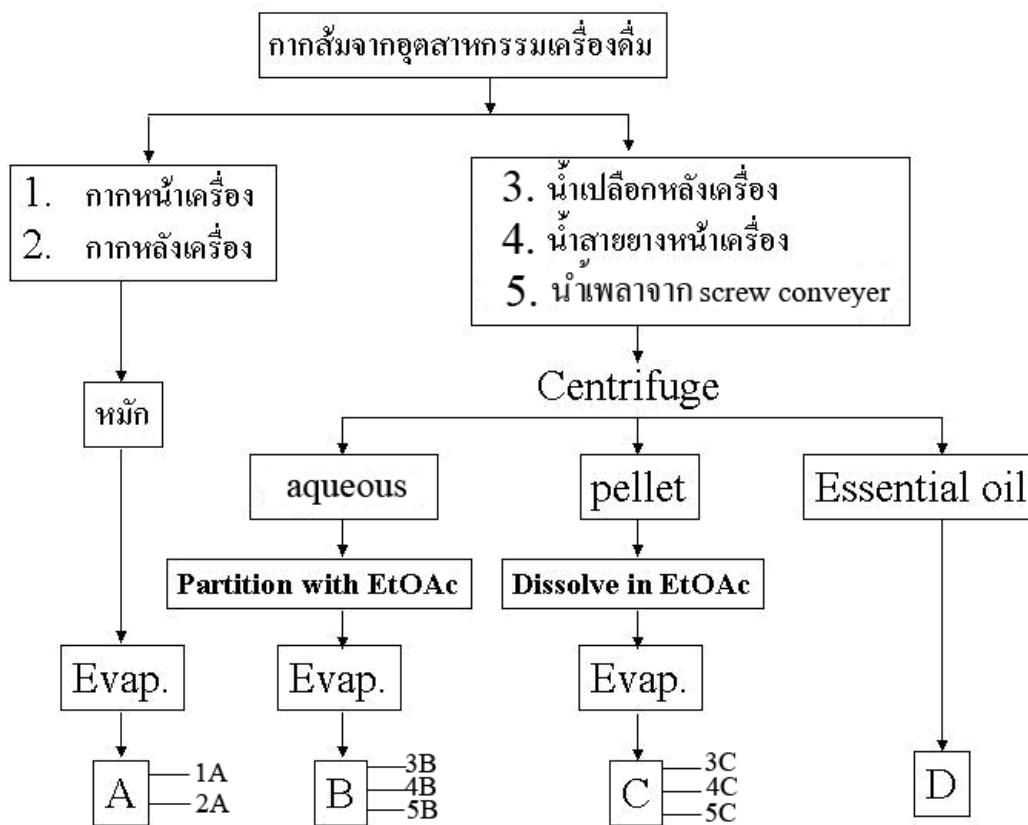
1.1 กากส้ม

1. กากที่ได้นำมาซึ่งน้ำหนัก และหมักด้วย ethyl acetate 1 คิน
2. กรองเอากากออก แล้วนำไปหมักอีก โดยเปลี่ยน ethyl acetate ทุกวันจนกว่าจะใส เริ่มแรกในน้ำหมัก ethyl acetate ยังมี pectin ออกมามากทำให้ไม่สามารถกรองได้จึงต้องตกตะกอนออกก่อนด้วย ethanol
3. หลังจากกรองนำน้ำหมักไประเหยเอา ethyl acetate ออก
4. ชั่งน้ำหนักสารสกัด

1.2 น้ำส้ม

1. นำน้ำคั้นที่ได้มา centrifuge ที่ 8,000 rpm, 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จะได้สามส่วนคือ ส่วนที่เป็นน้ำ, ส่วนที่เป็นตะกอน, และส่วนที่เป็นน้ำมันหอมระเหย
2. แยกส่วนของน้ำมันหอมระเหยออกมาด้วย pasteur pipette และบันทึกปริมาตรของน้ำมัน
3. ส่วนที่เป็นน้ำ นำมา partition ด้วย ethyl acetate จนใสแล้วนำชั้น ethyl acetate ไประเหยเอา ethyl acetate ออก ทิ้งชั้นน้ำ แล้วบันทึกน้ำหนัก
4. ส่วนตะกอนนำไปละลายด้วย ethyl acetate แล้วนำมากรองก่อนที่จะนำไประเหยเอา ethyl acetate ออก ทิ้งส่วนตะกอนที่ได้

สรุปขั้นตอนการสกัดสารสกัดเบื้องต้นจากกากอุตสาหกรรมน้ำส้มดังรูปที่ III.1



รูปที่ III-1 แผนภูมิแสดงการแยกน้ำมันหอมระเหยและ limonoids จากกากส้ม (A: สารสกัดที่ได้จากการหมัก, B: สารสกัดที่ได้จากการ partition, C: สารสกัดที่ได้หลังจากการละลายตะกอน, D: น้ำมันหอมระเหย)

2. TLC analysis

เปรียบเทียบสารสกัดด้วย Thin layer chromatography โดยใช้ silica gel GF₂₅₄ aluminium sheet (Merck Inc.) และ dichloromethane: methanol (95:5) เป็น developing solvent ละลายสารสกัด A, B และ C (จากรูปที่ III-1) ใน methanol ให้ได้ความเข้มข้น 10 mg/ml หลังจากนั้นนำมา 4 µl แล้ว spot ลงบน TLC plate

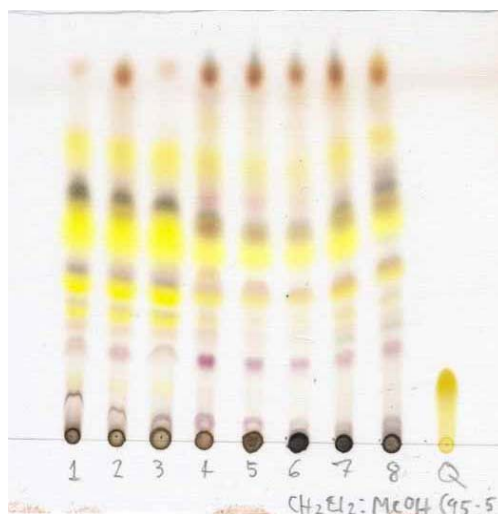
ผลการทดลอง

1. ปริมาณสารสกัดและน้ำมันที่ได้จาก waste ส่วนต่างๆของโรงงานผลิตน้ำส้มแสดงในตารางที่ III-1

ตารางที่ III-1 ปริมาณสารสกัดเบื้องต้น และน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากกาก และน้ำทิ้ง

ตัวอย่าง	น้ำมันหอมระเหย		สารสกัดที่ได้จากการ partition		สารสกัดที่ได้หลังจากการละลาย ตะกอน ethyl acetate soluble ออก		สารสกัดที่ได้จากการหมัก	
	ปริมาณ (ml)	Yield (% v/v)	ปริมาณ (g)	Yield (% w/v)	ปริมาณ (g)	Yield (% w/v)	ปริมาณ (g)	Yield (% w/w)
กากหน้าเครื่อง (1)							28.07	0.62
กากหลังเครื่อง (2)	-		-		-		12.87	0.64
น้ำคั้นเปลือกหลังเครื่อง (3)	10	1	1.32	0.132	14.24	1.42		-
น้ำสายยางหน้าเครื่อง (4)	7.8	0.78	1.41	0.141	2.69	0.27		-
น้ำเปลือก-เพลจาก screw conveyer (5)	-		0.61	0.061	3.74	0.37		-

2. การตรวจสอบด้วย TLC พบว่า ในสารสกัดมี flavonoid หลายชนิดในทุกส่วน และที่มีมากคือสารสกัด ethylacetate กากหลังเครื่อง (รูปที่ III-2)



รูปที่ III-2 TLC pattern ของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของกากส้ม

Lane 1: EtOAc partition น้ำเปลือก 3B, 2: EtOAc partition น้ำหน้าเครื่อง 4B, 3: EtOAc partition น้ำหลังเครื่อง 5B, 4: ตะกอนจากน้ำเปลือกที่ละลายใน EtOAc 3C, 5: ตะกอนจากน้ำหน้าเครื่องที่ละลายใน EtOAc 4C, 6: ตะกอนจากน้ำหลังเครื่องที่ละลายใน EtOAc 5C, 7: สารสกัด EtOAc จากกากหน้าเครื่อง 1A, 8: สารสกัด EtOAc กากหลังเครื่อง 2A, Q: Quercetin

สรุปการศึกษาเบื้องต้นได้ดังนี้

1. เปลือกหลังเครื่อง (2) จะยังมีทั้งน้ำมันหอมระเหย และ flavonoids อยู่จำนวนมาก
2. จากการนำเปลือกหลังเครื่องไปคั้น (3) นำมา centrifuge แยก oil ออกได้ 1%
3. ในส่วนของน้ำที่รั่วออกมาหน้าเครื่อง (4) ก็ยังคงมี oil อยู่ 0.78%
4. กากหน้าเครื่อง นำไปตรวจดูเบื้องต้นพบว่ามี flavonoids และน้ำมันหอมระเหยอยู่เช่นกัน

จากผลการทดลองพบว่าเปลือกส้มเป็นวัตถุดิบที่ดีสำหรับน้ำมัน และ flavonoids มาใช้ แต่ควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมหรือพัฒนาวิธีสกัด จากการประชุมร่วมครั้งที่ 2 ผู้บริหาร Tipco กลับสนใจเรื่องสับปะรด โดยจะทำจดหมายจากสมาคมผู้ผลิตสับปะรดกระป๋อง ส่วนเรื่องน้ำมันจากกากส้มจะไปทดลองเอง

เอกสารอ้างอิง

1. Goodrich R.M. and Braddock R.J. Major by products of the Florida citrus processing industry. FSHN05-22. 2006 ; p1-4.

II. สรุปข้อมูลการวิจัยเรื่อง **Antimicrobial compounds** จาก ***Bacillus subtilis*** ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืช

ในกระบวนการ metabolism ของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มีการผลิต secondary metabolite ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพหลายกลุ่มด้วยกันตัวอย่างเช่นสารในกลุ่ม antibiotics และ กลุ่ม polypeptides

Antibiotics จาก ***Bacillus subtilis***

เป็นสารกลุ่ม organic compounds ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพอื่นที่ความเข้มข้นต่ำ ตัวอย่าง antibiotic จาก *B. subtilis* ได้แก่ diffidicin และ oxydiffidicin, zwittermicin-A (Wilson, Flor et al. 1987), และ kanosamine (Milner, Silo-Suh et al. 1996).

Antimicrobial peptides จาก ***Bacillus subtilis***

Peptide หรือ polypeptide ที่สร้างขึ้นในเซลล์ ของ *B. subtilis* และ secrete สู่อากาศแวดล้อม เพื่อช่วยในการย่อยสลายสารอาหารที่มีในสิ่งแวดล้อม รวมทั้งยับยั้งจุลชีพอื่นที่จะมาแย่งสารอาหารในการเจริญเติบโตในสภาวะแวดล้อมนั้นๆ Antimicrobial peptides ที่พบ แบ่งออกเป็นสองกลุ่มคือ Antimicrobial lipopeptide และ Other compounds and polypeptides

1. Antimicrobial lipopeptide

Lipopeptide เป็น amphiphilic molecule ในรูป cyclic peptide ขนาดเล็ก (7-12 amino acid) ที่มีโมเลกุลของ lipid chain เป็นองค์ประกอบเนื่องจากลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลของ lipopeptide เป็นวงปิดจึงทำให้ทนต่อความร้อนและ extreme pH ส่วนใหญ่สารกลุ่ม lipopeptide สร้างขึ้นโดยแบคทีเรียเพื่อช่วยลดแรงตึงผิว (microbial surfactant หรือ biosurfactant) ระหว่างน้ำและอากาศ หรือในสภาวะที่ media เป็นชั้นที่ประกอบไปด้วย น้ำและน้ำมัน เพื่อให้สามารถนำน้ำมันนั้นมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโต (Singh and Cameotra 2004) มีการนำสารกลุ่ม lipopeptide จาก *B. subtilis* มาใช้ประโยชน์ในแง่ของ pollution remediation, ช่วยในการ stabilize emulsion และช่วยในการละลายสารปนเปื้อนที่ไม่ละลายน้ำ นอกจากประโยชน์ดังกล่าว lipopeptide เหล่านี้ยังมีคุณสมบัติต้านแบคทีเรีย และต้านเชื้อราอีกด้วย จากคุณสมบัติต้านเชื้อราได้มีการนำ lipopeptide มาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการป้องกันและควบคุมโรคพืช Antimicrobial lipopeptide ที่พบใน *B. subtilis* แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ (Singh and Cameotra 2004) ดังนี้ Surfactin, Iturin, และ Fengycin family

1.1 Surfactin family

สร้างขึ้นโดย *B. subtilis* เป็น biosurfactant ที่มีคุณสมบัติต้านจุลชีพที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ surfactin A, B และ C (Singh and Cameotra 2004) ซึ่งแตกต่างกันที่ amino acid sequence เป็น cyclic polypeptide ประกอบไปด้วย 7 amino acid มี β -hydroxy fatty

acid เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล ความยาวของ fatty acid chain จะอยู่ระหว่าง C-13 ถึง C-16 (Toure, Ongena et al. 2004) surfactins นอกจากจะมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อราแล้วยังยับยั้ง การเกิด fibrin clotting (Lim, Park et al. 2005), ชักนำการสร้าง ion channels ใน lipid bilayer membrane, ยับยั้ง cAMP (Sheppard, Jumarie et al. 1991), ยับยั้ง phospholipase A2 จากเกล็ดเลือดและม้าม (Kim, Park et al. 2006), ยับยั้งไวรัส (Kracht, Rokos et al. 1999) และเนื้องอก (Kim, Kim et al. 2007) และยังมีฤทธิ์เป็น anti-mycoplasma อีกด้วย (Vollenbroich, Pauli et al. 1997)

1.2 Iturin family

Iturins มีลักษณะเป็น cyclic peptide ประกอบด้วย 7-8 amino acid และมี β -amino fatty acid เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล ความยาวของ fatty acid chain จะอยู่ระหว่าง C-14 ถึง C-17 (Singh and Cameotra 2004) Iturins เป็น biosurfactant ที่มีทั้งคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา Iturin A เป็น lipopeptide ยับยั้งเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยในเซลล์ยีสต์ iturin A จะทำลายเยื่อหุ้มนิวเคลียสโดยการสร้าง vesicle ขนาดเล็กและทำให้เกิดการจับตัวกันเองขององค์ประกอบภายในชั้นของ membrane และ Iturins จะไปเพิ่ม electrical conductance ให้แก่ membrane ทำให้ membrane เป็นรูพรุนซึ่งทำให้เซลล์ pathogen ตายในที่สุด (Maget-Dana and Peypoux 1994) สมาชิกตัวอื่นๆใน iturin family ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพเช่น bacillomycin D (Tenoux, Besson et al. 1991) และ bacillomycin Lc (Eshita, Roberto et al. 1995)

1.3 Fengycin family

Biosurfactant cyclic peptide อีกชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์แรงในการยับยั้งเชื้อราเช่นเดียวกับ iturins, Fengycin เป็น lipopeptide ที่ประกอบไปด้วย 10 amino acid และเชื่อมต่อกับ β -hydroxy fatty acid ความยาวของ fatty acid chain จะอยู่ระหว่าง C-14 ถึง C-18 (Singh and Cameotra 2004)

Iturin A: NYNQPNs
 Iturin C: DYNQPNs
 Mycosubtilin: NYNQPSN
 Bacillomycin D: NYNPEST
 Bacillomycin F: NYNQPNT
 Bacillomycin Lc: NYNSEST
 Bacillomycin L: DYNSQST

 Mixirins: PNSQNYN
 Surfactin: ELLVDLL

 Fengycin A: EOYTEAPQYI
 Fengycin B: EOYTEVPQYI

รูปที่ III-3 Amino acid sequence ของ lipopeptide

ตารางที่ III-2 Biocontrol โดยใช้ lipopeptide จาก *Bacillus subtilis*

O r g a n i s m	สารออกฤทธิ์	Pathogen control	Reference
<i>B. subtilis</i> strain GA1	Fengycin, Iturin, Surfactin	<i>Botrytis cinerea</i> (apple grey mould disease)	[4]
<i>B. subtilis</i>	Volatile compounds	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Pythium ultimum</i>	[14]
<i>B. subtilis</i>	Iturins	<i>Peronophythora litchi</i> (post harvested control)	[15]
<i>B. subtilis</i>	Iturins	<i>Rhizotocnia solani</i>	[16]
<i>Bacillus subtilis</i> RB14-C	Surfactin, IturinA	damping-off of tomato caused by <i>Rhizoctonia solani</i>	[17]
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> DSM 10	Surfactin	plant pathogenic fungi <i>Fusarium</i> and <i>Rhizoctonia</i>	[18]
<i>B. subtilis</i> DSM 1088	Iturin A, B, C	<i>Sclerotinia</i> and <i>Rhizoctonia</i> root rot of soya bean	[18]
<i>B. subtilis</i> Bs2500 and Bs2508	Surfactin, Fengycin	tomato plants against Botrytis disease	[19]
<i>B. subtilis</i> R14	Surfactin, Iturin	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (causal agent of crucifers black rot)	[20]
<i>B. subtilis</i> RB14-CS	Iturin A	<i>Rhizoctonia solani</i> , damping-off of tomato	[21]
<i>Bacillus</i> sp. CY22	Iturin A	<i>Rhizoctonia solani</i>	[22]
<i>B. subtilis</i> strain KS03	Iturin A	anthracnose disease fungus <i>Gloeosporium gloeosporioides</i>	[23]
<i>B. subtilis</i> strain M4	Fengycin	damping-off of bean seedlings caused by <i>Pythium ultimum</i> and against gray mold of apple in post-harvest disease	[24]
	Surfactin, Iturin	<i>Colletotrichum lagenarium</i> and <i>Pythium aphanidermatum</i> on cucumber and tomato	[25]
<i>B. subtilis</i> BBG100	Mycosubtilin	<i>Pythium aphanidermatum</i> infection of tomato seedlings	[26]
<i>B. subtilis</i> AP-01	-	เชื้อรา <i>Volvariella volvacea</i> ซึ่งยับยั้งการเจริญเติบโตของเห็ดฟาง	[27]
<i>B. subtilis</i> strain 6051	surfactin	infection of <i>Arabidopsis</i> Roots by <i>Pseudomonas syringae</i> the bacterial pathogen <i>Pseudomonas syringae</i> of tomato	[28]

2. Other compounds and polypeptides

Bacisubin

เป็น antifungal peptide จาก *B. subtilis* strain B-916 สามารถยับยั้งการเจริญของ microglial ในเชื้อรา *Maganaporth griseae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria oleracea*, *A. brassicae*, และ *Botrytis cinerea* นอกจากนี้ Bacisubin ยังมี ribonuclease activity และ hemagglutinating activity ด้วย (Liu, Chen et al. 2007)

Macrolactin

ได้จาก *B. subtilis* strain DSM 16696 Macrolactin A มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่เป็นกลุ่มดื้อยาเช่น methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci และ small colony variant *Burkholderia cepacia* ในพวก staphylococci และ enterococci พบการผิดปกติของการสร้าง septum เมื่อ treat ด้วย macrolactin A ซึ่งทำให้การแบ่งเซลล์ถูกยับยั้ง (Romero-Tabarez, Jansen et al. 2006)

Bacilysocin

อยู่ในกลุ่ม phospholipid antibiotic ที่สร้างโดย *B. subtilis* strain 168 พบว่า bacilysocin มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย (Tamehiro, Okamoto-Hosoya et al. 2002)

กลไกการต้านจุลินทรีย์ของ antimicrobial peptides

มีการเสนอกลไกการออกฤทธิ์สองกลไกขึ้นอยู่กับชนิดของ antimicrobial peptides ซึ่งลักษณะของกลไกการออกฤทธิ์ยังสามารถนำมาใช้แยกประเภทของ antimicrobial peptide ได้อีกด้วย

1. Lytic peptide ออกฤทธิ์โดยการทำให้เซลล์แตกด้วย mechanism ต่างๆกันไปเช่น การทำลาย bilayer structure ของ membrane, การทำให้ membrane เป็นรูพรุน ซึ่งจะทำให้เซลล์สูญเสีย permeability ทำให้สารต่างๆเข้าออกเซลล์ได้อย่างอิสระ และทำให้เซลล์แตกในที่สุด

2. Cell wall synthesis interference ออกฤทธิ์โดยการรบกวนการสังเคราะห์สารต้นตอ หรือรบกวนกระบวนการสร้างผนังเซลล์ ทำให้ pathogen ไม่สามารถแบ่งเซลล์ต่อไปได้ และตายในที่สุดตัวอย่างเช่น การไปยับยั้งเอนไซม์ chitin synthase

จากคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้น antimicrobial peptides จาก *B. subtilis* น่าจะเป็นแหล่งของสารที่เป็น biocontrol ในการควบคุมโรคพืชนอกเหนือจากคุณสมบัติที่กล่าวมาแล้ว lipopeptide ยังสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ, ความเป็นพิษต่ำ, คงตัวที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำมากๆ และ คงตัวที่ extreme pH นอกเหนือจากนี้ยังสามารถผลิตได้จากของเสียจากอุตสาหกรรมที่หาได้ง่ายและมีราคาถูกซึ่งจะสามารถเพิ่มมูลค่าได้อีกทางหนึ่ง

เอกสารอ้างอิง

- [1] Wilson KE, Flor JE, Schwartz RE, Joshua H, Smith JL, Pelak BA, et al. Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. II. Isolation and physico-chemical characterization. *The Journal of antibiotics*. 1987 Dec;40(12):1682-91.
- [2] Milner JL, Silo-Suh L, Lee JC, He H, Clardy J, Handelsman J. Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and environmental microbiology*. 1996 Aug;62(8):3061-5.
- [3] Singh P, Cameotra SS. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in biotechnology*. 2004 Mar;22(3):142-6.
- [4] Toure Y, Ongena M, Jacques P, Guiro A, Thonart P. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of applied microbiology*. 2004;96(5):1151-60.
- [5] Lim JH, Park BK, Kim MS, Hwang MH, Rhee MH, Park SC, et al. The anti-thrombotic activity of surfactins. *Journal of veterinary science (Suwon-si, Korea)*. 2005 Dec;6(4):353-5.
- [6] Sheppard JD, Jumarie C, Cooper DG, Laprade R. Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membranes. *Biochimica et biophysica acta*. 1991 Apr 26;1064(1):13-23.
- [7] Kim SD, Park SK, Cho JY, Park HJ, Lim JH, Yun HI, et al. Surfactin C inhibits platelet aggregation. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2006 Jun;58(6):867-70.
- [8] Kracht M, Rokos H, Ozel M, Kowall M, Pauli G, Vater J. Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives. *The Journal of antibiotics*. 1999 Jul;52(7):613-9.
- [9] Kim SY, Kim JY, Kim SH, Bae HJ, Yi H, Yoon SH, et al. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays anti-proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. *FEBS letters*. 2007 Mar 6;581(5):865-71.
- [10] Vollenbroich D, Pauli G, Ozel M, Vater J. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Applied and environmental microbiology*. 1997 Jan;63(1):44-9.
- [11] Maget-Dana R, Peypoux F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology*. 1994 Feb 28;87(1-3):151-74.
- [12] Tenoux I, Besson F, Michel G. Studies on the antifungal antibiotics: bacillomycin D and bacillomycin D methylester. *Microbios*. 1991;67(272-273):187-93.

- [13] Eshita SM, Roberto NH, Beale JM, Mamiya BM, Workman RF. Bacillomycin Lc, a new antibiotic of the iturin group: isolations, structures, and antifungal activities of the congeners. *The Journal of antibiotics*. 1995 Nov;48(11):1240-7.
- [14] Fiddaman PJ, Rossall S. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *The Journal of applied bacteriology*. 1993 Feb;74(2):119-26.
- [15] Jiang YM, Zhu XR, Li YB. Postharvest Control of Litchi Fruit Rot by *Bacillus subtilis*. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 2001;34:430-6.
- [16] Mizumoto S, Hirai M, Shoda M. Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*. 2006 Oct;72(5):869-75.
- [17] Kondoh M, Hirai M, Shoda M. Integrated biological and chemical control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using *Bacillus subtilis* RB14-C and flutolanil. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2001;91(2):173-7.
- [18] Kim PI, Bai H, Bai D, Chae H, Chung S, Kim Y, et al. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *Journal of applied microbiology*. 2004;97(5):942-9.
- [19] Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental microbiology*. 2007 Apr;9(4):1084-90.
- [20] Asaka O, Shoda M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and environmental microbiology*. 1996 Nov;62(11):4081-5.
- [21] Maneerat S, Bamba T, Harada K, Kobayashi A, Yamada H, Kawai F. A novel crude oil emulsifier excreted in the culture supernatant of a marine bacterium, *Myroides* sp. strain SM1. *Applied microbiology and biotechnology*. 2006 Mar;70(2):254-9.
- [22] Cho SJ, Lim WJ, Hong SY, Park SR, Yun HD. Endophytic colonization of balloon flower by antifungal strain *Bacillus* sp. CY22. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2003 Oct;67(10):2132-8.
- [23] Cho SJ, Lee SK, Cha BJ, Kim YH, Shin KS. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. *FEMS microbiology letters*. 2003 Jun 6;223(1):47-51.
- [24] Lee YK, Kim SB, Park CS, Kim JG, Oh HM, Yoon BD, et al. Chromosomal integration of *sfp* gene in *Bacillus subtilis* to enhance bioavailability of hydrophobic liquids. *Applied microbiology and biotechnology*. 2005 Jun;67(6):789-94.

- [25] Ongena M, Duby F, Jourdan E, Beaudry T, Jadin V, Dommes J, et al. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. *Applied microbiology and biotechnology*. 2005 Jun;67(5):692-8.
- [26] Leclere V, Bechet M, Adam A, Guez JS, Wathelet B, Ongena M, et al. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and environmental microbiology*. 2005 Aug;71(8):4577-84.
- [27] Ye XY, Ng TB. A novel and potent ribonuclease from fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus pulmonarius*. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002 May 3;293(2):857-61.
- [28] Bais HP, Fall R, Vivanco JM. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant physiology*. 2004 Jan;134(1):307-19.
- [29] Liu Y, Chen Z, Ng TB, Zhang J, Zhou M, Song F, et al. Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916. *Peptides*. 2007 Mar;28(3):553-9.
- [30] Romero-Tabarez M, Jansen R, Sylla M, Lunsdorf H, Haussler S, Santosa DA, et al. 7-O-malonyl macrolactin A, a new macrolactin antibiotic from *Bacillus subtilis* active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci, and a small-colony variant of *Burkholderia cepacia*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006 May;50(5):1701-9.
- [31] Tamehiro N, Okamoto-Hosoya Y, Okamoto S, Ubukata M, Hamada M, Naganawa H, et al. Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002 Feb;46(2):315-20.