



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การสร้างมูลค่าเพิ่มของผลพลอยได้จากอ้อย
โดยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ”

โดย

รศ.ดร.ภคมน จิตประเสริฐ

เดือนมีนาคม ปี 2563

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ“การสร้างมูลค่าเพิ่มของผลพลอยได้จากอ้อย โดยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ”

คณะผู้วิจัย สังกัด

- 1 ดร.ประกิต สุขไย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- 2 รศ.ดร. มังกร โรจน์ประภากร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- 3 รศ.ดร.ภคมน จิตประเสริฐ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
4. ดร. กิตติพงษ์ รัตนภรณ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชุดโครงการวิจัยด้านอ้อยและน้ำตาล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการแห่งชาติ (วช.)

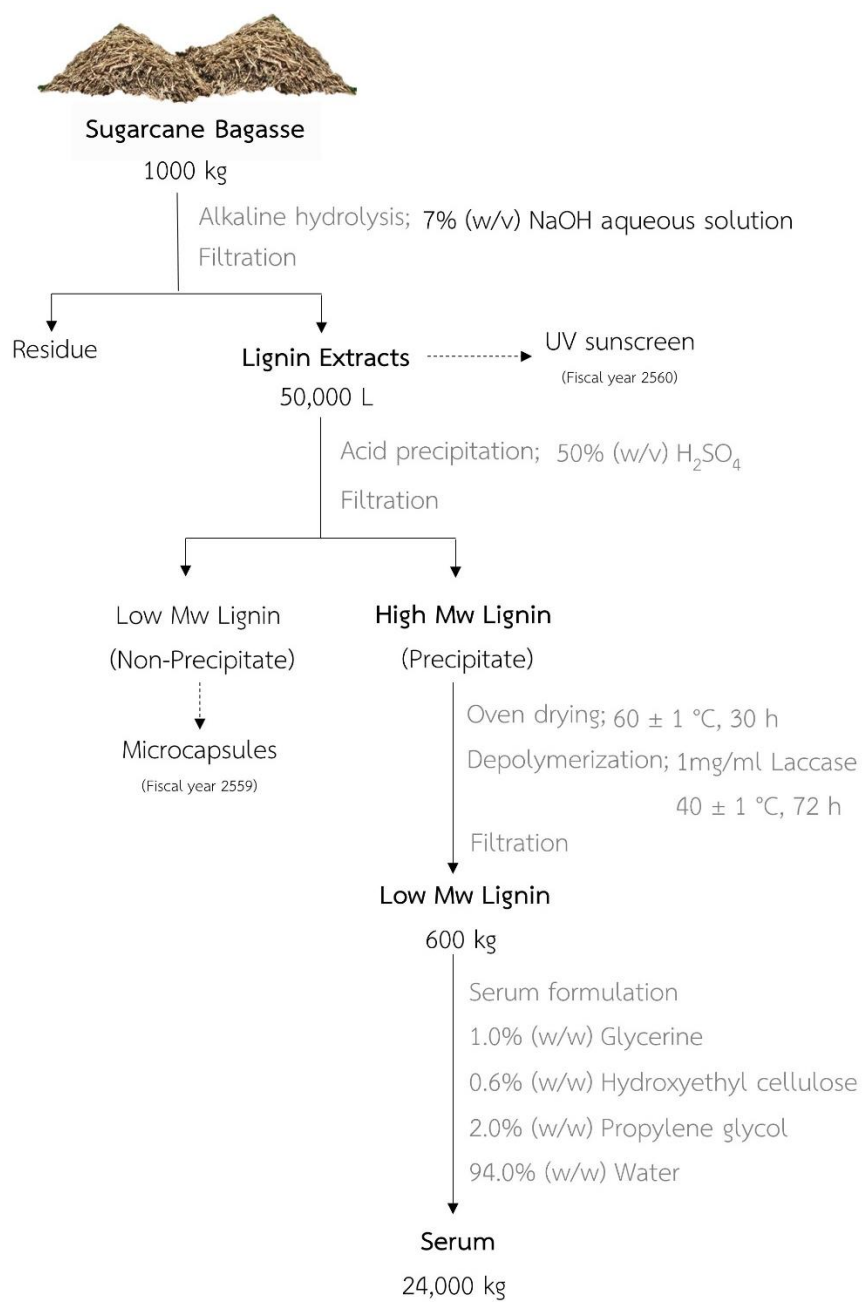
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

บทสรุปผู้บริหาร

ผลิตภัณฑ์เซรัมบำรุงผิวจัดเป็นสินค้าที่มีอัตราการเจริญเติบโตและขยายตัวอย่างต่อเนื่อง มีกลุ่มผู้บริโภคทั้งเพศชาย เพศหญิง ในทุกๆ ช่วงวัย โดยตลาดของผลิตภัณฑ์เซรัมในปัจจุบันให้ความสำคัญในเรื่องสารสกัดจากธรรมชาติ ส่งผลให้เกิดการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ ที่ใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติ จึงเป็นที่มาของการใช้ประโยชน์จากส่วนของลิกนินที่สกัดได้จากขานอ้อยซึ่งเป็นส่วนเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมน้ำตาล และมีปริมาณเหลือทิ้งสูงถึง 30 ล้านตันต่อปี โดยรายละเอียดโครงสร้างของลิกนิน คือ พอลิเมอร์ขนาดใหญ่ที่เชื่อมต่อกันด้วยสารประกอบฟีนอล ทั้งนี้เมื่อสลายพันธะระหว่างหน่วยย่อยจะได้สารออกฤทธิ์ที่สามารถใช้ในผลิตภัณฑ์เซรัมซึ่งมีมูลค่าทางการตลาดสูง ในส่วนการดำเนินงานของโครงการเริ่มต้นจากการสกัดลิกนินออกจากขานอ้อยด้วยตัวทำละลายต่างภายใต้สภาวะการสกัดที่เหมาะสมจากโครงการปี 2560 ที่มีประสิทธิภาพการสกัดลิกนินสูงถึงร้อยละ 76.40 ซึ่งเป็นปริมาณมากเมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่น อย่างไรก็ตามโครงสร้างของลิกนินที่สกัดได้ยังมีโมเลกุลขนาดใหญ่จึงยากต่อการซึมเข้าสู่ผิวหนังและการออกฤทธิ์เพื่อบำรุงผิวหน้า

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการลดขนาดโครงสร้างลิกนินหลังสกัดด้วยระบบทางชีวภาพโดยใช้เอนไซม์แลคเคสและสารช่วยทำปฏิกิริยา (laccase-mediated system) ผลลัพธ์ที่ได้ คือ สภาวะการทำงานของเอนไซม์และสารช่วยในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม และสามารถลดขนาดของลิกนินจนได้สารสกัดที่แสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และคอลลาจีเนสสูงสุด (แผนภาพการดำเนินงานและผลลัพธ์จากงานวิจัย) โดยผลิตภัณฑ์เซรัมที่ผสมลิกนินที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ไม่ปรากฏสัญญาณของการระคายเคืองหรือผื่นแพ้บนผิวหนังของผู้ร่วมทดสอบ อย่างไรก็ตามสารสกัดลิกนินที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคสยังมีส่วนประกอบของสารประกอบจำพวกแอลดีไฮด์ หรือคีโตน ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้เพื่อการกำจัดสีผิว หรือการสังเคราะห์พอลิเมอร์ได้อีกด้วย ในส่วนการลงทุนเพื่อต่อยอดการผลิตเซรัมในระดับอุตสาหกรรม พบว่า ค่าใช้จ่ายส่วนใหญ่เป็นค่าเอนไซม์สำเร็จรูปซึ่งต้นทุนในส่วนนี้สามารถลดลงได้หากมีการเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์แลคเคสทดแทนเอนไซม์สำเร็จรูป

แผนภาพการดำเนินงานและผลลัพธ์จากงานวิจัย



บทคัดย่อ

ลิกนินจัดเป็นพอลิเมอร์จากธรรมชาติที่มีปริมาณมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลสและมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางดูแลผิวอย่างเข้มข้น งานวิจัยเริ่มต้นการสกัดลิกนินออกจากขานอ้อยด้วยตัวทำละลายต่างภายใต้สภาวะการสกัดที่เหมาะสมซึ่งมีประสิทธิภาพการสกัดลิกนินสูงถึงร้อยละ 76.40 แต่จากโครงสร้างของลิกนินที่ได้ยังมีขนาดใหญ่และซับซ้อน ดังนั้นสารสกัดลิกนินจากต่างจึงถูกนำมาลดขนาดโครงสร้างด้วยระบบทางชีวภาพโดยใช้เอนไซม์แลคเคสและสารช่วยในการทำปฏิกิริยา (laccase-mediated system) สำหรับสภาวะการแตกโครงสร้างลิกนินที่เหมาะสมซึ่งทำให้ได้สารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คือ การใช้เอนไซม์แลคเคสความเข้มข้น 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร พร้อมเติมสารช่วยในการทำปฏิกิริยา ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ ปริมาตรร้อยละ 0.01% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ผลการวิเคราะห์สารสกัดที่ได้ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography, HPLC) และเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) พบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของลิกนินในระหว่างกระบวนการออกซิเดชันของเอนไซม์แลคเคสและตัวช่วย โดยสารสกัดมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เท่ากับ 9.98 มิลลิกรัมวิตามินซีต่อกรัมสารสกัด ซึ่งน้อยกว่าสารสกัดลิกนินต่างหลังการทำบริสุทธิ์ด้วยถุงเลือกผ่านที่เป็นตัวอย่างจากโครงการวิจัยปี 2560 ที่มีค่าเท่ากับ 124.79 มิลลิกรัมวิตามินซีต่อกรัมสารสกัด นอกจากนี้ผลการตรวจสอบทางผิวหนังของผลิตภัณฑ์เข้มข้นไม่ปรากฏสัญญาณของการระคายเคืองหรือผื่นแพ้ ผลการทดลองทั้งหมดจึงสนับสนุนการเพิ่มมูลค่าของสารสกัดลิกนินจากขานอ้อยในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

Abstract

Lignin is the second-most abundant natural polymer next to cellulose that can potentially be used in cosmetic care products as a natural face serum. This study showed that alkaline extraction could recover 76.40% of the lignin from sugarcane bagasse. However, owing to its complex structure and high molecular weight fragments, the extracted alkali lignin was further subjected to biotransformation using a laccase-mediated system. After the depolymerization reaction under the optimal condition (0.1 U/ml laccase, 0.4 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS), and 0.01% NaHSO₃ at 40 °C for 3 days). the depolymerized extract showed the highest total phenolic content and antioxidant capacity. The high-performance liquid chromatography (HPLC) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis revealed the structural alterations of the extracted alkali lignin during the oxidation process. The tyrosinase inhibitory activity of the depolymerized extract was 9.98 mg vitamin C/ g depolymerized extract which was lower than that of the dialyzed extract (124.79 mg vitamin C/ g dialysed extract). The dermatological test of all samples did not show any signs of skin irritation and allergic risks. These results suggest value-added applications of lignin extracted from sugarcane bagasse in cosmetic industries.

สารบัญ

รายการ	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	
บทคัดย่อ (ไทย-อังกฤษ)	
สารบัญภาพ	ก
สารบัญตาราง	ค
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	16
บทที่ 4 ผลการศึกษาและอภิปรายผล	23
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	39

สารบัญภาพ

ภาพที่

รายการ

หน้า

1	สารตั้งต้น (precursors) ของการสังเคราะห์ลิกลิน ได้แก่ coniferyl alcohol, sinapyl alcohol และ <i>p</i> -coumaryl alcohol	5
2	โครงสร้างลิกลิน	5
3	กลไกการทำงานของสารช่วยในการทำปฏิกิริยา (mediator) ที่ช่วยการทำงานของเอนไซม์แลคเคส	8
4	โครงสร้างของผิวหนัง และองค์ประกอบชั้นป้องกันผิวชั้นหนังกำพร้า (Epidermis)	13
5	วิถีชีวสังเคราะห์ของเมลานิน (melanin)	14
6	กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสที่พีเอชต่างๆ	24
7	กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสที่อุณหภูมิต่างๆ	25
8	ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (ก) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (ข) ของสารสกัดลิกลินหลังย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส (0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ร่วมกับการแปรผันความเข้มข้นของ ABTS ที่ 0, 0.2 และ 0.4 มิลลิโมล ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที	27
9	ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (ก) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (ข) ของสารสกัดลิกลินหลังย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส (0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และ ABTS (0.4 มิลลิโมล) ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ร้อยละ 0, 0.002, 0.01 และ 0.02 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที	28
10	ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (ก) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (ข) ของสารสกัดลิกลินหลังย่อยด้วยกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่ 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ร่วมกับสารละลาย ABTS (0.4 มิลลิโมล) และโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ (ร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที	29

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	รายการ	หน้า
11	สารประกอบฟีนอลในผงสารสกัดลิกนินแบบต่างๆ; สารสกัดลิกนินควบคุมที่ไม่ย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส (Lignin); สารสกัดลิกนินที่ย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส (Lignin-L); สารสกัดลิกนินที่ย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส และมีการเติม ABTS (Lignin-L-A) และสารสกัดลิกนินที่ย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส และมีการเติม ABTS ร่วมกับโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Lignin-L-AN)	30
12	โครงสร้างทางเคมีของสารสกัดลิกนินแบบต่างๆ; สารสกัดลิกนินควบคุมที่ไม่ย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส (Lignin); สารสกัดลิกนินที่ย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส (Lignin-L); สารสกัดลิกนินที่ย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส และมีการเติม ABTS (Lignin-L-A) และสารสกัดลิกนินที่ย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส และมีการเติม ABTS ร่วมกับโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Lignin-L-AN)	32
13	ร้อยละกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ (ก) สารสกัดลิกนินหลังการทำบริสุทธิ์ด้วยถุงเลือกผ่าน และ (ข) สารสกัด Lignin-L-AN	33
14	แรงบิด (torque) และความหนืดของเซรัมควบคุมที่แปรผันความเข้มข้นของไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (hydroxyethyl cellulose, HEC) ที่ร้อยละ 0.40, 0.60 และ 0.80 โดยน้ำหนัก	35
15	ผลการทดสอบความระคายเคือง	36
16	แผนภาพการดำเนินงานและผลลัพธ์ที่ได้จากงานวิจัย	37

สารบัญตาราง

ตารางที่	รายการ	หน้า
1	ลักษณะผื่นแดงและระดับการให้คะแนนผลการทดสอบภูมิแพ้ผิวหนัง (patch tech) ของ International contact dermatitis research group (ICDRG)	22
2	ร้อยละกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนสของสารสกัดลิกนินหลังผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยถุงเลือกผ่าน และสารสกัด Lignin-L-AN	34
3	สีของเซรัมควบคุม เซรัมที่เติมสารสกัดลิกนินหลังการสกัดด้วยต่างและทำบริสุทธิ์ด้วยถุงเลือกผ่าน และเซรัมที่เติมสารสกัดลิกนินที่ย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส	35
4	ต้นทุนการผลิตเซรัมจากสารสกัดลิกนินที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคสในระดับห้องปฏิบัติการ	38

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ

ผลิตภัณฑ์เสริมสำหรับหน้าเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิวหน้าที่ให้ทั้งผลลัพธ์เรื่องความชุ่มชื้น พร้อมทั้งมีส่วนประกอบของสารออกฤทธิ์ในปริมาณเข้มข้น และสามารถซึมผ่านผิวหนังได้ดี จึงสามารถแก้ปัญหาเฉพาะจุดบนใบหน้าในด้านต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการคาดการณ์มูลค่าทางการตลาดของเซรัมในพ.ศ. 2563 อาจมีมากกว่า 6,000 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ฯ และมีอัตราการเติบโตเฉลี่ยประมาณร้อยละ 4 ต่อปีในช่วง พ.ศ.2559-2563 อีกทั้งแนวโน้มของลักษณะผลิตภัณฑ์เซรัมที่เป็นที่ต้องการในอนาคต คือ ผลิตภัณฑ์ที่เป็นนวัตกรรมใช้เทคโนโลยีขั้นสูงและมีองค์ประกอบที่มาจากธรรมชาติ

จากความต้องการผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของผู้บริโภคจึงเป็นช่องทางหนึ่งของการใช้ประโยชน์จากชานอ้อยที่เป็นส่วนเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมน้ำตาล ซึ่งมีปริมาณสูงถึง 30 ล้านตัน/ปี โดยโครงสร้างของชานอ้อยจัดเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในส่วนของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมีการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ด้านการแพทย์ ความงาม และอาหารฟังก์ชันซึ่งมีมูลค่าสูงเป็นจำนวนมาก ในขณะที่ลิกนินที่มีปริมาณประมาณร้อยละ 24 ยังมีการสร้างมูลค่าเพิ่มที่ไม่มากนักงานวิจัยนี้จึงสนใจนำลิกนินมาใช้ประโยชน์ ซึ่งสอดคล้องกับนโยบายของประเทศไทยยุค 4.0 ที่เน้นการพัฒนา ด้านเศรษฐกิจฐานเกษตรกรรม สนับสนุนภาคการเกษตรและเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อสร้าง Bioeconomy เพิ่มมูลค่าให้กับสินค้าเกษตรสู่การสร้างผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่มีมูลค่าสูงและหลากหลาย

เนื่องด้วยลิกนินเป็นพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนที่ได้จากการสังเคราะห์โดยใช้สารตั้งต้น phenyl-propanoid 3 ชนิด หลัก ๆ ได้แก่ *p*-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol หน่วยย่อยเหล่านี้เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -O-4 aryl ether การสลายพันธะระหว่างหน่วยย่อยของลิกนินอย่างสมบูรณ์ทำให้ได้สารประกอบฟีนอลที่สามารถใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์เวชสำอางได้จากสมบัติของสารประกอบฟีนอลที่ดีต่อผิวหนังในด้านต่าง ๆ เช่น การต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคผิวหนัง การต้านอนุมูลอิสระ และการทำให้ผิวหนังกระจ่างใส

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้ประโยชน์ลิกนินในชานอ้อยสำหรับการผลิตเวชภัณฑ์นาโนเซรัมสำหรับหน้า การสกัดลิกนินและแตกโครงสร้างของลิกนินใช้วิธี Alkaline hydrolysis ร่วมกับ Enzymatic hydrolysis เพื่อให้ได้สกัดลิกนินที่มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักที่ทำให้ผิวหนังมีปัญหา เพิ่มความกระจ่างใส และเพื่อการลดความเสื่อมของคอลลาเจน จากนั้นเป็นการผลิตเซรัม

สำหรับหน้าที่ประกอบด้วยสารสกัดลิกลิน และทดสอบคุณสมบัติ ทั้งนี้ผู้วิจัยคาดหวังว่าเซรัมที่ได้จากงานวิจัยนี้จะมีคุณสมบัติที่ดีและให้ประโยชน์กับผู้ใช้ได้จริง จนสามารถนำไปต่อยอดเพื่อผลิตในระดับอุตสาหกรรม และท้ายที่สุดสามารถกระตุ้นเศรษฐกิจของ'ประกอบไปด้วยสารสกัดลิกลิน

1. การประเมินต้นทุนการผลิตเซรัมจากสารสกัดลิกลินสำหรับหน้า

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ขานอ้อยที่ใช้ในการทดลองได้จากโรงงานเกษตรไทย อินเตอร์ เนชั่นแนล ชูการ์ คอร์ปอเรชั่น
2. กระบวนการเตรียมตัวอย่างลิกลินมีรายละเอียดตามวิธีการดำเนินการวิจัยในบทที่ 3
3. กระบวนการสกัดลิกลินขั้นแรก คือ การใช้สารละลาย NaOH ร่วมกับอุณหภูมิ และความดันสูง ซึ่งรายละเอียดตามวิธีการดำเนินการวิจัยในบทที่ 3
4. กระบวนการสกัดลิกลินขั้นที่สอง คือ การใช้แลคเคสที่มีการแปรผัน pH อุณหภูมิ อัตราส่วนของแลคเคสต่อปริมาณลิกลินที่เตรียมได้จากขั้นแรก รวมถึงความเข้มข้นของสารช่วยทำปฏิกิริยาและสารที่ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบฟีนอล ดังรายละเอียดตามวิธีการดำเนินการวิจัยในบทที่ 3
5. กระบวนการเตรียมเซรัมจากสารสกัดลิกลินมีรายละเอียดตามวิธีการดำเนินการวิจัยในบทที่ 3

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

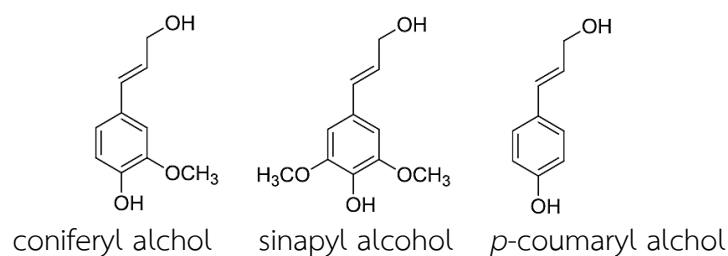
1. การต่อยอดกระบวนการผลิตเซรัมในระดับอุตสาหกรรมให้กับกลุ่มเป้าหมายในเบื้องต้น คือ ผู้ประกอบการผลิตน้ำตาลทราย ซึ่งส่งผลให้เกิดอุตสาหกรรมเวชสำอางใหม่ที่มีมูลค่าสูงกว่าอุตสาหกรรมน้ำตาล และอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องในปัจจุบัน เช่น อุตสาหกรรมกระดาษ และไบโอเอทานอล เป็นต้น โดยหากมีการพัฒนาและวิจัยอย่างต่อเนื่อง อาจมีความเป็นไปได้ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เซรัมกลายเป็นสินค้าส่งออกได้ในที่สุด
2. นอกจากเทคโนโลยีการผลิตเซรัมซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักโดยองค์กรแล้ว โครงการวิจัยนี้ยังได้เทคโนโลยีของการผลิตสารสกัดลิกลิน ซึ่งมีคุณสมบัติทางด้านการแพทย์ที่น่าสนใจหลายด้าน จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเฉพาะส่วนสารประกอบฟีนอลไปใช้ประโยชน์ในการสร้างผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ในกลุ่มเวชสำอาง เช่น ครีม โลชั่น และเจล หรือผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ในกลุ่มอาหารเสริมที่มีมูลค่าสูง
3. จากประโยชน์ที่ได้กล่าวมาใน 2 ข้อแรก จึงสามารถกล่าวสรุปโดยรวมได้ว่า ประโยชน์ของงานวิจัยนี้ จะทำให้เกิดอุตสาหกรรมใหม่จากการใช้ประโยชน์ลิกลินเพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ด้านการส่งเสริมสุขภาพและความงามที่มีมูลค่าสูง ก่อให้เกิดการยกระดับภาพลักษณ์และความสามารถในการแข่งขันเชิงพาณิชย์ของอุตสาหกรรมน้ำตาลของประเทศไทยในเวทีการค้าโลก

บทที่ 2 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ลิกนินจากขานอ้อย: โครงสร้างและการใช้ประโยชน์

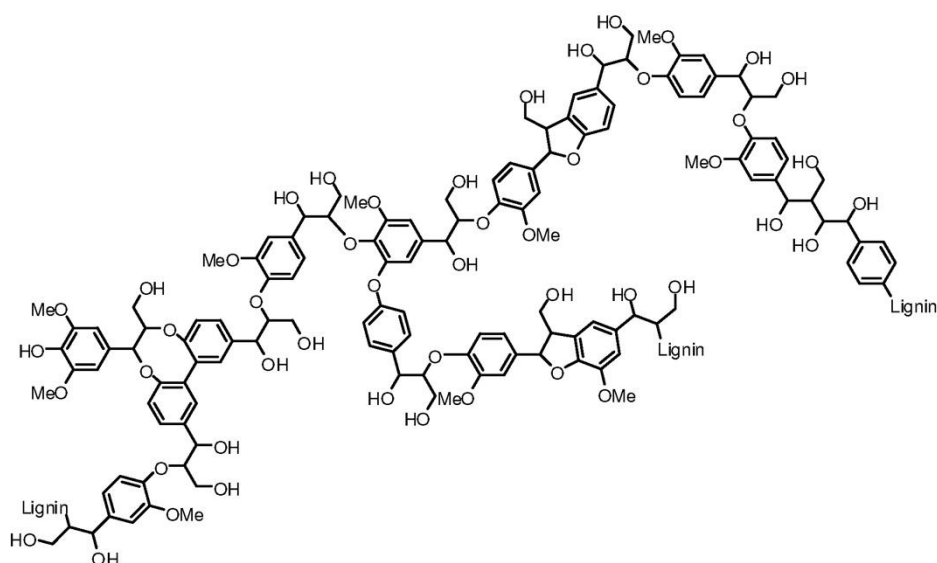
ขานอ้อยเป็นผลพลอยได้ที่สำคัญชนิดหนึ่งจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลจากอ้อย ซึ่งเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย จากการรายงานของสำนักงานอ้อยและน้ำตาลทราย (2560) พบว่าการผลิตอ้อยและน้ำตาลทรายปี 2559/60 มีการหีบอ้อยประมาณ 92.95 ล้านตัน จึงส่งผลให้มีขานอ้อยประมาณ 28 ล้านตัน โดยขานอ้อยเกือบทั้งหมด (ร้อยละ 99) ถูกนำไปใช้ผลิตพลังงานความร้อน และพลังงานไฟฟ้าเพื่อการผลิตน้ำตาลรวมทั้งเพื่อส่งขายในเชิงพาณิชย์ แต่เมื่อพิจารณาถึงโครงสร้างของขานอ้อยที่เป็นลิกโนเซลลูโลสพบว่ามีองค์ประกอบเป็นเซลลูโลสร้อยละ 42.11 ถึง 48.68 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 21.81 ถึง 33.50 และลิกนินร้อยละ 19.20 ถึง 24.60 (Arsene et al., 2013; Kaur and Uppal, 2015; Li and Ge, 2012; Saelee et al., 2016) หากนำองค์ประกอบแต่ละชนิดมาใช้ประโยชน์จะสามารถเพิ่มมูลค่าให้กับขานอ้อยได้มากขึ้น เช่น การใช้เซลลูโลสในการผลิตไบโอทานอล (Silveira et al., 2015) การใช้เฮมิเซลลูโลสในการผลิตน้ำตาลไซลิทอล (Hernández-Pérez et al., 2016) และการใช้ลิกนินในการผลิตสารออกฤทธิ์สำหรับผลิตภัณฑ์เวชสำอาง (Kai et al., 2016) ซึ่งลิกนินเป็นส่วนที่มีการศึกษาการใช้ประโยชน์น้อยที่สุด

ลิกนินเป็นวัสดุจากธรรมชาติที่พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์พืชจากจุลินทรีย์และจากภาวะเครียดที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Hendricks and Zeeman, 2009) นอกจากนั้นยังทำหน้าที่เชื่อมองค์ประกอบต่าง ๆ ของผนังเซลล์พืช (Avgerinos and Wang, 1983) หน่วยย่อยของลิกนินคือ ฟีนิลโพรเพน 3 ชนิด ซึ่งได้แก่ *p*-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol (ภาพที่ 1) แต่ละหน่วยย่อยเชื่อมกันแบบสุ่มที่ตำแหน่ง β -O-4 เป็นส่วนใหญ่ (ประมาณร้อยละ 50) และที่บริเวณอื่น ๆ เช่น α -O-4, 5-5, 4-O-5 และ β -5 เป็นต้น (Dorrestijn et al., 2000) จึงทำให้ลิกนินมีโครงสร้างซับซ้อน (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 สารตั้งต้น (precursors) ของการสังเคราะห์ลิกนิน ได้แก่ coniferyl alcohol, sinapyl alcohol และ *p*-coumaryl alcohol

ที่มา: Pu et al. (2015)



ภาพที่ 2 โครงสร้างลิกนิน

ที่มา: Bergman et al. (2011)

หน่วยย่อยของลิกนินเป็นสารออกฤทธิ์ในกลุ่มของ hydroxycinnamic acids ที่มีการรายงานถึงคุณสมบัติที่หลากหลายทางสรีรวิทยา (physiological functions) เช่น การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) การต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) การต้านจุลินทรีย์ (anti-microbial) การต้านการทำลายคอลลาเจน (anti-collagenase) และการต้านการผลิตเมลานิน (anti-melanogenic activity) และการป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ต (Qian et al., 2015; Zhang and Tsao, 2016) เป็นต้น นอกจากนี้ยังไม่เป็นพิษต่อจากร่างกายและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังชนิด Keratinocyte บริเวณชั้นหนังแท้ (Ugartondo et al., 2008) ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้จึงมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาหน่วยย่อยของลิกนินเพื่อเป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง

ซึ่งจำเป็นต้องใช้กระบวนการสกัดลิกนินและการแตกโครงสร้างที่เหมาะสมเนื่องจากส่งผลต่อทั้งปริมาณผลได้คุณภาพของสารออกฤทธิ์ รวมถึงต้นทุนการผลิตอีกด้วย

2. การเตรียมสารสกัดลิกนิน

งานวิจัยนี้ต้องสารสกัดลิกนินที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็ก ดังนั้นจึงได้เลือกใช้กระบวนการทางเคมีกายภาพ โดยการใช้สารละลายต่างร่วมกับหม้อนึ่งความดันสูง ตามด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยการใช้แลคเคสร่วมกับสารช่วยในการทำปฏิกิริยา เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการสกัดสูงสุด โดยแต่ละกระบวนการมีรายละเอียดดังนี้

2.1 การใช้สารละลายต่างร่วมกับหม้อนึ่งความดันสูง

การใช้สารละลายต่างร่วมกับหม้อนึ่งความดันในการสกัดลิกนินส่งผลให้ลิกนินแตกโครงสร้างจากการทำลายพันธะอีเทอร์ระหว่างหน่วยย่อยฟีนิลโพรเพนและพันธะเอสเทอร์ระหว่างฟีนิลโพรเพนและเฮมิเซลลูโลส (Arni et al., 2007; Li and Ge, 2012) วิธีการสกัดนี้มีข้อดี คือ การใช้พลังงานและต้นทุนต่ำ การสกัดลิกนินได้ในปริมาณมากในขณะที่มีการปนเปื้อนของคาร์โบไฮเดรตต่ำ (Brodeur et al. 2011) รวมถึงมีการสร้างสารพิษ furfural ในปริมาณน้อย (Van der Pol et al., 2015) ปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการสกัด ได้แก่ ความเข้มข้นของต่าง รวมถึงอุณหภูมิและเวลาในการสกัด (Arni et al., 2007) งานวิจัยนี้จะใช้สภาวะของการสกัดที่เหมาะสมซึ่งได้จากการศึกษาการผลิตครีมกันแดดจากสารสกัดลิกนินของโครงการวิจัยมุ่งเป้าในปีงบประมาณ 2560 อย่างไรก็ตามคาดว่าสารสกัดลิกนินที่เตรียมได้ยังคงมีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ในปริมาณสูง ซึ่งอาจมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (M_w) ประมาณ 4300 และน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (M_n) ประมาณ 1500 จากการเทียบกับงานวิจัยของ Li and Ge (2012) นั้นหมายถึง การแตกโครงสร้างลิกนินยังไม่สมบูรณ์ทำให้ได้สารประกอบฟีนอลในปริมาณน้อย แต่งานวิจัยนี้ต้องการใช้สารสกัดลิกนินที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กเป็นสารออกฤทธิ์ในเซรัม ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงต่อยอดการศึกษาผลการวิจัยที่ผ่านมาโดยการใช้เอนไซม์ร่วมกับสารช่วยในการทำปฏิกิริยาเพื่อย่อยโครงสร้างของสารสกัดลิกนินที่เตรียมได้จากการใช้สารละลายต่างร่วมกับหม้อนึ่งความดันสูง

2.2 การใช้เอนไซม์ร่วมกับสารช่วยในการทำปฏิกิริยา

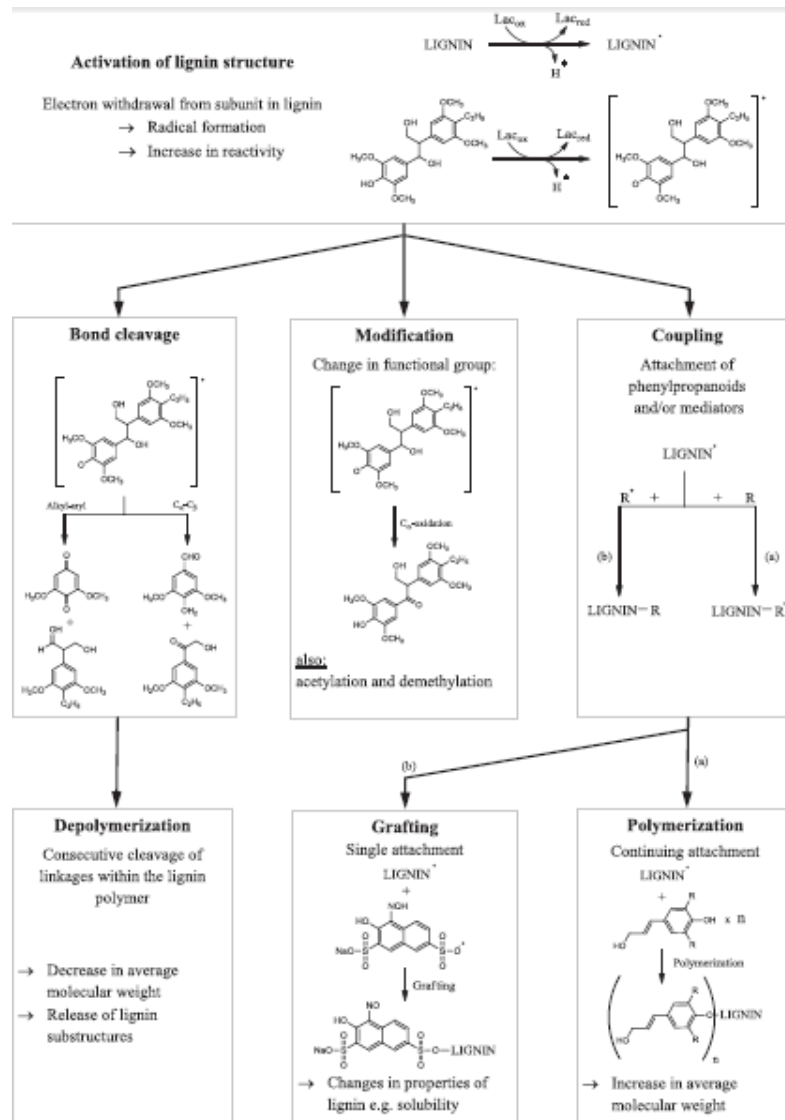
การแตกโครงสร้างลิกนินสามารถทำได้โดยอีกวิธีหนึ่ง นั่นคือ วิธีทางชีวภาพโดยการใช้เอนไซม์เอนไซม์ย่อยลิกนิน (lignin degrading enzymes) ที่สามารถทำลายโครงสร้างที่ใหญ่และไม่เป็นเนื้อเดียวกันของลิกนิน หรือสามารถเปลี่ยนลิกนินที่มีโมเลกุลขนาดเล็กให้กลายเป็นคาร์บอนหรือพลังงานโดยการตัดพันธะ C-C และ C-O ในโครงสร้างลิกนิน โดยแลคเคสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนินที่มีการรายงานถึงเป็นจำนวน

มาก สามารถพบได้ในแบคทีเรีย และรา โดยเป็นเอนไซม์ที่มี copper เป็นองค์ประกอบ ซึ่งทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนและมีโมเลกุลออกซิเจนเป็นตัวรับแล้วเปลี่ยนเป็นน้ำ (Dwivedi *et al.*, 2011; Munk *et al.*, 2015; Rivera-Hoyos *et al.*, 2013)

การศึกษาของ Eggert *et al.* (1997) ชี้ให้เห็นว่าแลคเคสเป็นเอนไซม์หลักในการย่อยสลายลิกนิน โดยทดลองใช้ *Pycnoporus cinnabarinus* ซึ่งปกติเป็นราที่ไม่มีการสังเคราะห์ lignin peroxidase และ manganese peroxidase และเมื่อถูกกลายพันธุ์ให้ไม่สามารถผลิตแลคเคสส่งผลให้ความสามารถในการเร่งการเกิด metabolism ของลิกนินลดลงเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตามเมื่อมีการใช้แลคเคสร่วมทำงานกับรากลายพันธุ์นี้ ส่งผลให้คืนความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bermek *et al.* (1998) ที่รายงานว่า *P. cinnabarinus* ที่ถูกกลายพันธุ์ให้ไม่สามารถผลิตแลคเคสไม่สามารถย่อยคราฟท์ลิกนิน

อย่างไรก็ตามเนื่องจากลิกนินเป็นสารที่มีโครงสร้างซับซ้อน น้ำหนักโมเลกุลสูง และมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ การใช้เอนไซม์เพียงลำพังเพื่อแตกโครงสร้างของลิกนินจึงมีประสิทธิภาพต่ำ แลคเคสโดยทั่วไปมีค่าศักย์ภาพของการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox potential) อยู่ในช่วง 0.5 – 0.8 โวลต์ จึงสามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันบริเวณหมู่ฟีนอลของลิกนินที่มีค่าศักย์ภาพของการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ประมาณ 0.5 โวลต์ แต่โครงสร้างลิกนินประกอบด้วยหน่วยย่อยของฟีนอล (phenolic subunits) เพียงร้อยละ 20 ในขณะที่หน่วยย่อยที่ไม่ใช่หมู่ฟีนอล (non-phenolic subunits) ซึ่งมีปริมาณประมาณร้อยละ 80 ถึง 90 นั้นมีค่าศักย์ภาพของการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์มากกว่า 1.5 โวลต์ จึงเป็นอุปสรรคต่อเอนไซม์ในการแตกโครงสร้างลิกนิน (Li *et al.*, 2001; Christopher *et al.*, 2014; Munk *et al.*, 2015) ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของแลคเคสจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเติมสารช่วยในการทำปฏิกิริยา (mediator) ของเอนไซม์

สารช่วยในการทำปฏิกิริยา (mediator) สามารถช่วยการทำงานของแลคเคสเนื่องจากเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจึงสามารถแพร่เข้าสู่โครงสร้างของลิกนิน (Woolridge, 2014) และช่วยขนส่งอิเล็กตรอนระหว่างแลคเคสกับหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างลิกนิน โดยโมเลกุลของสารช่วยในการทำปฏิกิริยามีค่าศักย์ภาพของการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์มากกว่า 0.9 โวลต์ จึงสามารถช่วยการทำงานของแลคเคสให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับหน่วยย่อยที่ไม่ใช่หมู่ฟีนอลในโครงสร้างของลิกนิน (Christopher *et al.*, 2014) ซึ่งก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ได้หลายชนิด (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 กลไกการทำงานของสารช่วยในการทำปฏิกิริยา (mediator) ที่ช่วยการทำงานของเอนไซม์แลคเคส ที่มา: Munk et al. (2015)

ผลของสารช่วยในการทำปฏิกิริยาต่อการการทำงานของเอนไซม์แลคเคสพบได้จากการศึกษาของ Srebotnik et al. (2000) ซึ่งตรวจสอบอิทธิพลของสาร 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) ความเข้มข้น 0.9 มิลลิโมล เมื่อทำงานร่วมกับแลคเคสจากรา *Trametes villosa* ในการย่อยลิกนินต้นแบบสังเคราะห์ทั้งชนิดที่มีและไม่มีหมู่ฟีนอล ผลการทดลองพบว่า การใช้แลคเคสร่วมกับ HOBT เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถลดค่าเฉลี่ยน้ำหนักโมเลกุลโดยน้ำหนักของลิกนินทั้งสองประเภทได้ประมาณ 2.1 เท่า ของการใช้แลคเคสเพียงอย่างเดียว และการใช้เพียงแลคเคสไม่สามารถลดขนาดโมเลกุลของลิกนินชนิดที่ไม่มีหมู่ฟีนอล

สารช่วยในการทำปฏิกิริยาสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดหลัก คือ 1) สารจากธรรมชาติที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการแตกโครงสร้างของลิกนินเอง เช่น *p*-cinnamic acid หรือ sinapic acid และ 2) สารสังเคราะห์ เช่น TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl), HBT (1-hydroxybenzotriazole), ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)) และ 5-aminosalicylic acid (ASA) เป็นต้น โดยงานวิจัยที่ศึกษาการใช้สารช่วยทำปฏิกิริยาชนิดต่าง ๆ ร่วมกับแลคเคสเพื่อแตกโครงสร้างของลิกนินมีดังต่อไปนี้

Rich et al. (2016) ศึกษาผลการใช้สารช่วยในการทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ (TEMPO, ASA และ ABTS) ร่วมกับแลคเคสจากรา *Pycnoporus cinnabarinus* ATCC 200478 ในการแตกโครงสร้างลิกนิน โดยตรวจสอบปริมาณของ *p*-hydroxybenzaldehyde (4HBA) ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ *p*-coumaryl alcohol (*p*CA) ด้วยเทคนิค High-performance liquid chromatography (HPLC) ผลการทดลองพบว่า การใช้ TEMPO เป็นเวลา 24 h สามารถเปลี่ยน *p*CA เป็น 4HBA ได้สูงถึงร้อยละ 76.4 และมีปริมาณ *p*CA คงเหลือในระบบร้อยละ 6.2 ในขณะที่ ABTS, ASA และการใช้แลคเคสเพียงลำพัง สามารถตรวจพบปริมาณ 4HBA ในระบบหลังการบ่มได้ร้อยละ 74.3, 51.4 และ 0 ตามลำดับ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของการใช้สารช่วยทำปฏิกิริยาชนิดต่าง ๆ เพื่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบในโครงสร้างลิกนิน

Bourbonnais et al. (1997) ตรวจสอบประสิทธิภาพสารช่วยทำปฏิกิริยา (ABTS 1 มิลลิโมล, HBT 1 มิลลิโมล และ ABTS 0.5 มิลลิโมล ร่วมกับ HBT 0.5 มิลลิโมล) เมื่อทำงานร่วมกับแลคเคสต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ veratryl alcohol (2 mM) โดยติดตามผลของปฏิกิริยาจากปริมาณของ veratraldehyde ที่เกิดขึ้นในระบบ ผลการทดลองพบว่า laccase-HBT สามารถออกซิไดซ์ veratryl alcohol ได้ร้อยละ 100 ภายใน 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับ laccase-HBT+ABTS ในอัตราการเปลี่ยนแปลงที่ใกล้เคียงกัน ขณะที่ ABTS สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้เพียงร้อยละ 50 จากนั้นจึงนำสารช่วยทำปฏิกิริยาทั้งหมดมาทดสอบการย่อยลิกนินต้นแบบ 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-propane-1,3-diol ที่เป็นตัวแทนของ β -O-4 dimer ผลการทดลองพบว่า HBT มีอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์จากการสลายพันธะ β -O-4 ของ dimer ที่เร็วกว่า ABTS โดย HBT สามารถออกซิไดซ์สารตั้งต้นได้ร้อยละ 40 ภายใน 24 ชั่วโมง ขณะที่ ABTS ทำได้เพียงร้อยละ 12 ผลการทดลองทั้งสองสนับสนุนกลไกการทำงานของสารช่วยทำปฏิกิริยาที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารตั้งต้น

Rico et al. (2014) กำจัดลิกนินออกจากไม้ยูคาลิปตัสด้วยแลคเคสที่ได้จากรา *Myceliophthora thermophila* โดยแปรผันปริมาณเอนไซม์ (10 และ 50 ยูนิตต่อกรัม) และ methyl syringate (ร้อยละ 1 และ 3) ซึ่งเป็นสารช่วยทำปฏิกิริยาจากธรรมชาติ ผลการทดลองพบว่า การใช้เอนไซม์แลคเคสที่ 50 ยูนิตต่อกรัมร่วมกับ methyl syringate ความเข้มข้นร้อยละ 3 สามารถกำจัดลิกนินออกจากโครงสร้างไม้ยูคาลิปตัสได้ถึง ร้อยละ 50 ในขณะที่การใช้เอนไซม์ความเข้มข้นสูงเพียงอย่างเดียวกำจัดลิกนินได้เพียงร้อยละ 20 นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบองค์ประกอบของสารที่ถูกปลดปล่อยจากโครงสร้างลิกนินด้วยเทคนิค pyrolysis coupled to gas chromatography/mass spectrometry (Py-GC/MS) พบว่าสัดส่วน syringyl-to-guaiacyl (S/G ratio) ของสถานะที่ใช้เฉพาะแลคเคส และสถานะที่เติมสารช่วยทำปฏิกิริยา มีค่า S/G ratio แตกต่างกัน (4.3 และ 4.9 เท่า ตามลำดับ) ผลดังกล่าวอธิบายถึงการทำงานของ methyl syringate ที่มีกลไกการดึงอะตอมของไฮโดรเจน (hydrogen-atom abstraction) จากตำแหน่ง C α บริเวณหน่วยย่อย S ซึ่งทำให้พันธะ alkyl-aryl ether ในโครงสร้างลิกนินแตกออกและได้ผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกับการใช้เอนไซม์เพียงอย่างเดียว

Camarero et al. (2007) กำจัดลิกนินออกจากเส้นใยไม้แบบสองขั้นตอนเพื่อวัตถุประสงค์การทำกระดาษ ขั้นแรกเปรียบเทียบการใช้แลคเคสจากรา *Pycnoporus cinnabarinus* กับสารช่วยทำปฏิกิริยาชนิดต่าง ๆ ทั้งที่มาจากธรรมชาติและสังเคราะห์ ได้แก่ syringaldehyde (SA), *p*-coumaric acid (pCA), acetosyringone (AS) และ HBT ที่สภาวะการย่อยด้วยอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างที่ 4 ความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจึงกำจัดลิกนินต่ออีกขั้นด้วยการสกัดต่าง (โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5) ผลการตรวจสอบ kappa number (KN) ที่สื่อถึงปริมาณลิกนินที่เหลือในเส้นใย พบว่า การใช้ laccase-HBT ส่งผลให้เส้นใยมี KN น้อยสุด เท่ากับ 7 รองลงมา คือ การใช้แลคเคสร่วมกับสารช่วยทำปฏิกิริยาจากธรรมชาติอย่าง AS และ SA ที่มี KN ประมาณ 9.2 และ 9.5 ตามลำดับ ส่วน pCA ไม่พบการเปลี่ยนแปลง KN เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่สกัดต่างอย่างเดียว เนื่องมาจากอิทธิพลของค่า pKa ของหมู่ฟีนอลในโครงสร้าง pCA (4.64), AS (7.80) และ SA (7.20) ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการเกิดอนุมูลอิสระในระบบ

3. เซลล์ที่ประกอบด้วยสารสกัดลิกนิน

เซลล์บำรุงผิว คือ ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวที่มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์สูงและมีขนาดโมเลกุลที่เล็กมาก ส่งผลให้การซึมเข้าสู่ผิวหนังมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Selwyn, 2011) ดังนั้นเซลล์จึงมีประสิทธิภาพในการบำรุงผิวมากกว่าครีมหรือโลชั่นเมื่อเทียบระยะเวลาการทำงานที่เท่ากัน โดยในงานวิจัยนี้เป็นการผลิตเซลล์ที่มีสาร

ออกฤทธิ์สารสกัดขานอ้อยที่มีส่วนประกอบของสารประกอบฟีนอล ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ตรงกับความต้องการของตลาดเพราะเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติและใช้เทคโนโลยีขั้นสูงในกระบวนการผลิต สมบัติของเซรั่มที่คาดว่าจะประโยชน์ต่อผิวหนังมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.1 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radicals) คือ สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล จึงเป็นสารที่ไม่เสถียร และว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา ตัวอย่างของอนุมูลอิสระที่สำคัญที่เกิดในเซลล์ที่ใช้ออกซิเจน คือ อนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว (reactive oxygen species; ROS) และอนุพันธ์ไนโตรเจนที่ว่องไว (reactive nitrogen species; RNS) ที่สามารถดึงอิเล็กตรอนอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองมีความเสถียร และเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ (Willcox et al., 2004) อนุมูลอิสระเกิดได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ การตอบสนองต่อการอักเสบ ภาวะการขาดเลือดหล่อเลี้ยงเซลล์ (Ischemia) และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ทั้งมลพิษในอากาศ ควันบุหรี่ รวมถึงรังสี UV ส่งผลให้เกิดความเครียดออกซิเดชันทำให้มีการทำลายสารชีวโมเลกุลทั้งในเซลล์และส่วนประกอบของสิ่งมีชีวิต เช่น ลิพิด โปรตีน เอนไซม์ ดีเอ็นเอ คอลลาเจน อิลาสตินและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) (Masaki, 2010) จากที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุสำคัญของการเสื่อมชราของผิว อย่างไรก็ตามสามารถป้องกันได้ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ โดยปัจจุบันมีการสนับสนุนให้มีการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติ เช่น สารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ รวมถึงลิคินิน (Afaq, 2011) ที่เป็นอีกแหล่งหนึ่งที่น่าสนใจ และได้รับการสนับสนุนให้มีการศึกษาเป็นอย่างมาก

กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของลิคินินมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง โดยลิคินินมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลจึงทำให้มีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ (radical scavenging) ซึ่งส่งผลให้ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันแบบลูกโซ่ได้ (Barclay et al., 1997; Dizhbite et al., 2004) นอกจากนี้ น้ำหนักโมเลกุลยังส่งผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ดังการศึกษาของ Pan et al. (2006) และ Ugartondo et al. (2008) ที่มีผลการศึกษาเป็นไปในทิศทางเดียวกัน และชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของลิคินิน สภาวะในการสกัด และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

Pan et al. (2006) ศึกษาอิทธิพลของเวลา (26 - 94 นาที) อุณหภูมิ (155 - 205 องศาเซลเซียส) ปริมาณกรด sulfuric ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (ความเข้มข้นร้อยละ 0.83 ถึง 1.67 โดยน้ำหนัก) และความเข้มข้นของเอทานอล (ความเข้มข้นร้อยละ 25 ถึง 75) ในการสกัดลิกนินจาก Poplar (*Populus nigra* × *P. maximowiczii*) โดยใช้เทคนิคพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology) ที่มีการวางแผนการทดลองแบบเมทริกซ์ จากผลการทดสอบพบว่า ลิกนินที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 65 โดยปริมาตร เป็นเวลา 80 นาที ที่อุณหภูมิ 195 องศาเซลเซียส และมีตัวเร่งปฏิกิริยาร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อ น้ำหนักแห้งของวัสดุ มีกิจกรรมการต้านอนุมูล 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) สูงที่สุด (radical scavenging index = 122) รวมถึงมีหมู่ phenolic hydroxyl มาก และหมู่ aliphatic hydroxyl น้อย (4.63 และ 3.29 มิลลิโมลต่อกรัมของลิกนิน ตามลำดับ) ค่าเฉลี่ยน้ำหนักโมเลกุลโดยน้ำหนัก (weight-average molecular weights; M_w) มีค่าน้อย (1105 Da) และมีการกระจายขนาดของอนุภาคในช่วงแคบ (1.41) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้เป็นผลจากสภาวะการสกัด และส่งผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยตรง

Ugartondo et al. (2008) ศึกษากระบวนการต้านอนุมูลอิสระของลิกนินที่ได้จากขานอ้อยผ่านกระบวนการ Kraft การระเบิดด้วยไอน้ำ และลิกนินชนิด lignisulphonate โดยการวิเคราะห์ค่า IC_{50} (Inhibitory concentration 50) จากความสามารถในการยับยั้ง peroxy radical initiator (AAPH) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เม็ดเลือดแดงแตก (haemolysis) ผลการศึกษาพบว่า ลิกนินทุกประเภทสามารถยับยั้ง AAPH และกิจกรรมการยับยั้งแปรผันตามความเข้มข้นของลิกนิน (12.5 – 200 µg/ml) โดยค่า IC_{50} ของลิกนินจากขานอ้อย การระเบิดด้วยไอน้ำ กระบวนการ Kraft และ lignisulphonate มีค่าเป็น 44.9, 74.6, 85.9 และ 133.6 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทั้งยังพบว่าค่าเฉลี่ยน้ำหนักโมเลกุลโดยจำนวน (Number-average molecular weights; M_n) ของลิกนินแต่ละชนิดสัมพันธ์กับกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นลิกนินจากขานอ้อยมี M_n น้อยที่สุด ในขณะที่ M_n ของลิกนินจากการระเบิดด้วยไอน้ำ และกระบวนการ Kraft ใกล้เคียงกัน และ lignisulphonate มีค่ามากที่สุด จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของขนาดโมเลกุลของลิกนินที่ส่งผลต่อปริมาณหมู่ phenolic hydroxyl อิสระ ซึ่งเป็นตัวการสำคัญของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

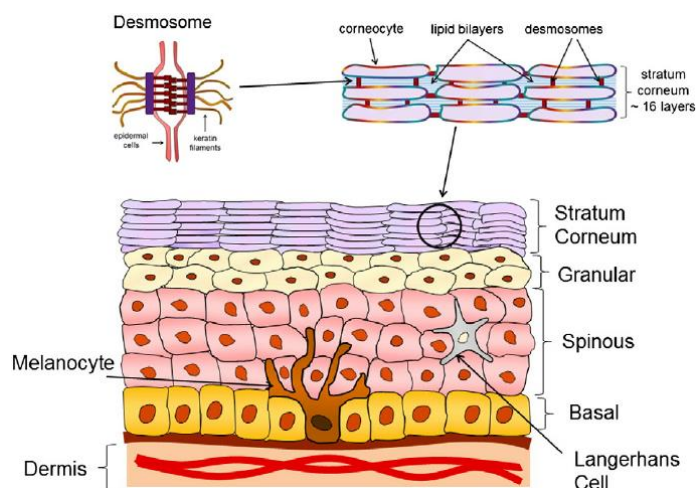
3.2 คุณสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

เมลานิน (melanin) เป็นเม็ดสีที่พบได้ในผิวหนังของมนุษย์ มีหน้าที่หลักในการป้องกันเซลล์จากการทำลายของรังสี UV ด้วยคุณสมบัติการดูดกลืนแสงเป็นช่วงกว้าง และถูกผลิตจากเซลล์ melanocytes ที่อยู่บริเวณชั้น basal ซึ่งเป็นส่วนลึกที่สุดของชั้นหนังกำพร้า (ภาพที่ 4) รวมถึงเป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ tyrosine ที่มี tyrosinase เป็นเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้อง (Prota, 1988; Spritz and Hearing,

1994)

โดยรังสี UV เป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลให้มีการผลิตเมลานินที่ผิวหนังเพิ่มขึ้นด้วยการกระตุ้นให้ผลิตฮอร์โมน α -melanocyte stimulating ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดสี (Chakraborty et al., 1996) และเหนี่ยวนำให้มีการผลิต ROS ที่เกี่ยวข้องเพิ่มขึ้น เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่กระตุ้นการผลิต phenylalanine hydroxylase (PAH) ที่ขึ้นหิ้งกำพร้าวซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน l-phenyl-alanine เป็น l-tyrosine (Schallreuter et al., 2004) และไนโตรเจนออกไซด์ ($NO\cdot$) ที่กระตุ้นการผลิตไทโรซิเนสและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไทโรซิเนสเพิ่มขึ้น (Sasaki et al., 2000) หากร่างกายมีสารเหล่านี้มากเกินไปสามารถส่งผลให้ผิวมีสีคล้ำ จุดด่างดำ (spot aging) หรือฝ้า (melasma) ได้ ซึ่งแนวทางหนึ่งของการป้องกันคือการยับยั้ง tyrosinase ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตเม็ดสี

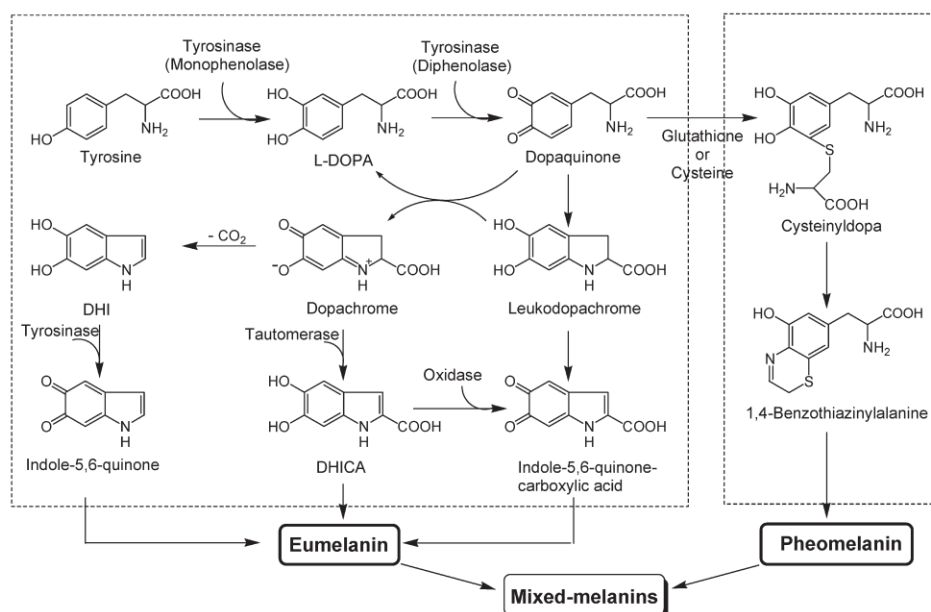
tyrosinase (EC 1.14.18.1) เป็นเอนไซม์ที่มี copper เป็นองค์ประกอบ สามารถเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตเมลานินได้ 2 แบบ คือ การเกิดปฏิกิริยา hydroxylation ของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วย monophenolase และปฏิกิริยา oxidation ที่ทำให้ 3,4-dihydroxy-phenylalanine (L-DOPA) เปลี่ยนเป็น o-dopaquinone ด้วย diphenolase (ภาพที่ 4) โดย o-Dopaquinone เกิดปฏิกิริยาการเติมด้วยน้ำ (Water addition reaction) และปฏิกิริยา Non-enzymatic cyclization ไปเป็น Leukodopachrome แล้วถูกออกซิไดส์อย่างรวดเร็ว ด้วย o-Dopaquinone อีกโมเลกุลหนึ่ง ทำให้ได้ Dopachrome และเกิดปฏิกิริยาอื่น ๆ ทั้งทางเคมี และเอนไซม์ต่อไปจนได้ Eumelanin ซึ่งเป็นเม็ดสีสีน้ำตาลดำ ขณะเดียวกัน o-dopaquinone จะเปลี่ยนกลับเป็น L-DOPA ดังภาพที่ 5 อย่างไรก็ตามหากมีสารประกอบที่มีหมู่ซัลไฟไฮดริล (sulfhydryl) เช่น glutathione หรือ cysteine ในปฏิกิริยา ส่งผลให้หมู่ไทออล (thiol) ของสารประกอบทำปฏิกิริยากับ o-dopaquinone และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น pheomelanin ซึ่งเป็นเม็ดสีสีเหลือง หรือแดง (Rodríguez-López et al., 1991; Cooksey et al., 1997) จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่า tyrosinase เป็นเอนไซม์หนึ่งที่สำคัญของขั้นตอนในวิธีการผลิตเมลานิน ดังนั้นจึงต้องหาแหล่งสารที่มีคุณสมบัติยับยั้ง tyrosinase โดยเฉพาะกลุ่มสารประกอบฟีนอลจากพืช เช่น สารสกัดเนื้อในเมล็ดมะม่วง (Maisuthisakul and Gordon, 2009) สารสกัดใบ *Tibouchina semidecandra* L. (Sirat et al., 2010) ผลพลอยได้จากกระบวนการทำใส่น้ำตาล (desugared sugarcane extracts) (Chung et al., 2011) และสารสกัดเปลือกทับทิม (Fawole et al., 2012)



ภาพที่ 4 โครงสร้างของผิวหนัง และองค์ประกอบชั้นป้องกันผิวชั้นหนังกำพร้า (Epidermis)

ที่มา: Visscher and Narendran (2014)

โครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นปัจจัยหลักที่กำหนดรูปแบบกลไกการยับยั้งกิจกรรมของ tyrosinase ตัวอย่างเช่น สารสกัดจากใบ *Tibouchina semidecandra* L. ประกอบด้วย quercetin และอนุพันธ์ รวมถึง avicularin และ quercitrin ซึ่งเป็นสารกลุ่ม flavonoid แต่มีเพียง quercetin ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์นี้ด้วยการแย่งจับ copper ของเอนไซม์ที่บริเวณเร่งได้ เนื่องจากมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) อิสระที่ตำแหน่ง C-3 ดังภาพที่ 5 (Maisuthisakul and Gordon, 2009) ส่วนสารสกัดจากเปลือกทับทิมมี tannin ที่เป็นสารตกตะกอนโปรตีนจึงทำให้ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการทำให้เสียสภาพ (Fawole et al., 2012) ส่วนสารสกัดเนื้อในเมล็ดมะม่วงเป็นแหล่งของกรด tannic, gallic และ epicatechin และผลพลอยได้จากกระบวนการทำใส่น้ำตาลมีพอลิฟีนอล (polyphenol) ที่มีหน่วยย่อยเป็นกรด *p*-coumaric, ferulic และ sinnapic เป็นองค์ประกอบ โดยสารจากพืชสองชนิดนี้สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เนื่องจากการมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระที่ตำแหน่งที่ 4 ของวงอะโรมาติก (aromatic) โดยหมู่ฟังก์ชันนี้เกิดการสร้างพันธะไฮโดรเจนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้สารตั้งต้นอย่าง L-tyrosine หรือ L-DOPA จับที่บริเวณเร่งไม่ได้ ส่งผลให้ไม่เกิดปฏิกิริยา water addition หรือ oxidation ตามลำดับ (Maisuthisakul and Gordon, 2009; Chung et al., 2011) จากที่รายงานมานี้แสดงให้เห็นประสิทธิภาพของลิควิน ซึ่งมีหน่วยย่อยเป็นสารประกอบฟีนอลสามารถยับยั้งกิจกรรมของ tyrosinase



ภาพที่ 5 วิธีชีวสังเคราะห์ของเมลานิน (melanin)

ที่มา: Kim and Uyama (2005)

3.3 คุณสมบัติการยับยั้ง collagenase

ชั้นหนังแท้ (Dermis) เป็นผิวหนังถัดจากชั้นหนังกำพร้า (epidermis) และเป็นที่อยู่ของโปรตีน extracellular matrix (ECM) เช่น collagen และ elastin ซึ่งมีหน้าที่ช่วยค้ำจุนเซลล์ ทำให้ผิวหนังทนต่อแรงดึง (tensile strength) และมีความยืดหยุ่น ตามลำดับ (Moloney et al., 1992) ทั้งนี้การเสื่อมสภาพของผิวเป็นการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางชีวภาพที่เป็นผลมาจากทั้งพันธุกรรม การเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน กระบวนการเมแทบอลิซึม และสภาพแวดล้อม รวมถึงรังสี UV ที่เป็นปัจจัยสำคัญที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระ หรือ ROS ซึ่งเป็นตัวการเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ proteinase ที่ทำให้ลักษณะของ ECM เปลี่ยนแปลง และไม่สามารถทำหน้าที่ได้จนแสดงออกทางลักษณะปรากฏ เช่น ริ้วรอย ความหย่อนคล้อย และความหนาของผิว เป็นต้น (Jenkins, 2002; Kim et al., 2004) โดยเอนไซม์กลุ่มนั้น คือ matrix metalloproteinases (MMPs) และ serine protease

MMPs เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม endopeptidases ที่มี zinc (Zn) เป็น co-factor และมีความจำเพาะต่อ substrate หลายชนิด ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ คือ collagenase และ gelatinase โดย collagenase เป็นต้นเหตุหนึ่งในการเสื่อมสลายของ ECM เช่น collagenase-2 (MMP-8) ที่สามารถคลายโครงสร้างของ aggrecan, elastin, fibronectin, gelatine และ laminin รวมถึง collagen (Raffetto and Khalil, 2008) เอนไซม์นี้ทำงานโดยการคลายโครงสร้างของ collagen ที่ประกอบด้วยชุด Gly-X-Y ซ้ำ ๆ ที่ต่อกันเป็นสายยาวให้แตกออกเป็นสายสั้น ๆ ซึ่ง X สามารถเป็นกรดอะมิโนได้ทุกชนิด แต่มักเป็น proline และ Y

เป็น hydroxyproline หรือ hydroxylysine สังเคราะห์เปปไทด์ที่มีลำดับเป็น Pro-X-Gly-Pro ขึ้นมา เพื่อให้กรดอะมิโนทาง N-terminus ไม่สามารถทำปฏิกิริยาต่อได้ (Van Wart and Steinbrink, 1981)

กิจกรรมของ collagenase ที่สภาวะทั่วไปเป็นกระบวนการที่สำคัญหลังจากที่ลักษณะของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอยู่ในรูปแบบที่ไม่ปกติ เช่น รอยแผลเป็น การอักเสบ และมะเร็ง เป็นต้น กิจกรรมนี้มีเพื่อกำจัดโปรตีนแปลกปลอมที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการ phagocytosis ของเม็ดเลือดขาว ซึ่งเป็นกลไกสำหรับการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ (Melzig et al., 2001; Siedle et al., 2002) อย่างไรก็ตามอนุมูลอิสระสามารถส่งผลเหนี่ยวนำให้มีเอนไซม์เหล่านี้มากเกินไป จึงเป็นสาเหตุสำคัญของการเสื่อมสภาพของผิวได้

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมขานอ้อย

ขานอ้อยได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทเกษตรไทย อินเตอร์เนชั่นแนล ซูการ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด (มหาชน) เริ่มต้นเตรียมตัวอย่างด้วยการล้างขานอ้อยด้วยน้ำเพื่อกำจัดสิ่งสกปรก จากนั้นอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 ± 1 องศาเซลเซียส จนมีความชื้นเหลือประมาณร้อยละ 7 ก่อนลดขนาดด้วยเครื่องบดแบบฮ้อนเหวี่ยง (Hammer mill) จนได้ขนาดกว้างและยาวไม่เกินด้านละ 1 เซนติเมตร จัดเก็บขานอ้อยแห้งที่อุณหภูมิ -20 ± 1 องศาเซลเซียส

2. การสกัดลิกนินด้วยสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) อุณหภูมิและความดันสูง

สกัดลิกนินด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยปริมาตร ใช้อัตราส่วนขานอ้อยต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 1 ต่อ 50 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 นาที ซึ่งเป็นสภาวะการสกัดที่เหมาะสมซึ่งได้จากผลการวิจัยเรื่องการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดลิกนินจากขานอ้อยเพื่อพัฒนาเป็นสารกันแดดในปีงบประมาณ 2560 จากนั้นกรองสารสกัดลิกนินด้วยกระดาษกรองในลอนขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน

3. การตกตะกอนลิกนิน

ตกตะกอนลิกนินจากสารสกัดโดยปรับพีเอชของสารสกัดให้เท่ากับ 2 ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร เหยี่ยงแยกตะกอนลิกนินที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที อบแห้งตะกอนที่ได้ในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนจนน้ำล้างมีพีเอชประมาณ 7.0 และอบแห้งตะกอนอีกครั้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนจัดเก็บผงลิกนินแห้งที่อุณหภูมิ -20 ± 1 องศาเซลเซียส

4. สภาวะการย่อยสารสกัดลิกนินด้วยเอนไซม์แลคเคส

4.1 อิทธิพลของพีเอช

เติมเอนไซม์แลคเคส (*Trametes versicolor*) จากราขาว (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ลงในบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตตที่ปรับพีเอชในช่วง 3.0 ถึง 5.5 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส เริ่มต้นทำปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายอนุโมลอิสระ ABTS (2,2'-azino-bis(3 ethylbenzothiazoline-6-

sulphonic acid)) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่แปรงพื้นผิวเอชต่างๆ ทำการจับเวลา และเก็บตัวอย่างทุก 30 วินาที เป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 430 นาโนเมตร คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ แลคเคส (A) ตามสมการที่ (1)

$$A = \epsilon cl \quad (1)$$

โดย ϵ คือ ค่าคงที่ของการดูดกลืนแสง (extinction coefficient) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 36,000 เซกซ์ส่วนโมลเซนติเมตร, c คือ ความเข้มข้นของ ABTS (โมล) และ l คือ ความหนาของตัวอย่าง (เซนติเมตร)

4.2 อิทธิพลของอุณหภูมิ

ทำการทดลองโดยใช้พีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตตที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส มีค่าสูงสุดจากข้อ 4.1 แปรงพื้นผิวอุณหภูมิการทำงานของเอนไซม์ในช่วง 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส ก่อนเติมสารละลาย ABTS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำการจับเวลา และเก็บตัวอย่างทุก 30 วินาที เป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 430 นาโนเมตร คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส (A) ตามสมการที่ (1) เลือกค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.3 อิทธิพลของความเข้มข้นของสารช่วยทำปฏิกิริยา

ชั่งลิกนินปริมาณ 0.1 ± 0.01 กรัม ลงในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต จากนั้นเติมเอนไซม์แลคเคส (0.1 ยูนิตต่อโมล) ร่วมกับสารช่วยทำปฏิกิริยา ABTS ที่แปรงพื้นผิวความเข้มข้น (0, 0.2 และ 0.4 มิลลิโมล) ควบคุมพีเอชของบัฟเฟอร์ และอุณหภูมิของระบบตามสภาวะที่ได้การทดลองก่อนหน้านี้ เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกวัน จนครบ 3 วัน หลังจากนั้นกรองลิกนินหลังจากการย่อยด้วยกระดาษกรองไนลอนที่มีรูพรุน 0.45 ไมครอน วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารละลายที่ได้

4.4 อิทธิพลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟต์ (NaHSO_3)

ชั่งลิกนินปริมาณ 0.1 ± 0.01 กรัม ลงในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต พร้อมเติมเอนไซม์แลคเคส (0.1 ยูนิตต่อโมล) ร่วมกับสารช่วยทำปฏิกิริยา ABTS แปรงพื้นผิวป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอล คือ โซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟต์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.002, 0.01 และ 0.02 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ควบคุมพีเอชของบัฟเฟอร์ และอุณหภูมิของระบบตามสภาวะที่ได้การทดลองเบื้องต้น เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกวัน จนครบ 3 วัน กรองลิกนินที่เหลือจากการย่อยด้วยกระดาษกรองไนลอนที่มีรูพรุน 0.45 ไมครอน วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารละลาย

4.5 อิทธิพลของอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์แลคเคสต่อปริมาณลิกนิน

ทดลองแปรผันกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสในระบบ โดยกำหนดพีเอชอุณหภูมิ ความเข้มข้นของ ABTS และโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ ตามสภาวะที่ได้จากการทดลองเบื้องต้น เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 7 วัน กรองลิกนินที่เหลือจากการย่อยด้วยกระดาษกรองไนลอนที่มีรูพรุน 0.45 ไมครอน วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารละลายที่ได้

5. การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของสารสกัด

5.1 กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ

วิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Re et al. (1999) เริ่มจากเตรียมสารละลาย ABTS เข้มข้นที่ความเข้มข้น 7 มิลลิโมล และโพแทสเซียมเปอร์ออกไซด์โซลเฟตความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมล ผสมกันในสัดส่วน 1 ต่อ 0.5 โดยปริมาตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จนได้เป็นสารละลายอนุมูลอิสระของ ABTS ซึ่งมีสีน้ำเงินเขียว ก่อนใช้งานให้เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟตจนได้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.700 ± 0.020 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ผสมตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับสารละลายสารละลายอนุมูลอิสระของ ABTS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 6 นาที ในที่มืด วัดค่าการดูดกลืนแสงและ คำนวณค่ากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดในหน่วยมิลลิกรัมของโทลอกซ์ต่อกรัมลิกนิน (mgTE/g lignin) โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของสารโทลอกซ์

5.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (Total phenolic content, TPC)

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดตามวิธีการของ Slinkard และ Singleton (1977) เริ่มจากผสมสารละลายตัวอย่างปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร กับสารฟอลิน-ซีโอแคลตู (Folin-Ciocalteu) ความเข้มข้น 0.2 นอร์มัล ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 8.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 90 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในหน่วยมิลลิกรัมของแกลลิกต่อกรัมลิกนิน (mgGAE/g lignin) โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของแกลลิก

5.3 ชนิดสารประกอบฟีนอล

วิเคราะห์องค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลในสารสกัดลิกนินด้วย reversed-phase high-performance liquid chromatography โดยใช้คอลัมน์ Agilent Eclipse XDB C18 (25 มิลลิเมตร x 6 มิลลิเมตร, 5.0 ไมโครเมตร) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่ A คือ เมทาโทล ส่วน

สารละลายวัฏภาคเคลื่อนที่ B คือ กรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร ใช้อัตราส่วนระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่ A และ B ที่ 20 ต่อ 80 เป็นเวลา 0 – 80 นาที ใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที วิเคราะห์ตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 280 และ 320 นาโนเมตร

5.4 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วย Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR)

วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารสกัดลิกนินที่สภาวะต่างๆ ด้วยเทคนิค ATR-FTIR โดยสแกนผงสารสกัดลิกนินในช่วงความยาวคลื่นที่ 4000 – 650 เซกซ์ส่วนเซนติเมตร ที่ความละเอียด (resolution) เท่ากับ 4 เซกซ์ส่วนเซนติเมตร

5.5 การวิเคราะห์กิจกรรมยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

วิเคราะห์กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (EC 1.14.18.1) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ที่ทำปฏิกิริยากับ L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม ตามวิธีการของ Chan et al. (2011) ที่มีการดัดแปลงเล็กน้อย เริ่มจากเติมเอนไซม์ไทโรซิเนส (350 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และตัวอย่างที่ปริมาตรอย่างละ 50 ไมโครลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต โดยมีตัวอย่างควบคุมเชิงบวกที่ไม่เติมสารสกัด และตัวอย่างควบคุมเชิงลบที่มีแต่สารละลาย L-DOPA ปรับปริมาตรรวมสุดท้ายของระบบให้เท่ากับ 200 ไมโครลิตร ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร รอให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร คำนวณกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซินดั่งสมการที่ (2)

$$\text{ร้อยละกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส} = \frac{(A - B)}{(C - D)} \times 100 \quad (2)$$

โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมเอนไซม์ C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุมเชิงบวก และ D คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุมเชิงลบ

5.6 การวิเคราะห์กิจกรรมยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส

วิเคราะห์กิจกรรมยับยั้งของเอนไซม์คอลลาจิเนส (EC 3.4.24.3) ที่ทำปฏิกิริยากับอะมิโนสังเคราะห์ *N*-[3-(2-furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) ในไมโครเพลทแบบ 96 หลุม เริ่มจากเติมเอนไซม์คอลลาจิเนส (0.35 ยูนิตต่อมิลลิตร) และตัวอย่างที่ปริมาตรอย่างละ 10 ไมโครลิตร โดยมีตัวอย่างควบคุมเชิงบวกที่ไม่เติมสารสกัด ตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมเอนไซม์ และตัวอย่างควบคุมเชิงลบที่มีเติม 1,10-Phenanthroline ปรับปริมาตรรวมสุดท้ายของระบบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ให้เท่ากับ 200 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมอะมิโนสังเคราะห์ปริมาตร 40 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 345 นาโนเมตร จนปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ คำนวณกิจกรรมการทำงานและการกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนสดังสมการที่ (3) และ (4) ตามลำดับ

$$\text{ร้อยละกิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจิเนส} = \frac{\left(\frac{-\Delta A_{345\text{test}}}{\Delta T} - \frac{-\Delta A_{\text{Reagent Background}}}{\Delta T} \right) \times 0.2 \times \text{DF}}{0.53 \times V} \quad (3)$$

โดย ΔA_{345} คือ ความแตกต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ A_2 และ A_1 , ΔT คือ ความแตกต่างของเวลาที่ T_2 และ T_1 , 0.2 คือ ปริมาตรรวมของระบบ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.2 มิลลิตร, DF คือ ค่าการเจือจางตัวอย่าง, $0.53 =$ ค่าคงที่ของการดูดกลืนแสง (extinction coefficient) ของอะมิโนสังเคราะห์ FALGPA (เศษส่วนมิลลิโมลเซนติเมตร) และ V คือ ปริมาณเอนไซม์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.01 มิลลิตร

$$\text{ร้อยละกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส} = \frac{\text{Activity}_{\text{enzyme}} - \text{Activity}_{\text{inhibitor}}}{\text{Activity}_{\text{enzyme}}} \times 100 \quad (4)$$

โดย $\text{Activity}_{\text{enzyme}}$ และ $\text{Activity}_{\text{inhibitor}}$ คือ กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนสในตัวอย่างทดสอบ และในตัวอย่างที่เติมสารยับยั้ง ตามลำดับ

6. การผลิตเซรัมสำหรับหน้า

เตรียมเซรัมสำหรับหน้าที่ประกอบด้วยโพรไพลีนไกลคอลจำนวน 2 กรัม กลีเซอรีนจำนวน 1 กรัม และไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (Hydroxyethyl cellulose, HEC) ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 โดยน้ำหนัก ให้ความร้อนด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 90 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ลดอุณหภูมิของระบบเท่ากับ

30 ± 2 องศาเซลเซียส ก่อนเติมลิกนินหลังการทำบริสุทธิ์ด้วยเยื่อเลือกผ่าน และสารสกัดลิกนินที่ละลายด้วย เอนไซม์แลคเคส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.03, 0.20 และ 0.50 โดยปริมาตร ตามลำดับ ซึ่งให้กิจกรรมการยับยั้งไทโรซิเนสและคอลลาจิเนสสูงสุด ปรับปริมาตรสุดท้ายของระบบให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำที่ปราศจากประจุ กำหนดให้พีเอชของเซรัมแต่ละสูตรมีค่าเท่ากับ 5.0 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์ (Rippke et al., 2004)

7. สมบัติทางกายภาพของเซรัม

7.1 ความหนืด

วัดความหนืดของเซรัมด้วยเครื่อง Brookfield DV-III (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA) ด้วยหัววัดเบอร์ 21 ที่ความเร็ว 60 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 วินาที กำหนดแต่ละตัวอย่างต้องมีค่าแรงบิด (Torque) อยู่ในช่วงร้อยละ 10 ถึง 100

7.2 สี

วัดสีของเซรัมแต่ละสูตรในระบบ CIE LAB Color Space ด้วยเครื่อง Chroma meter (CR-400, Konica Minolta optics, INC., Japan) เริ่มจากตั้งค่าเครื่องด้วยแผ่นสีขาวมาตรฐานซึ่งมีค่า $L^* = 94.73 \pm 0.01$, $a^* = 4.46 \pm 0.01$ และ $b^* = -2.06 \pm 0.00$ จากนั้นใส่ตัวอย่างลงในคิวเวต จดค่า L^* , a^* , b^* เพื่อคำนวณการเปลี่ยนแปลงสี (The total color difference, ΔE) ของเซรัมทดสอบเทียบกับเซรัมควบคุม ดังสูตรที่ (5)

$$\Delta E = \sqrt{(a_c^* - a_s^*)^2 + (b_c^* - b_s^*)^2 + (L_c^* - L_s^*)^2} \quad (5)$$

โดย a_c^* , b_c^* , L_c^* คือ ค่าสีของเซรัมควบคุม และ a_s^* , b_s^* , L_s^* คือ ค่าสีของเซรัมทดสอบ

7.3 ทดสอบความระคายเคือง

ทดสอบภูมิแพ้ผิวหนังของอาสาสมัครจำนวน 15 คน ที่ไม่จำกัดเพศและช่วงอายุ โดยมีตัวอย่างทดสอบ ได้แก่ เซรัมสารสกัดลิกนินหลังการทำบริสุทธิ์ด้วยเยื่อเลือกผ่าน เซรัมสารสกัดตะกอนลิกนินที่ละลายด้วย เอนไซม์แลคเคส เซรัมวิตามินซี เซรัมวิตามินซีทางการค้า และน้ำปราศจากไอออนซึ่งเป็นตัวอย่างควบคุมเชิงลบ เริ่มต้นทำความสะอาดบริเวณหลังแขนของอาสาสมัครด้วยเอทานอลเพื่อล้างเอาน้ำมันและสิ่งสกปรกออก จากนั้นหยดตัวอย่างทดสอบปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในถาดหลุมอะลูมิเนียม (aluminium Finn

Chambers®) ที่มีขนาด 8 × 8 มิลลิเมตร แปะแผ่นทดสอบด้วยเทปผ้าลงบริเวณหลังแขนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบและให้ระดับการเกิดตุ่มแดง หรืออาการอักเสบของผิวหนังบริเวณพื้นที่ทดสอบหลังแกะผ้าที่เวลา 1 และ 24 ชั่วโมง ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะผื่นแดงและระดับการให้คะแนนผลการทดสอบภูมิแพ้ผิวหนัง (patch tech) ของ International contact dermatitis research group (ICDRG)

ระดับความรุนแรง	การแปลผล	ลักษณะปรากฏ
?+	ผลบวกไม่ชัดเจน (doubtful)	
+	ผลบวกอย่างอ่อน (weak reaction) มีผื่นนูนแดง แต่ไม่มีตุ่มน้ำ	
++	ผลบวกอย่างแรง (strong reaction) มีผื่นนูนแดง มีตุ่มใสขนาดเล็ก	
+++	ผลบวกอย่างรุนแรง (extreme reaction) มีผื่นนูนแดง มีตุ่มน้ำใส ขนาดใหญ่ หรือเป็นแผล	
IR	ปฏิกิริยาการแพ้แบบระคายเคือง	

8. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

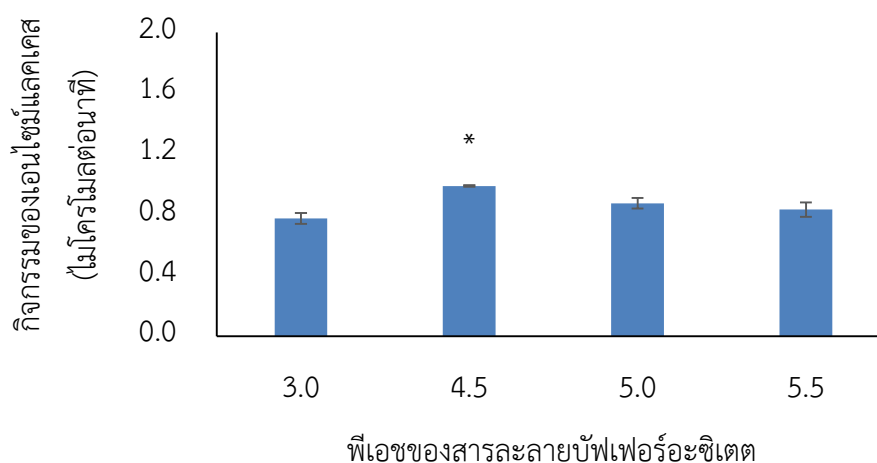
ศึกษาสภาวะการย่อยสารสกัดลิกันด้วยเอนไซม์แลคเคสแบบเปลี่ยนแปลงระดับของปัจจัยทีละ 1 ปัจจัย (One factor at a time) โดยวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล (Total phenolic content, TPC) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ จำนวน 3 ซ้ำ แสดงผลในรูปแบบของค่าเฉลี่ย (Mean) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และความแตกต่างของข้อมูลแบบ Duncan's multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรม Statistics Package for the Social Sciences 17 (SPSS, SPSS Inc.)

2. ผลการทำงานของเอนไซม์แลคเคสที่สภาวะต่างๆ ต่อสมบัติทางเคมีของสารสกัด

เนื่องด้วยการสกัดลิโนลินจากชานอ้อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่จัดเป็นวิธีการทางเคมี ยังคงได้ลิโนลินที่มีขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่ซึ่งส่งผลเสียต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด งานวิจัยจึงมีแนวความคิดใช้วิธีการทางชีวภาพที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมาช่วยลดขนาดโครงสร้างลิโนลินขนาดใหญ่ โดยเอนไซม์แลคเคสที่เลือกใช้มีรายงานถึงความสามารถในการแตกและลดขนาดมวโมเลกุลของลิโนลิน (Munk et al., 2015)

2.1 ผลของพีเอช

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์แลคเคส โดยเริ่มต้นแปรผันค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตด เนื่องด้วยเอนไซม์จัดเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลและเอไมด์ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงพีเอชจึงส่งผลต่อการแตกตัวของหมู่ฟังก์ชัน ทำให้โครงสร้างทางเคมีและกิจกรรมของเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลง (Saoudi et al., 2017) ผลการคำนวณหาค่ากิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์แลคเคสที่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารละลาย ABTS พบว่า ที่พีเอชของระบบเท่ากับ 4.5 ส่งผลให้เอนไซม์แลคเคสมีกิจกรรมสูงที่สุดคือ 0.98 ไมโครโมลต่อนาที (ภาพที่ 6) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Margot et al. (2013) ที่รายงานถึงสภาวะของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แลคเคสจากราขาว (*Trametes versicolor*) ว่าควรมีพีเอชในช่วงกรดอ่อน ประมาณ 4.0 ถึง 5.0

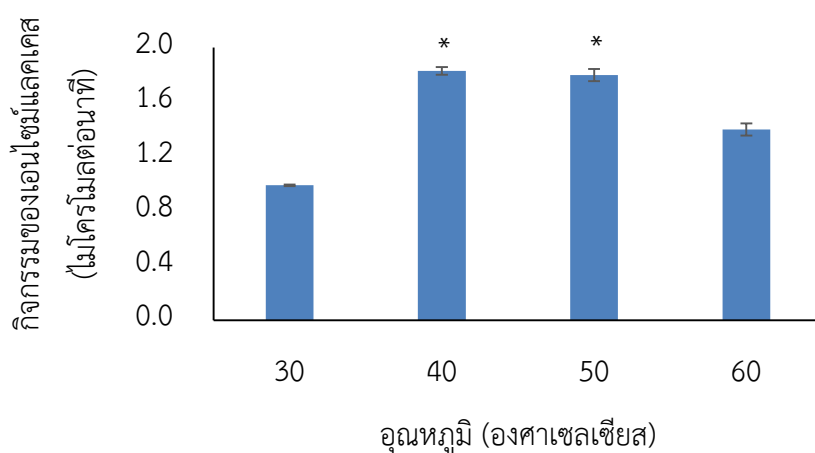


ภาพที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสที่พีเอชต่างๆ

หมายเหตุ เครื่องหมาย (*) แสดงค่าทางสถิติของตัวอย่างที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

2.2 ผลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิมีอิทธิพลอย่างมากต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยหากระบบที่มีอุณหภูมิสูงเกินไปส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง เนื่องจากโครงสร้างโปรตีนของเอนไซม์เกิดการเสียสภาพ และไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น (Margot et al, 2013) สำหรับผลของอุณหภูมิที่ทำให้เอนไซม์แลคเคสสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้สูงที่สุด คือ 40 และ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสที่ไม่แตกต่างกัน คือ ประมาณ 1.8 ไมโครโมลต่อนาที (ภาพที่ 7) สอดคล้องกับงานของ Hossain และ Anantharaman (2005) ที่แปรผันอุณหภูมิในการทำงานของเอนไซม์แลคเคส พบว่า การใช้อุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส ส่งผลให้เอนไซม์แลคเคสมีกิจกรรมในการย่อยผงขานอ้อยสูงสุด ดังนั้นในขั้นถัดไปของการทดลองจึงเลือกใช้ค่าพีเอชของระบบเท่ากับ 4.5 ที่อุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที



ภาพที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสที่อุณหภูมิต่างๆ

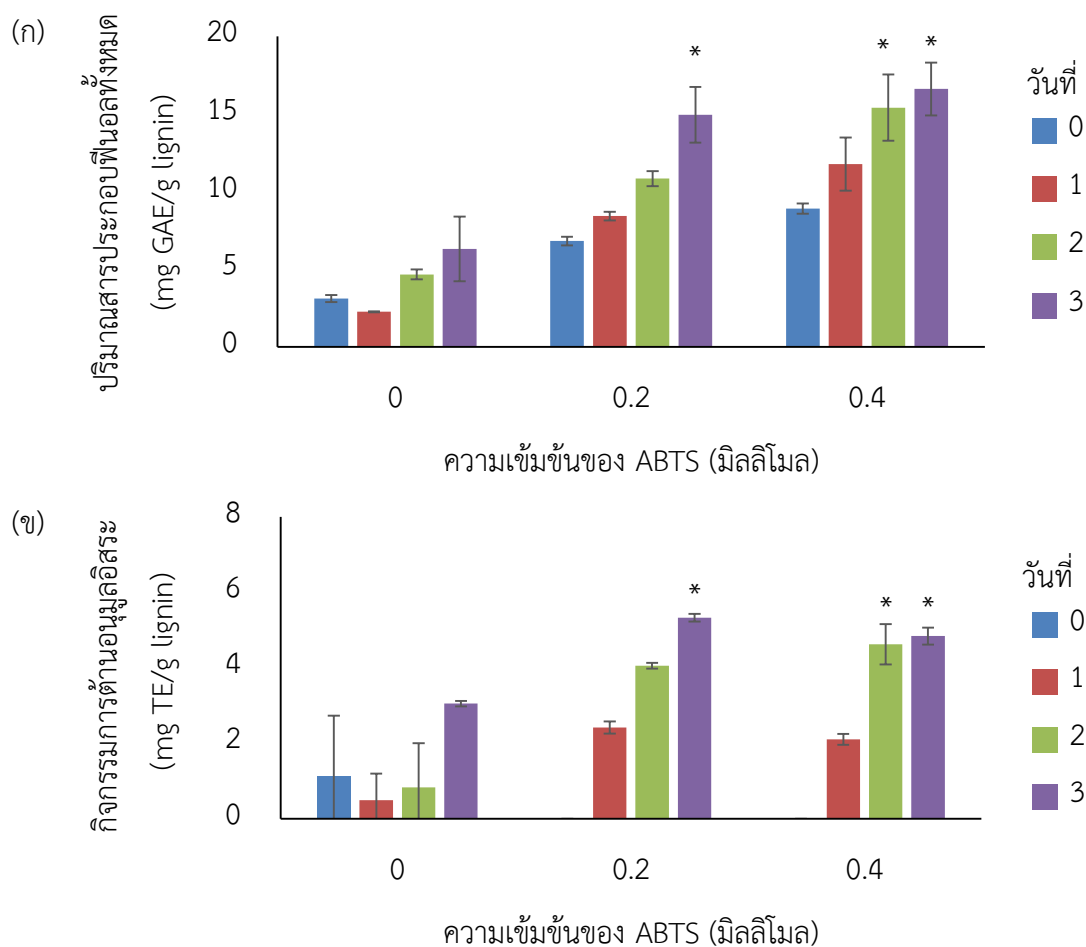
หมายเหตุ เครื่องหมาย (*) แสดงค่าทางสถิติของตัวอย่างที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

2.3 ผลของความเข้มข้นสารช่วยในการทำปฏิกิริยา ABTS

จากผลการศึกษาศักย์ภาพการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox potential) ซึ่งเป็นดัชนีที่แสดงถึงระดับความสามารถของเอนไซม์และหมู่ฟังก์ชันต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน พบว่า เอนไซม์แลคเคสมีประสิทธิภาพการแตกโครงสร้างของลิกนินที่ค่อนข้างต่ำ โดยมีค่าศักย์ภาพการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์อยู่ในช่วง 0.78 ถึง 0.8 โวลต์ จึงสามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้เพียงบริเวณหมู่ฟีนอลของลิกนิน ซึ่งมีสัดส่วนเพียงร้อยละ 10 ถึง 20 ของปริมาณหมู่ฟังก์ชันทั้งหมด ในขณะที่หน่วยย่อยบนโครงสร้างลิกนินที่ไม่ใช่

หมู่ฟีนอลมีปริมาณสูงถึงร้อยละ 80 มีค่าปฏิกิริยารีดอกซ์มากกว่า 1.5 โวลต์ จึงเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์แลคเคสเพื่อแตกโครงสร้างลิกนินบริเวณดังกล่าว (Munk et al., 2015) ดังนั้นการเติมสารช่วยทำปฏิกิริยา (mediator) จึงมีความจำเป็นต่อการทำงานของเอนไซม์ เนื่องด้วยสารดังกล่าวมีค่าปฏิกิริยารีดอกซ์สูง และมีโมเลกุลขนาดเล็กที่สามารถแพร่เข้าสู่โครงสร้างของลิกนิน จึงช่วยขนส่งอิเล็กตรอนระหว่างแลคเคสกับหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างลิกนิน โดยงานวิจัยนี้เลือกใช้ ABTS เป็นสารช่วยทำปฏิกิริยาเนื่องจากมีค่าศักยภาพการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์สูงมากกว่า 0.9 โวลต์ จึงสามารถช่วยการทำงานของเอนไซม์แลคเคสด้วยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับหน่วยย่อยที่ไม่ใช่หมู่ฟีนอลในโครงสร้างของลิกนิน (D'Acunzo et al., 2002; Yao et al., 2017)

ผลการเติม ABTS ร่วมกับการทำงานของเอนไซม์แลคเคส พบว่า ความเข้มข้นของสารและเวลาการทำปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้สารสกัดลิกนินที่ได้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (total phenolic content, TPC) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) เพิ่มขึ้นสูง โดยมีค่าสูงกว่าสารสกัดควบคุมที่ไม่มีสารช่วยทำปฏิกิริยา (ภาพที่ 8) ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของสารช่วยทำปฏิกิริยาที่ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์แลคเคสเพื่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับโครงสร้างของลิกนิน (ภาพที่ 8) โดยการใช้ ABTS ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมล เป็นเวลา 2 วัน ทำให้สารสกัดแสดงค่า TPC และ TEAC สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คือ 15.4 mgGAE/g lignin และ 6.6 mg TE/g lignin ตามลำดับ พร้อมใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อยที่สุด

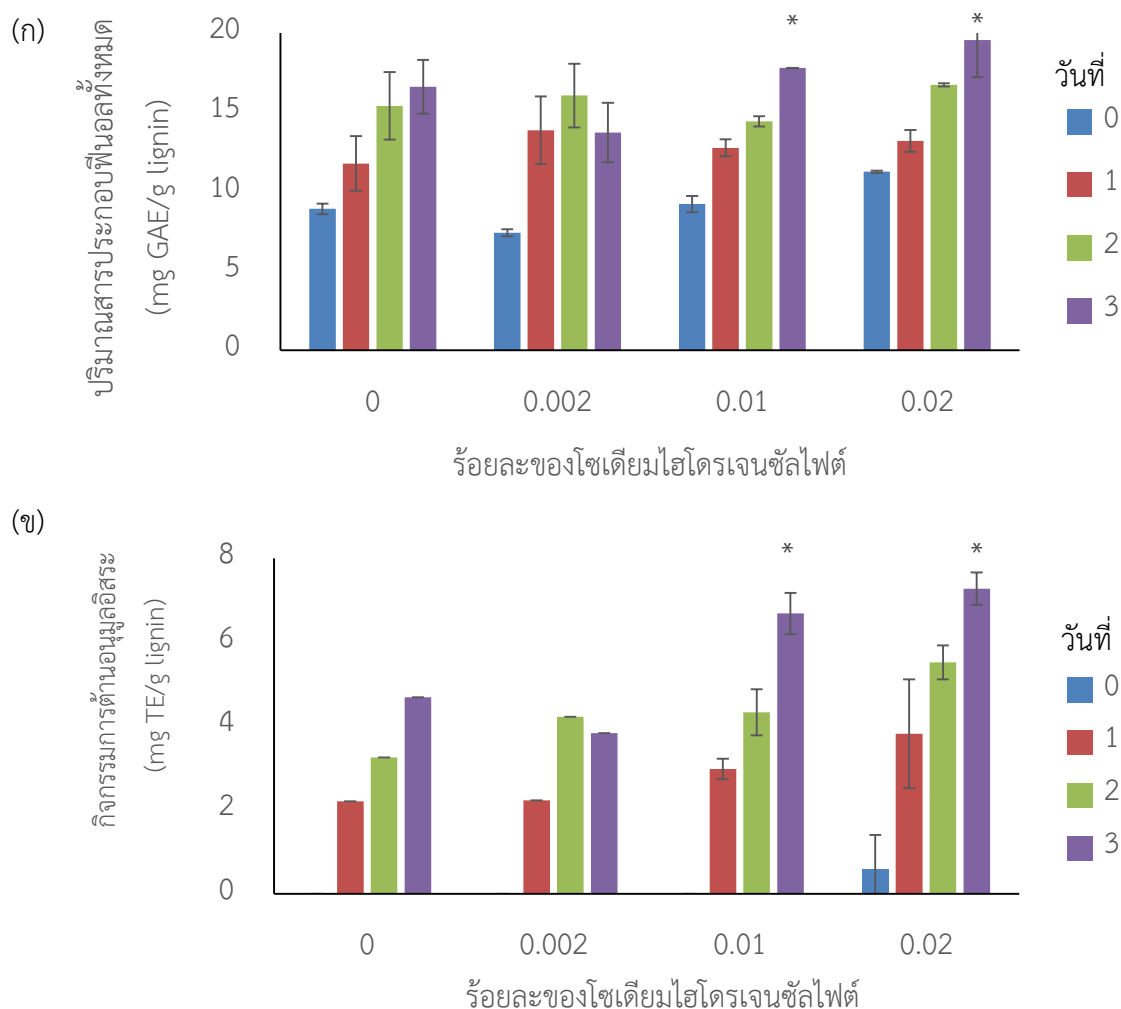


ภาพที่ 8 ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (ก) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (ข) ของสารสกัดลิกันหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส (0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ร่วมกับการแปรผันความเข้มข้นของ ABTS ที่ 0, 0.2 และ 0.4 มิลลิโมล ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลาที่ 200 รอบต่อนาที
หมายเหตุ เครื่องหมาย (*) แสดงค่าทางสถิติของสารสกัดลิกันที่ให้ค่า TPC หรือ TEAC สูงสุด ($p < 0.05$)

2.4 ผลของความเข้มข้นโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์

นอกจากการเติมสารช่วยทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มอัตราการเปลี่ยนโครงสร้างลิกันเพื่อให้ได้ซึ่งสารประกอบฟีนอลอีกหนึ่งปัจจัยที่ต้องคำนึง คือ เอนไซม์แลคเคสยังสามารถทำเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกัน โครงสร้างสารประกอบฟีนอลที่เป็นผลิตภัณฑ์หลักของระบบ จึงเป็นเหตุให้ค่า TPC และ TEAC ของสารสกัดมีค่าลดลง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงแปรผันการเติมโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาของหมู่ฟีนอลในระบบ (Ou et al., 2009) ผลการเติมโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ พบว่า ความเข้มข้นและเวลาการทำปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่า TPC และ TEAC ของสารสกัดลิกันมีค่าเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 9) โดยที่

ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 ร่วมกับการทำงานของเอนไซม์แลคเคส และสารละลาย ABTS เป็นเวลา 3 วันส่งผลให้ค่า TPC และ TEAC สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



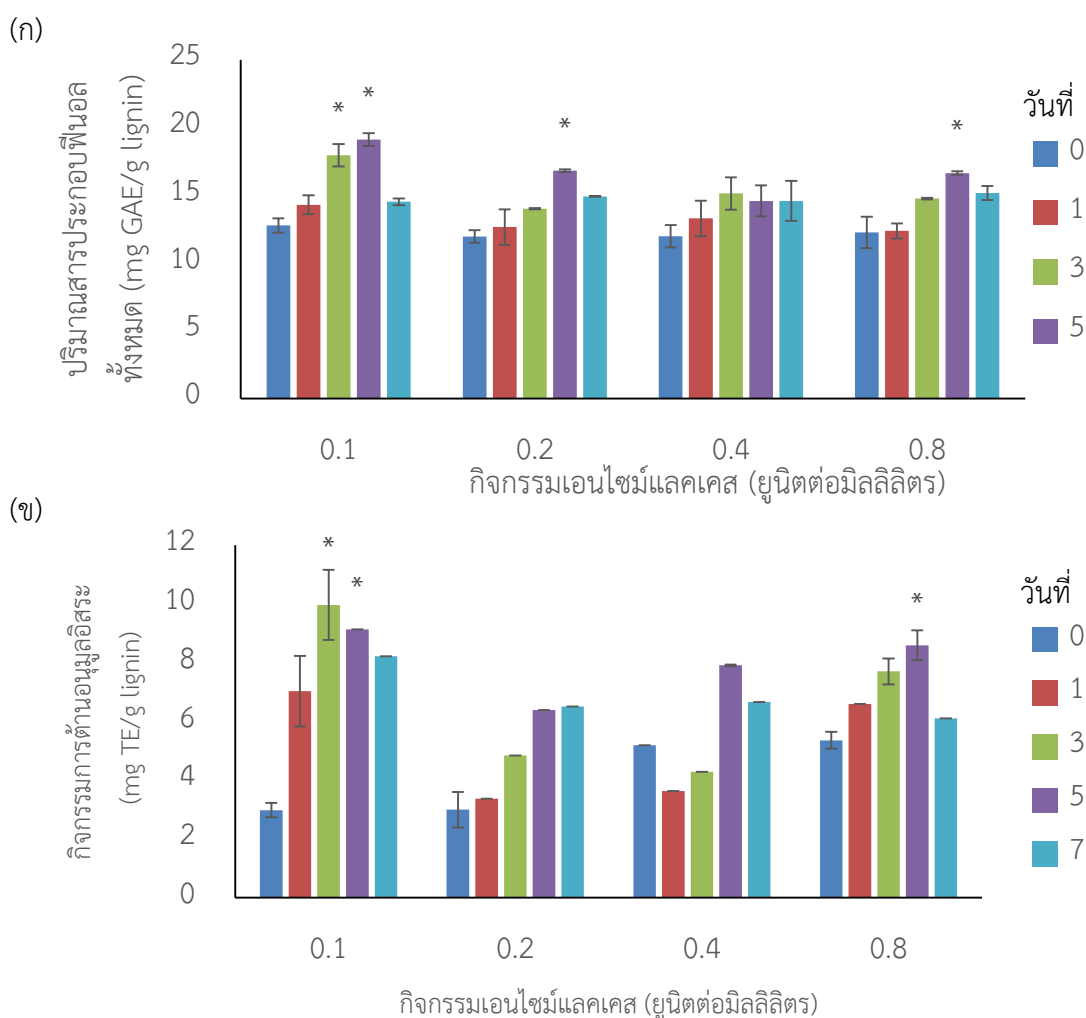
ภาพที่ 9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (ก) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (ข) ของสารสกัดลิ้นจี่หลังย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส (0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และ ABTS (0.4 มิลลิโมล) ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟต์ร้อยละ 0, 0.002, 0.01 และ 0.02 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที

หมายเหตุ เครื่องหมาย (*) แสดงค่าทางสถิติของสารสกัดลิ้นจี่ที่ให้ค่า TPC หรือ TEAC สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

2.5 ผลของความเข้มข้นเอนไซม์แลคเคส

หลังจากที่ได้สภาวะของการทำงานเอนไซม์ และอิทธิพลของสารช่วยในการทำปฏิกิริยาแล้ว ตัวแปรที่ศึกษาถัดไปคือ อิทธิพลของสัดส่วนเอนไซม์และปริมาณลิ้นจี่ตั้งต้น ผลการทดลองพบว่า การเพิ่มกิจกรรมของ

เอนไซม์ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่า TPC และ TEAC เนื่องด้วยปริมาณเอนไซม์แลคเคสที่มากเกินไป ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อหมู่ฟีนอลในสารสกัดที่ทำให้ค่า TPC และ TEAC ของสารสกัดกลินินมีค่าลดลง (ภาพที่ 10) โดยสภาวะที่ส่งผลให้สารสกัดกลินินมีค่า TPC และ TEAC สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) คือ การใช้เอนไซม์แลคเคสที่ 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ABTS ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมล และโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



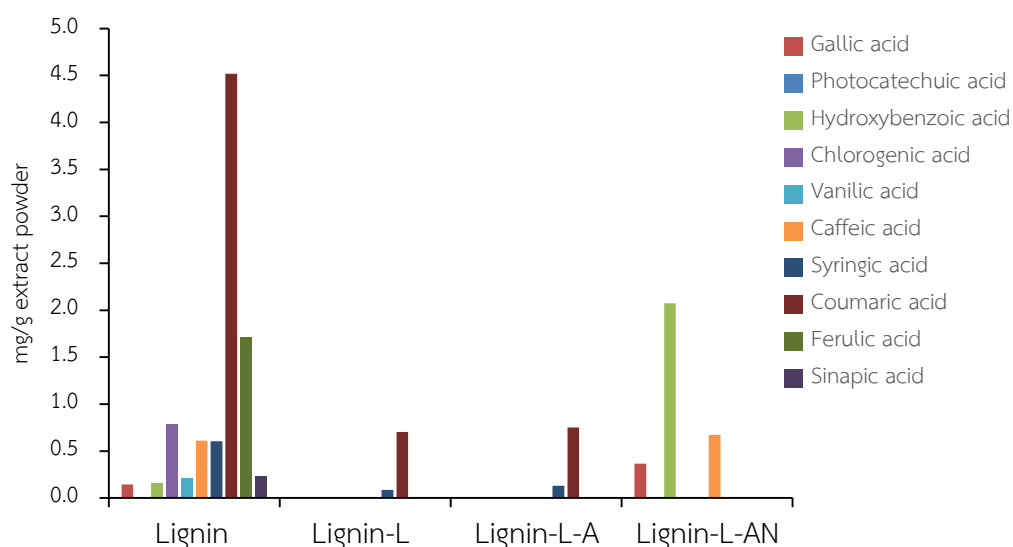
ภาพที่ 10 ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (ก) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (ข) ของสารสกัดกลินินหลังย่อยด้วยกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่ 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ร่วมกับสารละลาย ABTS (0.4 มิลลิโมล) และโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ (ร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที

หมายเหตุ เครื่องหมาย (*) แสดงค่าทางสถิติของสารสกัดกลินินที่ให้ค่า TPC หรือ TEAC สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

3. สมบัติทางกายภาพและเคมีของสารสกัดลิกนินหลังย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส

3.1 ชนิดของสารประกอบฟีนอล

วิเคราะห์ชนิดสารประกอบฟีนอลในผงสารสกัดลิกนินหลังย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคสที่สภาวะต่างๆ ด้วยเทคนิค High-performance liquid chromatography โดยติดตามปริมาณของสารประกอบฟีนอลมาตรฐานจำนวน 10 ชนิดที่มีรายงานว่าเป็นองค์ประกอบในสารสกัดลิกนินจากชานอ้อย ผลการทดลองพบว่า สารสกัดลิกนินควบคุม (lignin) ที่ไม่มีการย่อยด้วยเอนไซม์ ตรวจพบชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยรวมสูงที่สุด (ดังภาพที่ 11) ในขณะที่การเติมเอนไซม์แลคเคสเพียงอย่างเดียว (lignin-L) แสดงชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยรวมที่ลดลง ผลการทดลองดังกล่าวช่วยยืนยันการทำงานของเอนไซม์แลคเคสที่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับหมู่ฟีนอลในโครงสร้างลิกนิน ส่งผลให้โครงสร้างของลิกนินในสารสกัดมีขนาดโมเลกุลเล็กลง แต่ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบชนิดชนิดอื่น เช่น แอลดีไฮด์ และคีโตน (Christopher et al., 2014)

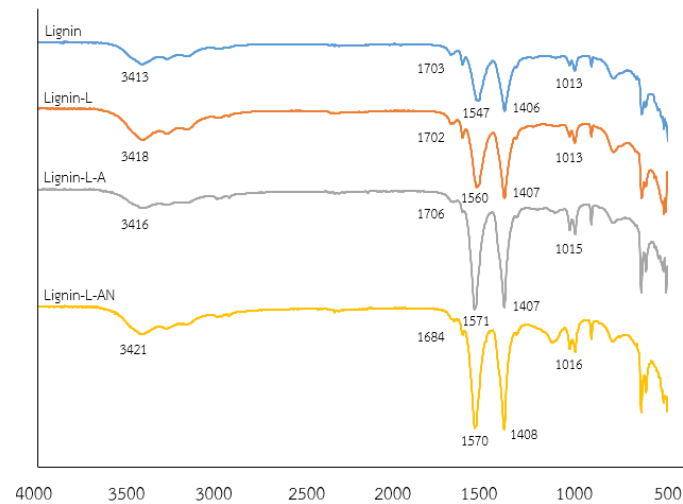


ภาพที่ 11 สารประกอบฟีนอลในผงสารสกัดลิกนินแบบต่างๆ; สารสกัดลิกนินควบคุมที่ไม่ย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส (Lignin); สารสกัดลิกนินที่ย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส (Lignin-L); สารสกัดลิกนินที่ย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส และมีการเติม ABTS (Lignin-L-A) และสารสกัดลิกนินที่ย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส และมีการเติม ABTS ร่วมกับโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Lignin-L-AN)

ในขณะที่ตัวอย่างสารสกัดลิกนินที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคสร่วมกับ ABTS (Lignin-L-A) มีปริมาณ syringic acid และ coumaric acid ที่มากกว่าตัวอย่าง lignin-L แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แลคเคสสามารถทำงานร่วมกับ ABTS และเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันบริเวณที่ไม่ใช่หมู่ฟีนอลในโครงสร้างลิกนิน สอดคล้องกับค่า TPC และ TEAC ของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น ส่วนตัวอย่างสารสกัดลิกนินที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส และมีการเติม ABTS ร่วมกับโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Lignin-L-AN) ตรวจพบปริมาณ gallic acid, hydroxybenzoic acid และ caffeic acid ที่มากกว่าสารสกัดควบคุม (lignin) ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นประสิทธิภาพของโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่สามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอล ส่งผลให้ค่า TPC และ TEAC ของสารสกัดที่มีค่าเพิ่มสูงขึ้น

3.2 โครงสร้างทางเคมี

วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารสกัดลิกนินแบบต่างๆ ด้วยเทคนิค Fourier-transform infrared spectroscopy ติดตามช่วงการดูดกลืนคลื่นแสงอินฟราเรดร่วมกับร้อยละความเข้มของแสงที่ทะลุผ่านสารตัวอย่าง (transmittance) ผลการทดลองพบว่า สารสกัดลิกนินที่ย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคสแสดงการสั่นของหมู่ O-H stretching (3410 อัตราส่วนเซนติเมตร) และ bending (1407 อัตราส่วนเซนติเมตร) ในโครงสร้างสารประกอบฟีนอล (ภาพที่ 12) โดยการสั่นบริเวณดังกล่าวมีความเข้มที่เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ในตัวอย่าง Lignin-L, Lignin-L-A และ Lignin-L-AN ตามลำดับ ผลดังกล่าวสนับสนุนการทำงานของเอนไซม์แลคเคสที่สามารถแตกโครงสร้างของลิกนิน และทำให้ค่า TPC ของสารสกัดลิกนินที่สภาวะต่างๆ มีค่าเพิ่มขึ้น ส่วนการสั่นของหมู่ C=C stretching ในโครงสร้างอะโรมาติก (1547 อัตราส่วนเซนติเมตร) ที่เพิ่มสูงขึ้น สื่อให้เห็นการทำงานของเอนไซม์แลคเคสอีกรูปแบบหนึ่งที่สามารถเกิดปฏิกิริยา polymerization ทำให้มอนอเมอร์ลิกนินบางส่วนในสารสกัดเกิดการรวมตัวกัน (Munk et al., 2015) นอกจากนี้การสั่นบริเวณ 1703 อัตราส่วนเซนติเมตร (C=O stretching) ที่เพิ่มมากขึ้น ยังสนับสนุนการทำงานของสารช่วยทำปฏิกิริยาที่สามารถช่วยให้เอนไซม์แลคเคสแตกโครงสร้างลิกนินได้ดีขึ้น และก่อให้เกิดสารประกอบแอลดีไฮด์หรือคีโตน (Christopher et al., 2014)



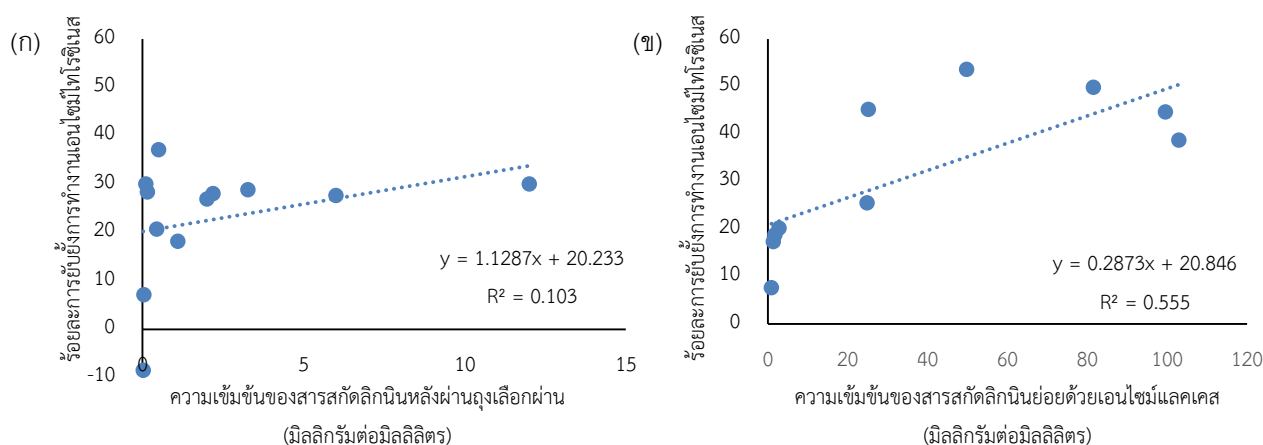
ภาพที่ 12 โครงสร้างทางเคมีของสารสกัดลิกนินแบบต่างๆ; สารสกัดลิกนินควบคุมที่ไม่ย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส (Lignin); สารสกัดลิกนินที่ย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส (Lignin-L); สารสกัดลิกนินที่ย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส และมีการเติม ABTS (Lignin-L-A) และสารสกัดลิกนินที่ย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส และมีการเติม ABTS ร่วมกับโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Lignin-L-AN)

3.3 ผลการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากผลของสารสกัดลิกนินที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคสร่วมกับ ABTS และโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Lignin-L-AN) แสดงค่า TPC และ TEAC ที่ค่อนข้างน้อย (20.51 mg GAE/g lignin extracts และ 12.57 mg TE/g lignin extracts ตามลำดับ) เมื่อเทียบกับสารสกัดลิกนินที่ได้จากโครงการวิจัยปี 60 ซึ่งคือสารสกัดลิกนินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยถุงเลือกผ่าน (dialysis) ที่มีค่า TPC และ TEAC เท่ากับ 73.25 mg GAE/g lignin extracts และ 218.74 mg TE/g lignin extracts ตามลำดับ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการนำสารสกัดลิกนินจากทั้งสองวิธีข้างต้นมาขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์เสริมทางเลือกจำนวน 2 สูตร โดยแผนงานวิจัยในส่วนถัดไปก่อนการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์เสริม คือ การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดสีเมลานิน และความกระจำใสของผิวหนัง รวมถึงกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์คลอลาจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการเกิดริ้วรอยบนใบหน้า (Ribeiro et al., 2015; Wuttisin et al., 2017)

ผลการตรวจสอบความสามารถของสารสกัดลิกนินทั้งสองแบบต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนส เพื่อไม่ให้เอนไซม์ดังกล่าวเข้าทำปฏิกิริยากับ L-DOPA และไม่ส่งผลให้เกิดการสร้างเมลานินที่มีสีน้ำตาลเข้ม (Ribeiro et al., 2015) ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์

กับกิจกรรมยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในระดับต่ำ (ภาพที่ 1) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Petrillo et al. (2016) ที่ศึกษาจลนพลศาสตร์ของสารสกัดจำพวกสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์จากดอกไม้ *Asphodelus microcarpus* ต่อความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวไม่มีความสัมพันธ์หรือเป็นอิสระจากความเข้มข้นของสารสกัดดอกไม้ โดยผลของจลนพลศาสตร์ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากดอกไม้ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งในระบบมีสมบัติการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (noncompetitive inhibition) กล่าวคือ สารสกัดไม่เข้าจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์โดยตรง แต่ยับยั้งด้วยการรบกวนการเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์และสารตั้งต้น ซึ่งในกรณีของสารสกัดกลินินอาจเกิดจากองค์ประกอบของสารสกัดที่มีหลากหลาย และมีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ จึงยากต่อการเข้าทำปฏิกิริยายับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส สำหรับสารสกัดกลินินที่ทำปฏิกิริยาดังกล่าวโดยเลือกผ่านสามารถแสดงกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุดได้ประมาณร้อยละ 30 ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดกลินินที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคสสามารถแสดงกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ได้ร้อยละ 30 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัดกลินินที่ได้จากเยื่อเลือกผ่านอาจมีขนาดมวลโมเลกุลของกลินินที่เล็กกว่า รวมทั้งมีองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลที่มากกว่าสารสกัดกลินินที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคสซึ่งสอดคล้องกับผล TPC ของสารสกัดกลินินทั้งสองชนิด ที่มีค่าเท่ากับ 73.25 และ 26.62 mg GAE/g extract ตามลำดับ จึงสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้ความเข้มข้นที่น้อยกว่าเนื่องจากด้วยหมู่ไฮดรอกซิลบนโครงสร้างของสารประกอบต่างๆ โดยเฉพาะในสารประกอบฟีนอล สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ และทำให้เอนไซม์ไทโรซิเนสไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับ L-DOPA ที่เป็นสับสเตรทของระบบ (Alam et al., 2012)



ภาพที่ 13 ร้อยละกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ (ก) สารสกัดกลินินหลังผ่านการทำปฏิกิริยาดังกล่าวและ (ข) สารสกัด Lignin-L-AN

3.4 กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส

อีกคุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญของสารสกัดลิกนินที่ส่งผลต่อการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เซรัม คือ การยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส เนื่องด้วยเอนไซม์ดังกล่าวสามารถสลายและทำลายคอลลาเจน รวมถึงเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ภายในชั้นผิวหนัง ซึ่งเป็นสาเหตุของความหย่อนคล้อย และริ้วรอย (Ghimeray et al., 2015) งานวิจัยนี้วิเคราะห์กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนสของสารสกัดลิกนินหลังทำบริสุทธิ์ด้วยถุงเลือกผ่าน และสารสกัดลิกนินที่ย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส เพื่อนำไปผลิตเซรัมสำหรับหน้าจำนวน 2 สูตร โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถแสดงกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงสุดร้อยละ 30 ซึ่งเป็นผลจากการทดลองก่อนหน้า คือ การใช้สารสกัดลิกนินที่ทำบริสุทธิ์ด้วยถุงเลือกผ่าน และสารสกัดลิกนินที่ย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส ที่ความเข้มข้น 2.00 และ 25.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า สารทั้งสองชนิดแสดงกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ได้ประมาณร้อยละ 90 (ตารางที่ 2) ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสารประกอบฟีนอลที่พบในสารสกัดทั้งสองชนิดสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับบริเวณเร่งของเอนไซม์คอลลาจิเนสที่มีส่วนประกอบของเหล็ก (zinc-containing metalloproteinase) (Thring et al., 2009)

ตารางที่ 2 ร้อยละกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนสของสารสกัดลิกนินหลังผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยถุงเลือกผ่าน และสารสกัด Lignin-L-AN

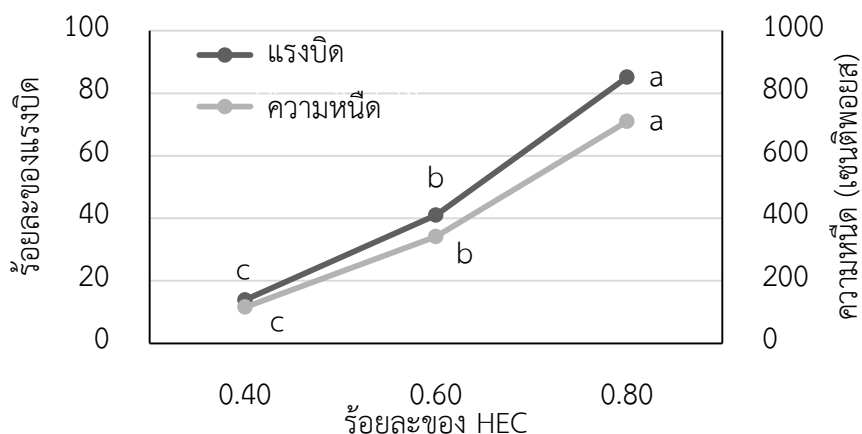
ตัวอย่าง	ร้อยละกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส
สารสกัดลิกนินหลังผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยถุงเลือกผ่าน	91.46 ± 0.40^a
สารสกัด Lignin-L-AN	89.67 ± 1.51^a

4. เซรัมสารสกัดลิกนิน

4.1 ความหนืดของเซรัม

ความหนืดเป็นปัจจัยสำคัญในการประเมินสมบัติของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์ที่สื่อถึงความสามารถในการแพร่กระจาย รวมไปถึงลักษณะบรรจุภัณฑ์เพื่อความสะดวกต่อการใช้งานผลิตภัณฑ์ (Donglikar and Deore, 2017) งานวิจัยนี้เลือกใช้ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (hydroxyethyl cellulose, HEC) ที่เป็นสารให้ความหนืดแบบไม่มีประจุ จึงช่วยลดโอกาสการแพ้ ระคายเคืองต่อผิวหนัง ผลการแปรผันปริมาณ HEC ต่อความหนืดของเซรัมควบคุมที่ไม่มีสารสกัด พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ HEC ส่งผลให้ค่าแรงบิด (torque) และความหนืดของเซรัมเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 14 ส่วนปริมาณ

HEC ที่มีความเหมาะสมกับผลิตภัณฑ์เซรัมสารสกัดลิคินิน คือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 โดยน้ำหนัก ซึ่งให้เนื้อสัมผัสและความหนืดของเซรัมที่ใกล้เคียงกับเซรัมทางการค้าที่มีความหนืด เท่ากับ 6.36 ± 364.50 เซนติพอยส



ภาพที่ 14 แรงบิด (torque) และความหนืดของเซรัมควบคุมที่แปรผันความเข้มข้นของไฮดรอกซีเอทิล-เซลลูโลส (hydroxyethyl cellulose, HEC) ที่ร้อยละ 0.40, 0.60 และ 0.80 โดยน้ำหนัก

4.2 สีของเซรัม

สีของเนื้อเซรัมจัดเป็นเอกลักษณ์ที่สำคัญอย่างหนึ่งของผลิตภัณฑ์ที่ช่วยดึงดูดการตัดสินใจซื้อสินค้าของผู้บริโภค ผลตรวจสอบพบว่า เซรัมควบคุมที่ไม่เติมสารสกัดมีสีใส โดยแสดงค่าความสว่าง (lightness, L^*) สูงที่สุด พร้อมแสดงค่าสีแดง (redness, a^*) และสีเหลือง (yellowness, b^*) ที่น้อยสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยการเติมสารสกัดลิคินินทั้งสองชนิดส่งผลให้ผลิตภัณฑ์เซรัมที่ได้มีสีน้ำตาล (ตารางที่ 3) ซึ่งเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีสารสกัด พบว่า เซรัมทั้งสองชนิดแสดงค่าการเปลี่ยนแปลงสี (color difference, ΔE) ที่มากขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดลิคินินที่เพิ่มขึ้นในสูตรของเซรัม

ตารางที่ 3 สีของเซรัมควบคุม เซรัมที่เติมสารสกัดลิกนินหลังการสกัดด้วยด่างและทำบริสุทธิ์ด้วยถุงเลือกผ่าน และเซรัมที่เติมสารสกัดลิกนินที่ย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส

เซรัม	L^*	a^*	b^*	ΔE	สีของเซรัม
ตัวอย่างควบคุม ที่ไม่มีสารสกัด	86.32 ± 0.03^a	3.63 ± 0.02^c	-5.94 ± 0.01^c	-	
สารสกัดลิกนินหลัง ผ่านการทำบริสุทธิ์ ด้วยถุงเลือกผ่าน	41.49 ± 0.17^b	11.93 ± 0.02^a	12.18 ± 0.19^a	48.73 ± 0.72^b	
สารสกัด Lignin-L- AN	31.93 ± 0.64^c	4.02 ± 0.18^b	-2.10 ± 0.08^b	54.59 ± 0.58^a	

4.3 ทดสอบความระคายเคือง

การเกิดผื่นแพ้สัมผัส (Allergic contact Dermatitis คือ การตอบสนองภูมิคุ้มกันในร่างกายด้วย (ปฏิกิริยาการอักเสบต่อสารที่มาสัมผัส) Nelson and Mowad, 2010) โดยการทดสอบการระคายเคือง (patch test) เป็นเครื่องมือที่นิยมใช้ในการระบุสาเหตุของโรคผิวหนังอักเสบจากการสัมผัสสารต่างๆ ทางผิวหนัง (etiologic agent) (Lazzarini et al., 2013)

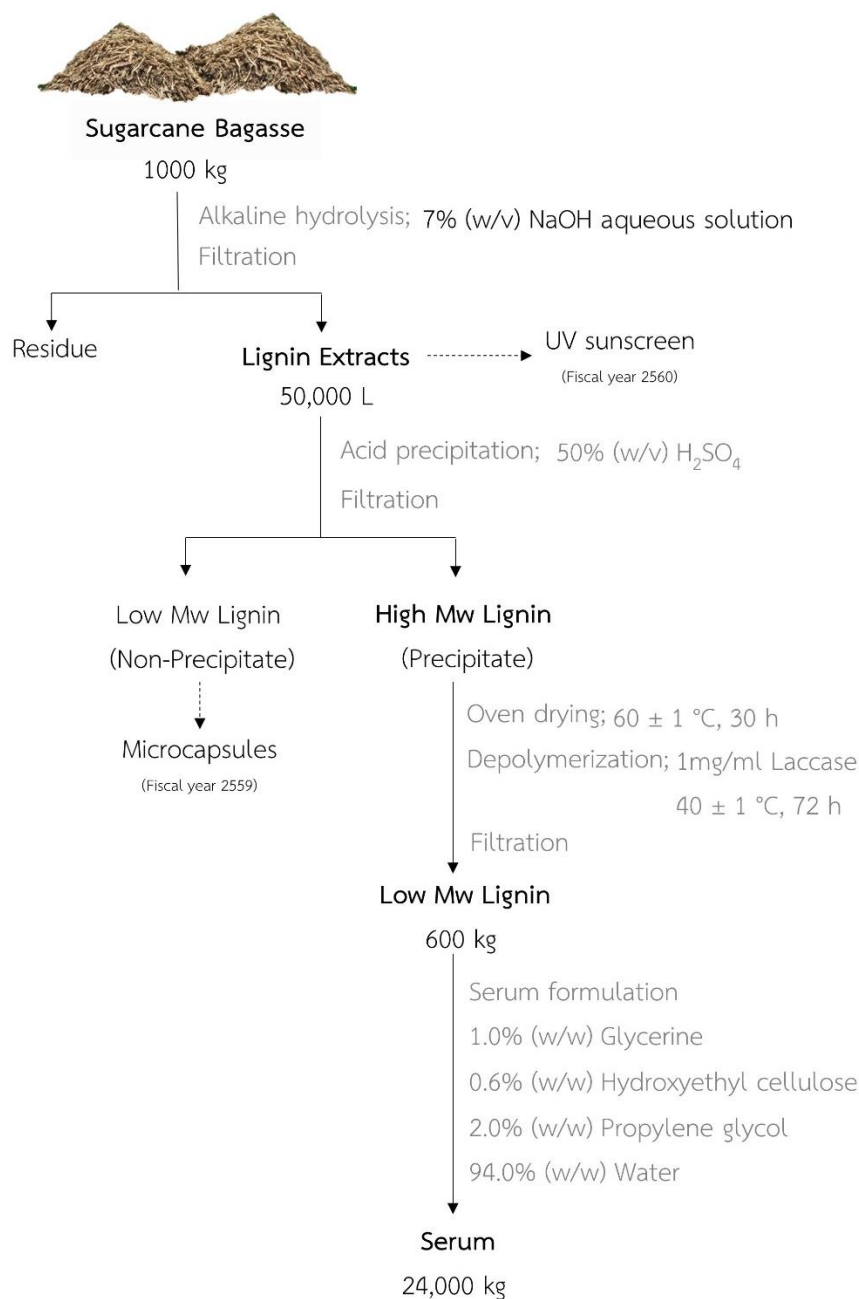


ภาพที่ 15 ผลการทดสอบความระคายเคือง

ผลการทดสอบการแพ้ และระคายเคืองของเซรัมสารสกัดลิกนินทั้งสองชนิด รวมไปถึงเซรัมควบคุมทางการค้า และตัวอย่างทดสอบเชิงลบ ไม่ปรากฏอาการแพ้หรือตุ่มแดงใดๆ ในบริเวณทดสอบของผู้ทดลองทั้งหมด คน 15 ทั้งหลังช่วงเวลาทดสอบที่ 24 ชั่วโมง และการติดตามอาการหลังการทดสอบอีก 24 ชั่วโมง

5. ต้นทุนการผลิตเซรัมสำหรับหน้า

การคำนวณต้นทุนรวมถึงมูลค่าทางเศรษฐศาสตร์ของการผลิตเซรัมสำหรับหน้าที่มีส่วนประกอบของสารกัตลินินที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคสอ้างอิงจากแผนการดำเนินงานในระดับห้องปฏิบัติการดังแสดงในภาพที่ 16 ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถใช้ประกอบการพิจารณาเพื่อการขยายระดับการผลิตสู่ระดับอุตสาหกรรมในอนาคต



ภาพที่ 16 แผนภาพการดำเนินงานและผลลัพธ์ที่ได้จากงานวิจัย

ในส่วนการผลิตเสริมสำหรับหน้าจากสารสกัดลิกลินที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคสจำนวน 1 กิโลกรัม พบว่า ใช้ต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่า 1 บาท (ตารางที่ 4) โดยมูลค่างกล่าวมีค่าที่ต่ำกว่าประมาณ 7 เท่า เมื่อเทียบกับเสริมวิตามินซีสังเคราะห์ที่ทดลองทำขึ้นในห้องปฏิบัติการ เนื่องด้วยความแตกต่างด้านราคาของวัตถุดิบตั้งต้น โดยชานอ้อยเหลือทิ้งมีราคาเพียงตันละประมาณ 400 บาท ซึ่งผลการประเมินต้นทุนการผลิตข้างต้นถือเป็นจุดแข็งที่สำคัญอย่างหนึ่งของผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตามการประเมินดังกล่าวยังเป็นเพียงการคำนวณการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ ยังไม่ได้รวมต้นทุนในส่วนของการจัดตั้งโรงงาน เครื่องจักร และค่าพลังงาน ซึ่งค่าใช้จ่ายในส่วนดังกล่าวมีความจำเป็นที่ต้องไปศึกษาในรายละเอียดเพิ่มเติมต่อไป

ตารางที่ 4 ต้นทุนการผลิตเสริมจากสารสกัดลิกลินที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคสในระดับห้องปฏิบัติการ

รายละเอียด	ราคา (บาท)
วัตถุดิบตั้งต้น: ปริมาณชานอ้อย 1 ตัน	400
ผลิตภัณฑ์: ผงสารสกัดลิกลินผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แลคเคส	19,368,400
ผลิตภัณฑ์: สารประกอบในการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์เสริม	860,160
ราคาต้นทุนรวมส่วนผลิตภัณฑ์	19,437,212.80
ราคาต้นทุนของผลิตภัณฑ์เสริมต่อกิโลกรัม	0.81

บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา

การใช้เอนไซม์แลคเคสสามารถแตกโครงสร้างของลิกนินในสารสกัดได้ งานวิจัยเริ่มต้นจากการสกัดลิกนินออกจากชานอ้อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 นาที โดยแสดงผลได้ของลิกนินสูงถึงร้อยละ 76.40 ซึ่งเป็นผลการสกัดที่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่น สำหรับสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยโครงสร้างลิกนินในสารสกัด คือ การใช้เอนไซม์แลคเคสที่ 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สารช่วยทำปฏิกิริยา ABTS ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมล โซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งเป็นผลให้สารสกัดแสดงค่า TPC และ TEAC ที่เพิ่มสูงขึ้นกว่าสารสกัดลิกนินหลังการสกัดด้วยด่าง ซึ่งช่วยยืนยันผลการทำงานของเอนไซม์แลคเคสในการแตกโครงสร้างลิกนินให้ได้สารประกอบฟีนอล โดยสารสกัดที่ได้ยังสามารถแสดงกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และเอนไซม์คลอลาจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดสี และความอ่อนคล้อยของผิวหนังได้สูงถึงร้อยละ 30 และ 90 ตามลำดับ จึงเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้สารสกัดลิกนินในผลิตภัณฑ์เสริมสำหรับหน้าที่ ซึ่งผลการใส่สารสกัดลิกนินลงในเซรัมส่งผลให้เนื้อผลิตภัณฑ์มีสีน้ำตาลเข้ม โดยไม่แสดงการแพ้ และระคายเคืองต่อผู้เข้าทดสอบ ยิ่งไปกว่านี้ผลการประเมินต้นทุนในการผลิตเซรัมจากสารสกัดลิกนินยังมีราคาต่ำมากซึ่งเหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาต่อยอดในระดับอุตสาหกรรมต่อไป