รายงานวิจัยเรื่อง

การเพิ่มคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นโดยการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีด้วยการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปส

Modified Virgin Coconut Oils with Broad Antioxidant and Antimicrobial Spectrum by Application of Lipase

นายฉัตรชัย สังข์ผุด

มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

พ.ศ. 2558

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ผ่านงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2557 ของมหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

รายงานวิจัยเรื่อง

การเพิ่มคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นโดยการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีด้วยการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปส

Modified Virgin Coconut Oils with Broad Antioxidant and Antimicrobial Spectrum by Application of Lipase

นายฉัตรชัย สังข์ผุด

มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

พ.ศ. 2558

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ผ่านงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2557 ของมหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

ชื่อภาษาไทย การเพิ่มคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นโดยการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีด้วยการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปส

ชื่อภาษาอังกฤษ Modified Virgin Coconut Oils with Broad Antioxidant and Antimicrobial Spectrum by Application of Lipase

ชื่อผู้วิจัย นายฉัตรชัย สังข์ผุด หัวหน้าโครงการวิจัย

ปีที่วิจัย 2557-2558

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไลเปสเป็นอีกหนึ่งชนิดของเอนไซม์ที่มีการวิจัยพัฒนาและผลิตจำหน่ายกันเป็นทางการค้า เนื่องจากมีคุณสมบัติเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายกรดไขมัน สังเคราะห์เอสเทอร์ และแลกเปลี่ยนหมู่เอสเทอร์ จึงมีการนำมาใช้สำหรับการย่อยสลายหรือปรับเปลี่ยนโครงสร้างของน้ำมันและไขมันเพื่อให้มีคุณสมบัติต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการใช้งานในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง และเภสัชกรรม เป็นต้น การดัดแปลงโครงสร้างของน้ำมันมะพร้าวโดยใช้เอนไซม์ไลเปสคาดว่าจะมีผลทำให้เพิ่มคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันได้ในวงกว้างขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของกรดไขมันอิสระสายกลาง และโมโนกลีเซอไรด์ของกรดไขมันสายกลาง เช่นโมโนลอริน

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเอนไซม์ 6 แหล่ง คือ ไลเปส AY, M, F-AP15, PS, D และ Pancreatic lipase และควบคุมสภาวะที่เหมาะสมต่อการใช้เอนไซม์ไลเปสในการเพิ่มคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยการดัดแปลงโครงสร้างของน้ำมันในระหว่างขั้นตอนการหมักสกัด นำน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงมาทดสอบคุณภาพและการเปลี่ยนคุณภาพในระหว่างเก็บรักษา ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิว พร้อมทดสอบคุณสมบัติและความพึงพอใจของผู้ใช้ ผลการวิจัย พบว่า ผลการใช้เอนไซม์ไลเปส D เป็นตัวเร่งการดัดแปลงโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันก่อนหมักแยกสามารถให้ปริมาณผลผลิตน้ำมันมะพร้าวดัดแปลง ค่ากรด คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH radical scavenging capacity assay และสมบัติการต้านเชื้อจุลินทรีย์ *S. aureus* และ *E. coli* เมื่อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion method สูงสุด และมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับผลการใช้เอนไซม์ไลเปสชนิดอื่น ๆ

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคือขูดเนื้อมะพร้าวระยะสุกห้าวมาคั้นด้วยความดัน 40 ปอนด์/ตารางนิ้ว นำน้ำกะทิที่ได้ผสมกับน้ำ 1 1 ปั่นผสม 1,500 รอบต่อนาที เวลา 15 นาที แล้วแช่เย็นที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง แยกเอาเฉพาะครีมมาใส่ขวดโหลเติมกลีเซอรอล 25 มก./ ก.ก.เติมเอนไซม์ไลเปส D เตรียมในสารละลาย 1.0 M phosphate buffer พีเอช 6.0 เข้มข้น

10 มก./มล. จำนวน 10 มิลลิลิตรกวนผสม 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที หมักในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเกิดการแยกชั้นของน้ำมันที่สมบูรณ์ ตักส่วนน้ำมันมากรองด้วยกระดาษทิชชูแล้วอังในอ่างน้ำร้อน เวลา 1 ชั่วโมง บรรจุขวดไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจนแล้วปิดฝา พบว่า จะได้น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงสีขาวนวล มีกลิ่นฉุน และมีความหนืดที่สูงกว่าน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ โดยได้ปริมาณผลผลิตของเท่ากับ 30-33% ของครีม มีค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก 44% และค่ากรด 122

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH assay พบว่า น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงมีค่า IC_{50} สูงกว่าน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ 2 เท่า คือ 47-67 และ 106.31 mg/ml ตามลำดับ ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งกับเชื้อด้วยวิธี disk diffusion method พบว่า น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างความเข้มข้น 6.25% มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* เทียบเท่ากับฟีนอล 15% คือสูงกว่าประมาณ 2 เท่า น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงมีค่าเปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระในรูปกรดลอริก (%FFA) สูงมากเท่ากับ 44% แต่มีค่าความชื้น ค่าซาพอนิฟิเคชัน ค่าเพอร์ออกไซด์ อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของ มผช. 670/2547 และมาตรฐาน อย. ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 57 (พ.ศ. 2524) โดยมีความชื้น 0.16% ค่าซาพอนิฟิเคชัน 249 มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อน้ำมัน 1 กรัม ค่าเพอร์ออกไซด์ 3.74-4.43 มิลลิกรัมสมมูลเพอร์ออกไซด์ออกซิเจนต่อกิโลกรัมน้ำมัน เมื่อนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิว พบว่า ผลิตภัณฑ์มีสีขาวนวล พีเอช 3.91-4.22 เนื้อเจลมีลักษณะข้นเนียน มีฟองอากาศน้อย และไม่เหนียวเหนอะ มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ได้โดยไม่จำเป็นต้องใช้กรดซาลิซิลิก และอาสาสมัครมีความพึงพอใจต่อลักษณะปรากฏและคุณสมบัติต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์ในภาพรวมระดับปานกลางถึงมาก ยกเว้นด้านกลิ่นที่ด้อยกว่าผลการใช้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์

คำสำคัญ: เอนไซม์ไลเปส น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น การต้านอนุมูลอิสระ การต้านเชื้อจุลินทรีย์

Research Title Modified Virgin Coconut Oils with Broad Antioxidant and Antimicrobial Spectrum by Application of Lipase

Researcher Mr. Chatchai Sungpud

Organization Nakhon Si Thammarat Rajabhat University

Years 2014-2015

ABSTRACT

Lipase is an enzyme that kind of research, development and manufacturing as well as trade. Due to qualify catalytic hydrolysis, ester synthesis and transesterification reaction. It has been used for decomposition or modification of the structure of the oil and fat. In order to have different properties that are suitable for use in pharmaceutical, cosmetic and food industries. The modified structure of coconut oil using lipase is expected to result in enhanced antimicrobial properties and antioxidants, have a wider range of oil. This is the result of the work of medium chain fatty acids (MCFA). And mono-glycerides of medium chain fatty acids such as monolaurin.

This research aims to screening enzyme 6 sources lipase AY, M, F-AP15, PS, D and Pancreatic lipase and optimized conditions to enhance the properties of antioxidants and antimicrobial by altering the structure of the oil extracted in the process of fermentation. Modified coconut oil is used to test the quality and the quality during storage. Acne gel product is produced. And testing of the product and satisfaction of users. The results showed that the use of lipase catalyst D is a modification of the triglyceride oil extracted before fermentation. Oil yield, acid value, antioxidant properties by DPPH radical scavenging capacity assay and antimicrobial properties of *S. aureus* and *E. coli* when tested by disc diffusion method and a maximum difference was statistically significant ($P<0.05$) with the use of other kinds of lipase.

Optimization of production is at a mature stage dashing crushed coconut meat. Then squeeze the pressure of 40 lbs/inch^2. Bring the milk to be mixed with water 1: 1 stirring 1500 rpm for 15 minutes and then frozen at -18 °C for 2 hours, remove the cream filled in jar containing long round shape. Adding glycerol 25 mg/kg, lipase D prepared in a solution 1.0 M phosphate buffer, pH 6.0 concentration 10 mg/ml, 10 ml, stirring 1500 rpm at 30-35 °C for 30 minutes, and incubated at 35 °C for 24 hours to achieve complete separation of oil. Loading separating the oil layer. Purified by filtration with a tissue. Removal of water with a soak in the hot tub at 1 hour after bottling the air with nitrogen, then cover. Modified coconut oil has been found to be white

with a pungent odor and a viscosity greater than virgin coconut oil The yield of 30-33% of the value of cream, %FFA in the form of lauric acid is 44% and acid value is 122.

Test the antioxidant activity in DPPH assay showed that the modified coconut oil, virgin coconut oil with IC_{50} values higher than two times 47-67 and 106.31 mg/ml, respectively inhibition test against infection by disk diffusion method, found that the modified coconut oil has a concentration of 6 25% inhibition of *S. aureus* and *E. coli*, equivalent to 15% of phenol was approximately two times higher. Modified coconut oil is the percentage of free fatty acids in lauric acid (%FFA) is very high as 44%, but moisture content, saponification value, peroxide value and anisidine value were 0 16%, 249 mg KOH/g oil and 3.74-4.43 meq/kg respectively, which are better than the product standards of Thai Industrial Standards Institute, OTOP standard 670/2004 and Thai Food and Drug Administration, notification No. 57 (1981). When used to produce a gel acne products that are white gel, pH 3 91- 4.22, gel is thick and smooth A few bubbles and not sticky. Gel is effective in inhibiting *S aureus* bacteria without the need to use salicylic acid group. And volunteers were satisfied with the appearance and features of the product include moderate to high levels. Except for the smell worse than the result of virgin coconut oil.

Keywords: Lipase, Virgin Coconut Oil, Antioxidant, Antimicrobial

คำนำ

น้ำมันมะพร้าวเป็นอีกหนึ่งผลิตภัณฑ์ที่สร้างมูลค่าเพิ่มให้กับมะพร้าวซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นภาคใต้เพราะมีสรรพคุณที่โดดเด่นทั้งในอาหาร ยา และเครื่องสำอาง ปัจจุบันมีรายงานผลการวิจัยเกี่ยวกับการทดสอบคุณสมบัติของน้ำมันมะพร้าวที่มีผลดีต่อสุขภาพในมิติต่าง ๆ อย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะผลมาจากการทำงานกรดไขมันอิสระสายกลาง และโมโนกลีเซอไรด์ของกรดไขมันสายกลาง เช่น โมโนลอริน เป็นต้น ที่มีผลทำให้เพิ่มคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันได้ในวงกว้างขึ้น และมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและเมทาบอลิซึมของไขมันได้ดี ทำให้มีอัตราความต้องการน้ำมันมะพร้าวทั้งด้านคุณภาพและปริมาณในอัตราที่สูงขึ้น วิธีการสกัดน้ำมันมะพร้าวทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีทางกายภาพ เคมี และการหมักด้วยจุลินทรีย์หรือเอนไซม์ การดัดแปลงโครงสร้างของน้ำมันมะพร้าวให้อยู่ในรูปกรดไขมันอิสระสายกลางและโมโนกลีเซอไรด์ของกรดไขมันสายกลางมากที่สุด เป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับการเพิ่มคุณสมบัติของน้ำมันมะพร้าว งานวิจัยนี้ได้นำเสนอผลการคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสชนิดต่าง ๆ และควบคุมสภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาการดัดแปลงโครงสร้างเพื่อเพิ่มคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ โดยการเติมเอนไซม์ไลเปสในระหว่างขั้นตอนการหมักสกัด ศึกษาคุณภาพและการเปลี่ยนคุณภาพในระหว่างเก็บรักษาน้ำมันมะพร้าวดัดแปลง การผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นสำหรับแต้มสิว พร้อมการทดสอบคุณสมบัติและความพึงพอใจของผู้ใช้ ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานวิจัยฉบับนี้สามารถใช้เป็นแหล่งข้อมูลสำหรับการเรียนรู้ เพื่อใช้ประโยชน์สำหรับการศึกษาค้นคว้าของนักเรียน นักศึกษา นักธุรกิจ นักวิชาการ และบุคคลผู้สนใจทั่วไป

ฉัตรชัย สังข์ผุด

2558

NAKHON SI THAMMARAT RAJABHAT UNIVERSITY

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเนื่องจากผลของการได้รับทุนอุดหนุนการทำวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ โดยผ่านงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2557 ของมหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำการทำวิจัยตลอดโครงการ ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ที่สนับสนุนด้านการใช้สถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการวิเคราะห์ทดสอบคุณสมบัติทางด้านกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ ประจำศูนย์วิทยาศาสตร์ ได้แก่ คุณจีราภรณ์ สังข์ผุด คุณนุชวรา องศารา คุณสุกัญญา ยุทธกาศ และคุณโชคชัย หมั่นถนอม ที่มีส่วนช่วยเหลือเกี่ยวกับการเก็บตัวอย่างและการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำมัน ตลอดจนการอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับทำการวิจัยครั้งนี้

ฉัตรชัย สังข์ผุด

2558

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	(1)
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	(3)
คำนำ	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(6)
สารบัญ	(7)
สารบัญตาราง	(8)
สารบัญภาพ	(11)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	35
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	49
บทที่ 5 สรุป และข้อเสนอแนะ	113
บรรณานุกรม	125
ภาคผนวก	132
ประวัตินักวิจัย	152

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้าที่
2.1	คุณค่าทางโภชนาการของมะพร้าวส่วนที่กินได้ 100 กรัม	11
2.2	หลักเกณฑ์การให้คะแนนตรวจสอบน้ำมันมะพร้าว	17
2.3	ส่วนประกอบของกรดไขมัน (fatty acid) เป็นร้อยละของกรดไขมันทั้งหมด โดยใช้วิธีก๊าซลิควิดโครมาโตกราฟฟี	18
2.4	กรดไขมันอิสระและค่ามาตรฐานของน้ำมันมะพร้าว	19
3.1	สูตรการเตรียมผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิวจากน้ำมันมะพร้าว	47
4.1	ปริมาณผลผลิต เปอร์เซ็นต์กรด และค่ากรดของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับโครงสร้างโมเลกุลด้วยเอนไซม์ไลเปส	54
4.2	การยับยั้งอนุมูลอิสระของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับโครงสร้างโมเลกุลด้วย เอนไซม์ไลเปส	55
4.3	ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส	57
4.4	ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส	58
4.5	ปริมาณผลผลิต เปอร์เซ็นต์กรด และค่ากรดของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับโครงสร้างโมเลกุลด้วยการเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส	63
4.6	การยับยั้งอนุมูลอิสระของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับโครงสร้างโมเลกุลด้วยการเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส	65
4.7	ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้าง ด้วยการเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส	68
4.8	ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้าง ด้วยการเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส	69
4.9	ปริมาณผลผลิต เปอร์เซ็นต์กรด และค่ากรดของน้ำมันมะพร้าวที่ปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลด้วยไลเปส D โดยเติมกลีเซอรอลเข้มข้นต่าง ๆ	73
4.10	สมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระของน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลด้วยไลเปส D โดยเติมกลีเซอรอลความเข้มข้นต่าง ๆ	74

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้าที่
4.11	ประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลด้วยการเติมกลีเซอรอลเข้มข้นต่าง ๆ	76
4.12	ประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลด้วยการเติมกลีเซอรอลเข้มข้นต่าง ๆ	78
4.13	ปริมาณผลผลิต เปอร์เซ็นต์กรด และค่ากรดของน้ำมันมะพร้าวที่ปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลโดยเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D พีเอชต่าง ๆ	80
4.14	สมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระของน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลโดยเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับพีเอชต่าง ๆ	81
4.15	ประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของน้ำมันที่ได้จากปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับพีเอชต่าง ๆ	84
4.16	ประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของน้ำมันที่ได้จากปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับพีเอชต่าง ๆ	85
4.17	ปริมาณผลผลิต เปอร์เซ็นต์กรด และค่ากรดของน้ำมันที่ปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลโดยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ	86
4.18	สมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระของน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลโดยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ	87
4.19	ประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของน้ำมันที่ได้จากปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	89
4.20	ประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของน้ำมันที่ได้จากปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	91
4.21	ปริมาณผลผลิต เปอร์เซ็นต์กรด และค่ากรดของน้ำมันที่ปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลโดยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	93
4.22	สมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระของน้ำมันที่ปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลโดยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	94
4.23	ประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของน้ำมันที่ปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ความเข้มข้นต่าง ๆ	98

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้าที่
4.24	ประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของน้ำมันที่ปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ความเข้มข้นต่าง ๆ	99
4.25	ปริมาณผลผลิต เปอร์เซ็นต์กรด และค่ากรดของน้ำมันมะพร้าวที่ปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลโดยเอนไซม์ไลเปส D ที่ระยะเวลาต่าง ๆ	101
4.26	สมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระของน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลโดยเอนไซม์ไลเปส D ที่ระยะเวลาต่าง ๆ	102
4.27	ประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลโดยเอนไซม์ไลเปส D ที่ระยะเวลาต่าง ๆ	104
4.28	ประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลโดยเอนไซม์ไลเปส D ที่ระยะเวลาต่าง ๆ	105
4.29	สมบัติของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์และน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างหลังเก็บรักษานาน 2 เดือน	107
4.30	ลักษณะทางกายภาพของเจลโลชั่นแต้มสิวที่ผลิตจากน้ำมันมะพร้าวดัดแปลง	109
4.31	ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิว	111
4.32	ระดับความพึงพอใจของอาสาสมัครต่อผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิวที่ผลิตจากน้ำมันมะพร้าวดัดแปลง	112

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้าที่
1.1	กรอบแนวความคิดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวเพื่อสุขภาพเพื่อเสริมสร้างคุณค่าให้แก่มะพร้าวและพืชสมุนไพรในท้องถิ่น	6
2.1	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะพร้าว	9
2.2	ปฏิกิริยาการสลายและการสร้างไตรกลีเซอไรด์โดยไลเปส	26
2.3	ปฏิกิริยาสลายไตรกลีเซอไรด์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3	28
2.4	ปฏิกิริยาการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์โดยไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์	28
2.5	ปฏิกิริยาไฮโดรไลซีลไตรกลีเซอไรด์	30
2.6	ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน	31
2.7	ปฏิกิริยา alcoholysis ระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับไขมันแอลกอฮอล์	32
2.8	ปฏิกิริยา acidolysis ระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับกรดไขมันอิสระ	32
2.9	ปฏิกิริยา ester-ester interchange	32
2.10	ปฏิกิริยา glycerolysis	33
3.1	มะพร้าวพันธุ์หนักเปลือกนอกทรงกลม กะลาทรงกลมก้นแป้นเตี้ย	35
3.2	กรรมวิธีการเตรียมครีม	37
3.3	กวนผสมเพื่อเร่งการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์	39
3.4	การอ่านค่าปริมาณผลผลิตน้ำมันเทียบกับครีมจากสเกลของกระบอกตวง	39
3.5	วิธีการหมักครีมเพื่อสกัดน้ำมันมะพร้าว	40
4.1	แสดงค่าเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของผลผลิตต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการสกัดน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์	50
4.2	ลักษณะการแยกชั้นและผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ปรับปรุงโครงสร้างโดยเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม	53
4.3	ประสิทธิภาพของวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* บนอาหาร MHA ของสารละลายฟีนอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	59
4.4	ประสิทธิภาพของวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* บนอาหาร MHA ของสารละลายฟีนอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	59

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
4.5	วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ	60
4.6	วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ	61
4.7	ลักษณะการแยกชั้นของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ปรับปรุงโครงสร้างโดยเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม	64
4.8	วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ	67
4.9	วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ	70
4.10	ลักษณะการแยกชั้นของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยเติมกลีเซอรอลที่ระดับต่าง ๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม	72
4.11	วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* บนอาหาร MHA ของน้ำมันที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส D และกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	75
4.12	วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* บนอาหาร MHA ของน้ำมันดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส D และกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	77
4.13	ลักษณะการแยกชั้นของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับพีเอชต่าง ๆ	79
4.14	วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่พีเอชต่าง ๆ	82
4.15	วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่พีเอชต่าง ๆ	83
4.16	วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	88
4.17	วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	90

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
4.18	ลักษณะของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	92
4.19	วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* บนอาหาร MHA ของน้ำมันดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	96
4.20	วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	97
4.21	ลักษณะของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระยะเวลาต่าง ๆ	100
4.22	วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระยะเวลาต่าง ๆ	103
4.23	วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระยะเวลาต่าง ๆ	104
4.24	ผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิวสูตรต่าง ๆ	108
4.25	วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* บนอาหาร MHA ของผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิว	110

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปี 2556 ไทยมีพื้นที่ปลูกมะพร้าว 1,337,364 ไร่ ให้ผลผลิต 1,056,658 ตัน สถิติราคามะพร้าวผลใหญ่ในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ตั้งแต่ปี 2539 – 2552 พบว่า มีราคาตกต่ำแปรผันอยู่ในช่วง 2.88-8.71 บาทต่อผล (สำนักงานการค้าภายในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์, 2552) ต่อมาปลายปี 2556 ถึงต้นปี 2557 ราคาปรับขึ้นสูงถึง 15 บาทต่อผล (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556) ประมาณ 2% ของผลผลิตดังกล่าวถูกนำไปเพิ่มมูลค่าต่อด้วยการผลิตเป็นน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ (virgin coconut oil) โดยใช้กระบวนการหมักตามธรรมชาติ (Fuangworawong *et al.*, 2008, 13-31) การสืบค้นราคาจำหน่ายปลีกน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นในตลาดออนไลน์ (web google search) พบว่าปัจจุบันมีราคาจำหน่ายสูงตั้งแต่ 300-1,000 บาทต่อลิตร โดยขึ้นอยู่กับแหล่งบริษัทผู้ผลิตและขนาดบรรจุต่อหน่วย

น้ำมันมะพร้าวมาใช้เป็นส่วนประกอบในการปรุงอาหารและยารักษาโรคมาเป็นเวลานานนับศตวรรษแล้ว เช่น การรักษาแผลไฟไหม้ อาการท้องผูก ภาวะกรดเกิน ลำไส้อักเสบ โรคหนองใน เป็นต้น เนื่องจากน้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งของกรดไขมันสายปานกลาง (Medium chain fatty acid; MCFAs) ที่สำคัญ ประกอบด้วยกรดไขมันชนิดกรดลอริก (C12) ประมาณ50% และกรดคาปริก (C10) ประมาณ 10% (Marina *et al.*, 2009, 301-307) กรดไขมันกลุ่มนี้เมื่อกินเข้าไปในร่างกายก็จะถูกย่อยและเผาผลาญอย่างรวดเร็วเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานมากกว่าการกักเก็บไว้ในเนื้อเยื่อไขมันสะสม ช่วยลดคลอเรสเตอรอล (LDL-cholesterol) ในเลือด ทำลดให้ความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้ (Nevin and Rajamoham, 2004, 830-835)

มีผลงานวิจัยทางการแพทย์สมัยใหม่มากมายให้ความสนใจทำการวิจัยเกี่ยวกับประสิทธิภาพของกรดลอริกและกรดคาปริกทั้งชนิดที่อยู่ในรูปกรดไขมันอิสระและโมโนกลีเซอไรด์ พบว่า กรดไขมันดังกล่าวมีผลต่อสุขภาพและสภาวะการเจ็บป่วยต่างๆ ได้แก่ ยับยั้งมะเร็ง (Cohen & Thomson, 1987, 455-461; Lim-Sylianco, Guevara & Sylianco-Wu, 1991) ต้านอนุมูลอิสระ (Marina *et al.*, 2009, 114-123; Nevin & Rajamohan, 2009, 610-616; Nevin & Rajamohan, 2006, 260-266) ลดคอเลสเตอรอลและปริมาณไขมันในเลือด (Rudkowsa *et al.*, 2006, 391-395) ป้องกันรักษาแผลไฟไหม้ ผุพอง (Intahphuak, Khonsung & Panthong, 2010, 151-157) ต่อต้านเชื้อ

ไวรัสหลายชนิดอย่างมีประสิทธิภาพ ได้แก่ HIV, herpes virus, Junin virus, vesicular stomatitis virus, cytomegalovirus และ influenza (Bartolotta *et al.*, 2001, 777-790; Hornung *et al.*, 1994, 353-361; Kristmundsdottir *et al.*, 1999, 1011-1115) รวมทั้งสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด ได้แก่ *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes* และ *Helicobacter pylori* (Handayani *et al.*, 2009, 151-157, Batovska *et al.*, 2009, 43-47; Enig, 1996) จากตัวอย่างผลวิจัยข้างต้นปัจจุบันจึงมีการนำน้ำมันมะพร้าวมาประยุกต์ใช้ในกลุ่มโภชนเภสัช (nutraceutical) อาหารเพื่อสุขภาพ (functional food) ผลิตภัณฑ์ถนอมผิวและเพื่อความงามหลากหลายชนิด เช่น Mbandi, *et al.*, (2004, 815-818) แสดงผลการประยุกต์ใช้กรดไขมันอิสระและโมโนกลีเซอไรด์เพื่อยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์ hot dogs และ Hauerlandova, *et al.*, (2014, 37-43) แสดงผลประยุกต์ใช้ในระหว่างการผลิตผลิตภัณฑ์ cheese พบว่า มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ spore-forming bacteria ได้ดี

เทคโนโลยีการสกัดแยกน้ำมันออกจากเนื้อมะพร้าวสดหรือมะพร้าวแห้ง มีหลายวิธี ได้แก่ การสกัดเย็น (wet process) การสกัดแห้ง และการสกัดด้วยตัวทำละลาย วิธีการสกัดเย็นทำได้ง่ายๆ โดยการนำเนื้อมะพร้าวสดมาขูด คั้นเนื้อมะพร้าวด้วยน้ำแล้วกรองเพื่อให้ได้น้ำกะทิ วางทิ้งไว้ให้แยกชั้นครีม นำครีมไปหมักค้างคืนตามธรรมชาติหรืออาจเติมจุลินทรีย์หรือเอนไซม์แล้วกรองหรือเหวี่ยงแยกชั้นน้ำมันวิธีการนี้กระทำได้ง่าย ต้นทุนต่ำและปลอดภัยแต่ยังไม่ค่อยนิยมทำในระดับอุตสาหกรรม วิธีการสกัดแห้งเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุดในระดับอุตสาหกรรม โดยนำมะพร้าวแห้ง (copra) มาทำความสะอาด บด นึ่งไอน้ำ บีบอัดเพื่อแยกน้ำมันออก จากนั้นนำน้ำมันไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนการทำให้เป็นกลาง การฟอกสี กำจัดกลิ่น กรดไขมันอิสระ และสารสีต่าง ๆ วิธีนี้มักมีการปนเปื้อนของแมลงและเชื้อราในวัตถุดิบมะพร้าวแห้งซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายจากสารพิษอะฟลาทอกซินได้ อีกวิธีหนึ่งก็คือการสกัดด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ เบนซีน และเฮกเซน วิธีนี้ได้ผลผลิตสูง แต่เป็นวิธีที่มีความอันตรายและต้นทุนสูง

มีงานวิจัยหลายชิ้นพัฒนาวิธีการสกัดน้ำมันมะพร้าวให้ได้คุณภาพและปริมาณผลผลิตสูงด้วยวิธีสกัดเย็น เริ่มต้นจาก McGlone และคณะ (1986, 695-697) พบว่า การสกัดน้ำมันมะพร้าวด้วยเอนไซม์ผสมระหว่างแอลฟา-อะมัยเลส โพลีกาแลคทูโรเนส และเอนไซม์โปรตีเอสในเนื้อมะพร้าวบดเปียกให้ผลผลิตน้ำมันคุณภาพดีสูงถึง 80% ต่อมา Suhardiyono (1992, 51-68) ประยุกต์ใช้ยีสต์ขนมปังเพื่อเป็นแหล่งของเอนไซม์ในระหว่างการหมักปกติ พบว่า สามารถเพิ่มผลผลิตได้สูงกว่า จากนั้น Che Man และคณะ (1992, 38-42) ศึกษาผลการเติมกรดอะซีติก (25%) ในปริมาณ 0.1-0.4% พบว่า สามารถเก็บเกี่ยวน้ำมันที่คุณภาพดีได้ 58.3-60.3% ต่อมา Che Man และคณะ (1996, 683-686) พบว่า สามารถเพิ่มผลผลิตได้ถึง 73.8% เมื่อมีการผสมเอนไซม์เซลลู

เลส แอลฟา-อะมัยเลส โพลีกา-แลคทูโรเนส และโปรตีเอส อย่างละ 1% (w/w) ที่ระดับค่าพีเอช 7.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีทางด้านเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมมากขึ้น เนื่องจากในช่วงหลายสิบปีที่ผ่านงานวิจัยที่เกี่ยวกับการคัดเลือกแหล่งผลิต การสกัด การทำให้บริสุทธิ์ และการทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์มีความก้าวหน้าอย่างต่อเนื่อง เนื่องมาจากสาเหตุหลายประการ ได้แก่ เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างมีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง คืออุณหภูมิ พีเอช และความดันปกติ มีความจำเพาะ สามารถตรึงนำกลับมาใช้ใหม่ได้ สลายตัวได้ตามธรรมชาติ ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม และสามารถจะปรับปรุงเปลี่ยนแปลงให้มีคุณสมบัติตามที่ต้องการได้ เป็นต้น

เอนไซม์ไลเปสเป็นอีกหนึ่งชนิดของเอนไซม์ที่มีการวิจัยพัฒนาและผลิตจำหน่ายกันเป็นทางการค้า เพื่อใช้ประโยชน์ที่หลากหลายเนื่องจากมีคุณสมบัติเร่งปฏิกิริยาย่อยสลาย (hydrolysis reaction) สังเคราะห์เอสเทอร์ (ester synthesis reaction) และแลกเปลี่ยนหมู่เอสเทอร์ (transesterification reaction) จึงมีการนำมาใช้สำหรับการย่อยสลายหรือปรับเปลี่ยนโครงสร้างของน้ำมันและไขมัน เพื่อให้มีคุณสมบัติต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการใช้งานในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง เภสัชกรรม และอุตสาหกรรมโอลิโอเคมี เป็นต้น มีรายงานวิจัยจำนวนมากแสดงผลความแตกต่างของการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ ทั้งในรูปแบบของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่ถูกตรึงในการย่อยสลายและปรับปรุงโครงสร้างน้ำมันชนิดที่เป็นที่นิยมของตลาดโลก เช่น น้ำมันปาล์ม และน้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น แต่มีงานวิจัยจำนวนน้อยมากที่ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับน้ำมันมะพร้าวโดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น

ในเอกสารสิทธิบัตร US 2010/0016430 A1, Jan. 21, 2010 คิดค้นโดย Kamariah Long (2006) พบว่า การดัดแปลงโครงสร้างของน้ำมันมะพร้าวโดยใช้เอนไซม์ไลเปสชนิด 1,3 specific มีผลทำให้เพิ่มคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันได้ในวงกว้างขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานกรดไขมันอิสระสายกลาง (C8-C12) และโมโนกลีเซอไรด์ของกรดไขมันสายกลาง เช่น monolaurin เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและเมทาบอลิซึมของไขมันได้ดี (Nevin & Rajamohan, 2009, 610-616)

อย่างไรก็ตามในวิจัยส่วนใหญ่ได้นำผลิตภัณฑ์น้ำมันที่ผ่านการสกัดหรือทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทำปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง ซึ่งพบว่าจะมีปัญหาอย่างมากเกี่ยวกับการผสมหรือการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากว่าเอนไซม์ไลเปสมีคุณสมบัติละลายน้ำ ส่วนน้ำมันซึ่งเป็นสับสเตรทมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ ตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาคือบริเวณจุดเชื่อมต่อ (interphase) ระหว่างน้ำและน้ำมัน ดังนั้นมีงานวิจัยหลายชิ้นจึงเลือกการทำปฏิกิริยาในตัวทำละลาย

อินทรีย์หรือเทคนิคต่าง ๆ มากมาย ผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดว่าหากใช้เอนไซม์ทำการเร่งปฏิกิริยาปรับเปลี่ยนโครงสร้างของน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นให้เป็นกรดไขมันอิสระสายกลาง (C8-C12) หรือโมโนกลีเซอไรด์ของกรดไขมันอิสระสายกลาง ที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อและอนุมูลอิสระสูงขึ้น โดยเลือกทำปฏิกิริยาในขณะที่สับสเตรทยังมีสภาพเป็นน้ำกะทิ หรือครีม ก่อนที่จะนำไปหมักสกัดเป็นน้ำมันต่อ จึงน่าจะเป็นทางเลือกใหม่ที่สามารถกระทำได้ง่ายและเหมาะสำหรับการถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชนต่อไปได้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการใช้เอนไซม์ไลเปสในการเพิ่มคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักสกัดน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น

2. เพื่อศึกษาคุณภาพและการเปลี่ยนคุณภาพในระหว่างเก็บรักษาน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นชนิดดัดแปลงโครงสร้าง

3. เพื่อทดสอบการผลิตเจลโลชั่นแต้มสิวจากน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้าง

สมมุติฐานการวิจัย

1. เอนไซม์ไลเปสแต่ละแหล่งมีความจำเพาะต่อการเร่งปฏิกิริยาการสร้างกรดไขมันและโมโนลอริน ที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นที่ได้จากกระบวนการหมักที่แตกต่างกัน

2. การปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาการสร้างกรดไขมันและโมโนลอรินโดยเอนไซม์ไลเปสในระหว่างการบวนการหมักสกัดน้ำมันมะพร้าวมีผลต่อการเพิ่มคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

3. ผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นที่ถูกดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปสมีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพได้ง่ายในระหว่างการเก็บรักษา

4. ผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิวที่ผลิตจากน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างเป็นกรดไขมันและโมโนลอรินด้วยเอนไซม์ไลเปสมีคุณภาพที่สูงขึ้น

ขอบเขตการวิจัย

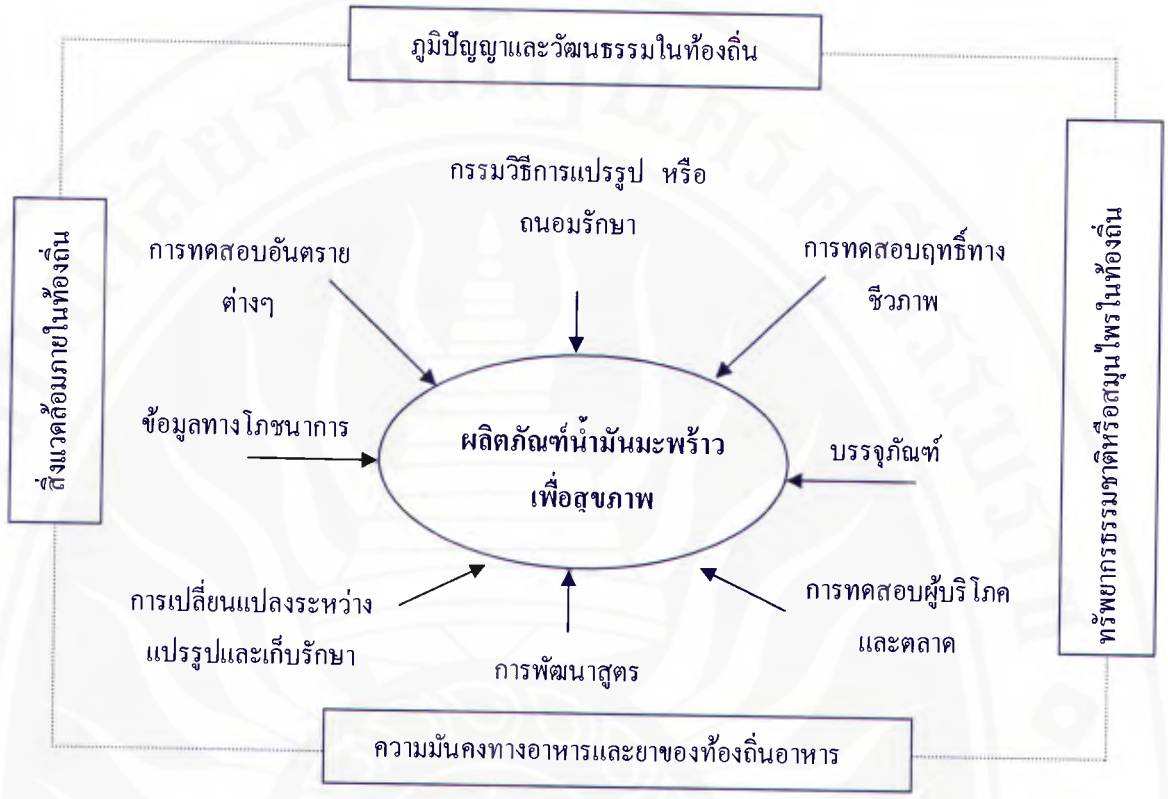
เริ่มต้นจากคัดเลือกแหล่งของเอนไซม์ไลเปสทางการค้าที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มสมบัติการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น และปรับสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมเพื่อจะเสริมประสิทธิภาพการสกัดและคุณภาพการต้านเชื้อของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ พัฒนาสร้างความหลากหลายของผลิตภัณฑ์โดยการนำมาผลิตเป็นเจลโลชั่นแต้มสิวให้มีคุณภาพและคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านสีและกลิ่นเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

สถานที่และระยะเวลาในการทำวิจัย

ทำการวิจัย ณ. ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ระหว่างเดือนตุลาคม 2557 ถึงเดือนธันวาคม 2558

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การเสริมสร้างคุณค่าให้แก่มะพร้าวในท้องถิ่นด้วยการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นเพื่อสุขภาพ นั้นจะต้องอยู่ภายใต้บริบทของความมั่นคงทางอาหารและยา ด้วยการประยุกต์ใช้ทรัพยากรธรรมชาติและเทคโนโลยีที่เหมาะสม ได้แก่ เทคโนโลยีการหมักและเทคโนโลยีเอนไซม์มาพัฒนาต่อยอดจากฐานภูมิปัญญาและวัฒนธรรมในท้องถิ่น โดยผ่านขั้นตอนกระบวนการทางด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่ การพัฒนากรรมวิธีการสกัด การดัดแปลงโครงสร้าง การถนอมรักษา การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระหว่างการแปรรูปและเก็บรักษา การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และการสอบผู้บริโภค ซึ่งมีส่วนสำคัญต่อการพัฒนาทรัพยากรเกษตรคือมะพร้าวภายในท้องถิ่นเพื่อนำมาใช้เป็นอาหารและยาภายในชุมชน ช่วยส่งเสริมการรักษาวิถีชีวิตแบบพอเพียงและวัฒนธรรมของชุมชนให้ควบคู่กับสิ่งแวดล้อมอย่างมีดุลยภาพและยั่งยืนต่อไป ดังแผนภาพที่ 1.1



ภาพที่ 1.1 กรอบแนวความคิดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวเพื่อสุขภาพเพื่อเสริมสร้างคุณค่าให้แก่มะพร้าวในท้องถิ่น

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

1. เป็นการเสริมสร้างคุณค่าและมูลค่าให้แก่มะพร้าวในท้องถิ่น
2. ช่วยเสริมสร้างความมั่นคงและความปลอดภัยทางอาหารและยาในชุมชนภาคใต้
3. มีฐานข้อมูลเกี่ยวกับภูมิปัญญาและวัฒนธรรมทางอาหารของชุมชนนครศรีธรรมราช เพื่อการอนุรักษ์ สืบสาน เผยแพร่และพัฒนาต่อไป
4. ส่งเสริมและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อการท่องเที่ยวประจำจังหวัดนครศรีธรรมราช
5. ส่งเสริมวัฒนธรรมการดำรงชีวิตของคนในชุมชนตามปรัชญาของเศรษฐกิจพอเพียง

การถ่ายทอดเทคโนโลยี

มีการบูรณาการเข้ากับการเรียนการสอนและการบริการวิชาการ โดยการจัดทำเป็นบทปฏิบัติการประกอบการเรียนการสอนรายวิชาเทคโนโลยีน้ำมันและไขมัน หลักสูตรเกษตรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช รวมทั้งการจัดทำเป็นหลักสูตรฝึกอบรมอาชีพระยะสั้น เผยแพร่ ถ่ายทอดผลงานและผลิตภัณฑ์ต่อประชาชนผู้สนใจทั่วไปในโอกาสต่าง ๆ เช่น งานวันราชภัฏวิชาการ และงานวันสัปดาห์วิทยาศาสตร์ประจำปีของมหาวิทยาลัย เป็นต้น

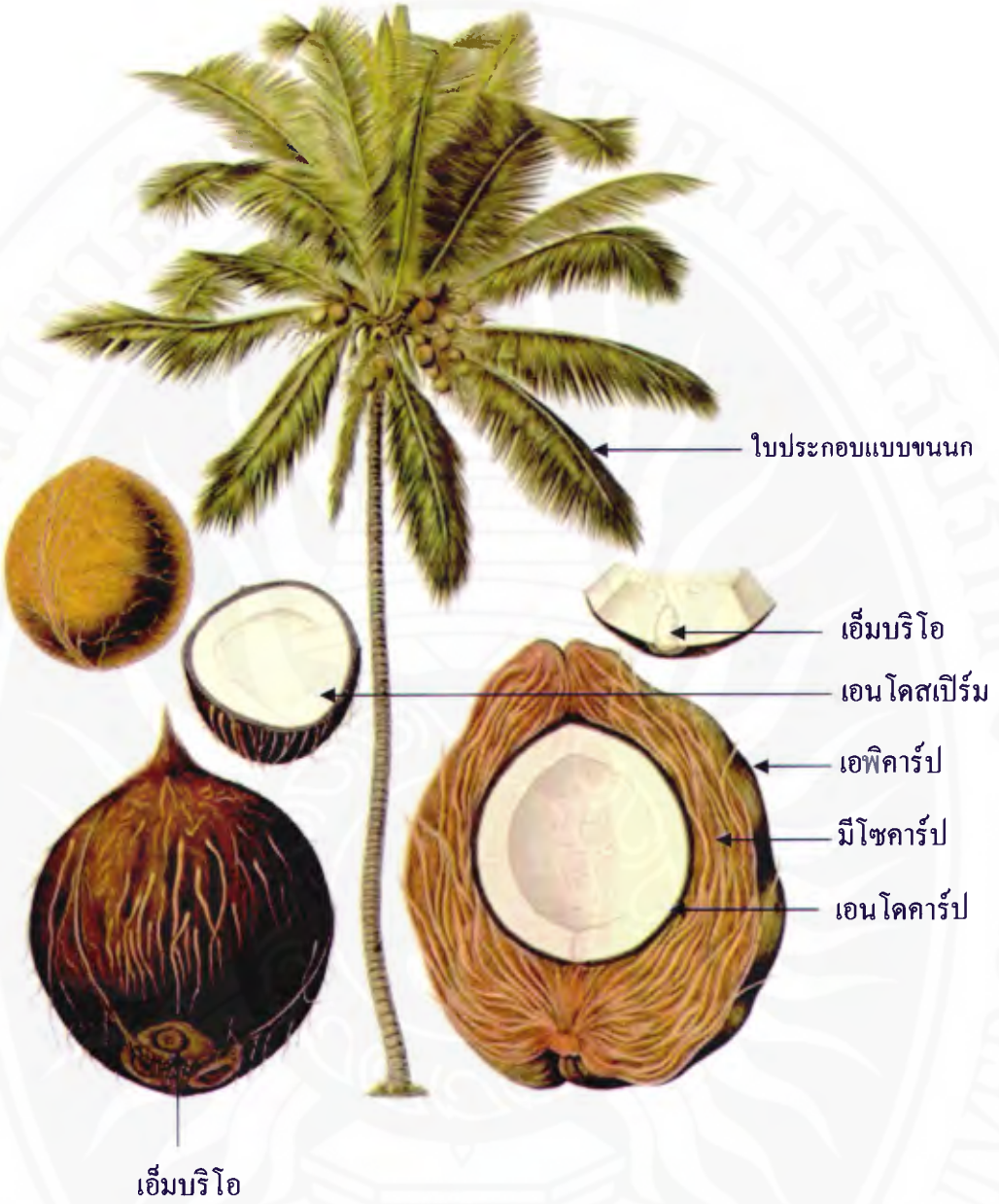
บทที่ 2

ตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะพร้าว

มะพร้าวมีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า (Scientific name): *Cocos nucifera* ชื่อสามัญ (Common name): Coconut, Coconut Palm และ Ocean Going Nut จัดเป็นพืชตระกูลปาล์มที่มีความสำคัญยิ่งตระกูลหนึ่งของพืชพวกใบเลี้ยงเดี่ยว มะพร้าวเป็นพืชยืนต้น ใบมีลักษณะเป็นใบประกอบแบบขนนก ผลประกอบด้วยเอพิคาร์ป (epicarp) คือเปลือกนอก ถัดไปข้างในจะเป็นส่วนของมีโซคาร์ป (mesocarp) หรือใยมะพร้าว ถัดไปข้างในเป็นส่วนเอนโดคาร์ป (endocarp) หรือกะลามะพร้าว ซึ่งจะมีรูสืดล้ำอยู่ 3 รู สำหรับงอก เรียกว่าเอ็มบริโอ ถัดจากส่วนเอนโดคาร์ปเข้าไปจะเป็นส่วนของเอนโดสเปิร์ม หรือที่เรียกว่าเนื้อมะพร้าว ภายในเอนโดสเปิร์มของมะพร้าวจะมีน้ำมะพร้าว ดังภาพที่ 2.1 ซึ่งเมื่อมะพร้าวแก่ เอนโดสเปิร์มก็จะดูดเอาน้ำมะพร้าวไปใช้จนหมด

ขณะที่มะพร้าวยังอ่อน ชั้นเอนโดสเปิร์ม (เนื้อมะพร้าว) ภายในผลมีลักษณะบางและอ่อนนุ่ม ภายในมีน้ำมะพร้าว ซึ่งในระยะนี้เรามักสอยเอามะพร้าวลงมารับประทานน้ำและเนื้อ เมื่อมะพร้าวแก่ ซึ่งสังเกตได้จากการที่เปลือกนอกเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ชั้นเอนโดสเปิร์มก็จะหนาและแข็งขึ้น จนในที่สุดมะพร้าวก็หล่นลงจากต้น



ภาพที่ 2 1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะพร้าว

ที่มา: (http://th.wikipedia.org/wiki/มะพร้าว)

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะพร้าว

1.1 ราก (roots) มะพร้าวเป็นพืชยืนต้นชนิดใบเลี้ยงเดี่ยว มีระบบรากแบบรากฝอย (fibrous root system) ซึ่งรากมะพร้าวที่ทำหน้าที่ยึดเหนี่ยวลำต้น ดูดซึมน้ำและธาตุอาหารต่างๆ

1.2 ลำต้น (stem) มีรูปร่างลักษณะเป็นกระบอกทรงสูง แต่ตอนส่วนโคนต้นที่อยู่เหนือพื้นดินเล็กน้อยมีลักษณะคล้ายตะโพก และมีขนาดใหญ่กว่า ส่วนลำต้นที่อยู่สูงขึ้นไป ที่ส่วนยอดสุดของลำต้นมะพร้าวจะมีตาอยู่เพียงตาเดียวเท่านั้น ที่จะเจริญเติบโตเป็นลำต้น ใบ และช่อดอก ถ้าหากตายอดนี้ถูกทำลายหรือเน่าตายไป มะพร้าวทั้งต้นก็จะตายไปด้วย

1.3 ใบ (leaves) ใบมะพร้าวมีชื่อเรียกเฉพาะว่า fronds ซึ่งเป็นใบประกอบแบบ innately compound leaf ที่เกิดจากตาส่วนยอดของต้น และรวมกันอยู่เป็นกระจุก ปลายใบกระจายออกเป็นรัศมีรอบๆ ลำต้น โดยจำนวนใบที่คงอยู่บนลำต้นและอัตราการสร้างใบของมะพร้าวในแต่ละปีนั้น ใช้เป็นเครื่องวัดความเจริญเติบโตของมะพร้าวได้เป็นอย่างดี

1.4 ช่อดอก (inflorescence) ช่อดอกจะมีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่แยกกัน แต่ดอกทั้งสองชนิดอยู่ในช่อดอกเดียวกันลักษณะประจำพันธุ์ของมะพร้าวจะเป็นสิ่งกำหนดระยะเวลาการออกดอก

1.5 ผล (fruit) ผลมะพร้าวจะมีขนาดโตเต็มที่หลังจากที่มีการผสมเกสรแล้ว 6 เดือน และหลังจากนั้นอีก 6 เดือนผลก็จะสุกแก่พร้อมที่จะเก็บเกี่ยว

1.6 เมล็ด (seed) เมล็ดมะพร้าวมีขนาดใหญ่ ซึ่งเมล็ดมะพร้าวนี้ก็คือเนื้อมะพร้าวที่อยู่ภายในกะลานั่นเอง

1.7 พันธุ์ (varieties) ในการจำแนกพันธุ์มะพร้าวออกเป็นหมวดหมู่นั้น ใช้การพิจารณาลักษณะต่างๆ ที่สำคัญ 3 ประการคือ (1) การเจริญเติบโตของลำต้น (2) อายุที่มะพร้าวเริ่มตกผล และ (3) ลักษณะการบานของดอก จากหลักเกณฑ์ทั้ง 3 ประการนี้ ทำให้แบ่งมะพร้าวออกเป็น 2 พันธุ์ คือ (1) มะพร้าวพันธุ์ต้นเตี้ย (Dwarf type var. nana) และ (2) มะพร้าว พันธุ์ต้นสูง (Tall type var. typical) ซึ่งมะพร้าวทั้ง 2 พันธุ์มีลักษณะที่แตกต่างกัน

2. คุณค่าทางโภชนาการของผลมะพร้าว

เราใช้ประโยชน์จากผลมะพร้าวได้หลายทาง เช่น น้ำและเนื้อมะพร้าวอ่อนใช้รับประทาน เนื้อในผลแก่นำไปคั้นกะทิใช้ในการปรุงอาหารหรือนำไปทำเครื่องสำอางก็ได้ กากที่เหลือจากคั้นกะทิยังสามารถนำไปทำอาหารสัตว์ได้ จากผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของมะพร้าวส่วนที่กินได้โดยสถาบันการแพทย์แผนโบราณ กรมการแพทย์กระทรวงสาธารณสุข (2542) ปรากฏผลในตารางที่ 2 1 ดังนี้

ตารางที่ 2.1 คุณค่าทางโภชนาการของมะพร้าวส่วนที่กินได้ 100 กรัม

ส่วนของมะพร้าวที่กินได้ 100%	พลังงาน (กิโลแคลอรี)	โปรตีน (กรัม)	ไขมัน (กรัม)	คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	แคลเซียม (มก.)	เหล็ก (มก.)
น้ำมะพร้าวแก่	12	1.0	-	2.1	21	0.4
เนื้อมะพร้าวแก่	321	3.2	28.2	16.0	23	2.5
น้ำมะพร้าวอ่อน	22	0.2	0.4	4.5	24	0.3
หัวกะทิ (ไม่ใส่น้ำ)	330	4.3	34 7	6.0	11	2.3
กะทิใส่น้ำ	241	3.2	24 9	5.2	16	1.6
กากกะทิ	116	1.8	4.3	17 5	10	5.3
เนื้อมะพร้าวอ่อน	77	1.4	3.6	10 3	42	1.0
มะพร้าวทึนทึก	99	1.4	5.5	11.9	10	0.7
จาวมะพร้าว	48	1.8	1.3	9.1	27	0.5
น้ำตาลสด	43	2.1	0.3	10.2	3	0.2
น้ำตาลมะพร้าว	383	0.4	0.1	95	80	1.4
น้ำมันมะพร้าว	883	-	99 9	-	2	-

ที่มา สถาบันการแพทย์แผนโบราณ กรมการแพทย์กระทรวงสาธารณสุข (2542)

กรรมวิธีการผลิตน้ำมันมะพร้าว

1. ความหมาย

น้ำมันมะพร้าวเป็นน้ำมันที่สกัดจากเนื้อมะพร้าวของต้นมะพร้าว ซึ่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า โคคอสนิวซิเฟอรา (*Cocos nucifera*) ปัจจุบันมีอยู่ 2 ชนิด คือ

1) น้ำมันมะพร้าว (Refined Bleaching Deodorizing Coconut oil: RBD) สกัดได้จากเนื้อมะพร้าวห้าวหรือเนื้อมะพร้าวแห้ง (copra) โดยการบีบหรือสกัดด้วยตัวทำละลาย แล้วนำไปผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (Refining) โดยการกำจัดกรดอิสระ ฟอกสี (Bleaching) และกำจัดกลิ่น (Deodorization) เพื่อให้เหมาะสำหรับการบริโภค ซึ่งมีสีเหลืองไม่มีกลิ่นและรส ปราศจากวิตามินอี เพราะถูกกำจัดออกไปโดยกระบวนการทางเคมี และมีปริมาณกรดไขมันอิสระ (Free Fatty Acid-FFA) ไม่เกิน 0.1%

2) น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์หรือน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น (Virgin Coconut Oil : VCO) ได้จากการสกัดโดยวิธีทางธรรมชาติ หรือการบีบโดยไม่ผ่านความร้อนจากเนื้อมะพร้าวห้าว ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของน้ำมัน เหมาะสำหรับการบริโภคเพราะเป็นน้ำมันมะพร้าวที่บริสุทธิ์ที่สุด สีใสเหมือนน้ำ มีวิตามินอี และไม่ผ่านกระบวนการเติมออกซิเจน(oxidation) มีค่าเบอร์ออกไซด์ (peroxide) และกรดไขมันอิสระต่ำ มีกลิ่นมะพร้าวอย่างอ่อนๆถึงแรง ขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิต

2. การผลิตน้ำมันมะพร้าว

การผลิตน้ำมันมะพร้าว (coconut oil) โดยทั่วไปสามารถแยกออกได้เป็น 3 ขั้นตอนใหญ่ ๆ ดังนี้คือ (ศิริวรรณ เนติวรานนท์, 2531)

2.1 การเตรียมวัตถุดิบ

เนื้อมะพร้าวแห้งหรือกากมะพร้าวที่เหลือจากการประกอบอาหารก่อนที่จะนำเข้าเครื่องสกัดน้ำมันนั้นจะต้องตรวจดูความชื้นเสียก่อนว่ามีมากน้อยเพียงใด ถ้ามีความชื้นเกินกว่าร้อยละ 6 จะต้องผึ่งลมหรืออบแห้งเสียก่อน ความชื้นโดยทั่วไปที่เหมาะในการบีบหรืออัดต้องไม่เกินร้อยละ 5 เพราะถ้ามีความชื้นสูงกว่านี้ จะทำให้ได้อัตราส่วนของน้ำมันน้อยลง จากนั้นนำเข้าเครื่องบด (hammer mill) เพื่อบดเนื้อมะพร้าวให้เป็นชิ้นเล็กๆ (ในกรณีของเนื้อมะพร้าวแห้ง) ส่วนกากมะพร้าวที่เหลือจากการประกอบอาหารนั้นไม่ต้องผ่านเครื่องบด เพราะเป็นชิ้นเล็กๆ อยู่แล้ว จึงนำไปเข้าเครื่องบีบหรืออัดเพื่อสกัดน้ำมันต่อไป

2.2 การสกัดน้ำมันดิบ

การสกัดน้ำมันดิบ (crude oil) การสกัดน้ำมันมะพร้าวอาจทำได้ 3 วิธี

2.2.1 การสกัดโดยใช้เครื่องบีบหรืออัด (expeller) นำเนื้อมะพร้าวที่ได้จากการเตรียมวัตถุดิบในขั้นแรกเข้าเครื่องบีบแบบสกรู (screw press) ซึ่งมีอย่างน้อย 4 เครื่องติดต่อกันไป เพื่อบีบเอาน้ำมันออกมา ส่วนกากมะพร้าวซึ่งยังมีน้ำมันเหลืออยู่ประมาณ15-20 เปอร์เซ็นต์ จะนำเข้าเครื่องไฮดรอลิค (hydraulic press) ต่อไป จนได้กากมะพร้าวออกมาเป็นก้อนกลม ซึ่งสามารถนำไปจำหน่ายให้แก่โรงงานทำอาหารสัตว์หรือโรงงานทำปุ๋ยต่อไป

การสกัดน้ำมันโดยการบีบหรืออัดนี้เป็นวิธีการผลิตแบบเก่าที่ใช้เครื่องจักรบีบอัด เอาน้ำมันออกจากเนื้อมะพร้าวหรือกากมะพร้าวโดยตรง เป็นวิธีที่นิยมใช้กันในประเทศแถบเอเชีย เพราะสะดวกและเครื่องมือมีราคาถูก สำหรับประเทศไทยนั้นนิยมใช้เครื่องบีบแบบสกรูเพรสเพียงอย่างเดียวเป็นส่วนมาก

2.2.2 การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (solvent extraction) วิธีนี้นับเป็นวิธีสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าการสกัดด้วยเครื่องบีบอัดมาก มักใช้ เฮกเซน (hexane) ซึ่งเป็นเคมีภัณฑ์ปิโตรเลียมในการสกัดน้ำมัน ในการผลิตขนาดใหญ่มักนิยมใช้วิธีนี้เพราะได้ผลผลิตมากกว่า และเครื่องจักรยังสามารถใช้กับพืชน้ำมันได้หลายชนิด แม้ว่าจะต้องลงทุนซื้อเครื่องจักรในราคาแพง และต้องเสียค่าจ้างผู้ปฏิบัติงานที่มีความชำนาญให้เหมาะสมกับเทคนิคขั้นสูงในการผลิตก็ยังนับว่าคุ้มค่าเพราะให้ผลตอบแทนสูง กรรมวิธีการผลิตโดยวิธีนี้ทำได้หลายวิธีคือ

1) แบบแช่ (immersion) เป็นการสกัดโดยนำเนื้อมะพร้าวที่ผ่านขั้นการเตรียมวัตถุดิบแล้วลงแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน (hexane) น้ำมันจะถูกสกัดออกมาจะผสมอยู่กับตัวทำละลาย เมื่อแช่ไว้จนครบตามระยะเวลาที่กำหนดแล้ว จึงใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายระเหยออกไปเหลือแต่น้ำมันดิบ (crude oil) ไว้

2) แบบซึมผ่าน (percolation) วิธีนี้ใช้พ่นตัวทำละลายจนท่วมเนื้อมะพร้าว แล้วปล่อยไว้ตาม
กำหนดเวลาให้ซึมเข้าไปในมะพร้าว เพื่อสกัดน้ำมันดิบออกมา

3) แบบผสมระหว่างการแช่และการซึมผ่าน (percolation immersion) คือการพ่นแล้วทิ้งให้
เนื้อมะพร้าวแช่อยู่ในตัวละลายตามกำหนดเวลา แล้วแยกน้ำมันดิบออกโดยวิธีระเหยด้วยความร้อน

2.2.3 การสกัดโดยใช้เครื่องบีบและตัวทำละลาย เป็นการสกัดน้ำมันมะพร้าวด้วยเครื่องบีบ แล้วนำกากที่เหลือมาสกัดต่อด้วยตัวทำละลาย เพื่อสกัดน้ำมันที่เหลืออยู่ในกากอีกครั้งหนึ่งอย่างไรก็ตาม การสกัดน้ำมันมะพร้าวโดยใช้เครื่องบีบอัดหรือใช้ตัวทำละลาย ในขั้นนี้จะ

ได้น้ำมันดิบออกมา ซึ่งยังมีกลิ่น สี รส เศษผง กาก ตลอดจนมีสารบางชนิดเจือปนอยู่ ดังนั้นจึงต้องผ่านขั้นตอนการทำให้น้ำมันบริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่ง

2.3 การทำน้ำมันให้บริสุทธิ์

การทำน้ำมันให้บริสุทธิ์ (refining) คือการกลั่นน้ำมันดิบโดยใช้วิธีทางเคมี เพื่อปรับสภาพของน้ำมันไม่ให้มีสี กลิ่น รส และกำจัดสารบางชนิดที่เจือปนอยู่ เพื่อให้เหมาะในการใช้บริโภค หรือนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสินค้าอื่นต่อไป ซึ่งมีขั้นตอนที่สำคัญดังนี้

2.3.1 การกำจัดกรดไขมันอิสระ (refining) ด้วยโซดาไฟ ซึ่งจะแยกน้ำมันที่ปราศจากกรดไขมันอิสระออกมา ส่วนหนึ่งจะได้เป็นสบู่ (soap) ส่วนที่เป็นสบู่นี้จะมีสิ่งสกปรกหรือสารบางอย่างเจือปนอยู่ในน้ำมันดิบปะปนออกมาด้วย ดังนั้นน้ำมันที่ได้จะสะอาดและไม่มีกรด

2.3.2 การฟอกสี (bleaching) เป็นการกำจัดสารสีโดยใช้ผงฟอกสี (Fuller's earth) หรือผงถ่านกัมมันต์ (activated carbon) เป็นตัวฟอก แล้วจึงนำไปกรองเอาสารฟอกออกโดยเครื่องกรองชนิด filter press

2.3.3 การกำจัดกลิ่น (deodorization) โดยการกลั่นด้วยไอน้ำภายใต้สุญญากาศ อุณหภูมิ 140-230 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 5-12 ชั่วโมง จะได้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ออกมา

3. การผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์

การผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ (Virgin coconut oil) สามารถผลิตได้หลายแนวทาง แต่จากการศึกษาและสำรวจผู้ผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ในประเทศไทย พบว่ามีกระบวนการผลิต 3 วิธีหลัก ๆ ดังนี้

3.1 กระบวนการเหวี่ยงแยก

กระบวนการเหวี่ยงแยก (centrifuge process) การผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ด้วยวิธีเหวี่ยงแยก โดยอาศัยความหนาแน่นที่แตกต่างกันระหว่างน้ำมัน น้ำ และตะกอน การเหวี่ยงแยก เป็นวิธีแยกน้ำมันที่ใช้ระยะเวลาสั้นและรักษาคุณภาพของน้ำมันมะพร้าวได้ดี เนื่องจากไม่การให้ความร้อนแก่น้ำมันในขั้นตอนการผลิต หลักการคือนำกะทิมาเหวี่ยงแยกของแข็งและน้ำออกจากน้ำมัน ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์คือชั้นน้ำมันที่อยู่ด้านบน วิธีการนี้จะมีค่าใช้จ่ายในการลงทุนสูง เนื่องจากอุปกรณ์เหวี่ยงแยกซึ่งมีราคาแพง (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศ, 2548)

ธนานันท์ ตันฑกูล (2549) ศึกษาการบวนการแยกน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์โดยการเหวี่ยงแยกพบว่าการเหวี่ยงแยกที่ให้ร้อยละของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้ต่อร้อยละของไขมันสูงสุด คือนำกะทิคั้นสดมาปรับค่าพีเอชที่ 3.9 จากนั้นเหวี่ยงแยกโดยใช้ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่เวลา 90 นาที ได้น้ำมันร้อยละ 93.07 โดยมีค่ากรดอยู่ในระดับมาตรฐาน

3.2 กระบวนการบีบเย็น

การผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ด้วยวิธีบีบเย็น(cold press process) เป็นวิธีแยกเอาน้ำมันออกจากเนื้อมะพร้าวที่อบแห้งจนเหลือความชื้นประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ นำมาเข้าเครื่องบีบ น้ำมันที่ได้จะมีตะกอนละเอียดปนออกมากับน้ำมันด้วย จึงต้องตั้งทิ้งไว้หรือกรองให้ใสก่อนนำน้ำมันไปใช้ (นฤมล จียโชค, 2549) วัตถุดิบที่ใช้หรือเนื้อมะพร้าวต้องผ่านการอบ และต้องกำจัดความชื้นของวัตถุดิบให้เหมาะกับเครื่องที่ใช้ กรรมวิธีนี้จะผลิตน้ำมันได้ปริมาณที่มาก และขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของเครื่องบีบด้วย ซึ่งประสิทธิภาพของเครื่องบีบแบบสกรู คือเครื่องสามารถผลิตน้ำมันได้ 11 กิโลกรัมต่อชั่วโมง (น้ำมัน 12 ลิตรต่อชั่วโมง) หรือ 30 กิโลกรัมเนื้อมะพร้าวต่อชั่วโมง แต่การผลิตโดยวิธีนี้จะต้องลงทุนสูงเนื่องจากต้องใช้พลังงานในการอบ และเฉพาะค่าเครื่องมือบีบน้ำมันก็มีราคานับ 100,000 บาท

3.3 กระบวนการหมัก

การผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ด้วยวิธีหมัก (fermentation process) เป็นวิธีการผลิตที่ให้น้ำมันที่ดีที่สุด วิธีการไม่ซับซ้อน สามารถทำได้ในอุตสาหกรรมระดับครัวเรือน การผลิตเริ่มต้นโดยการบีบน้ำกะทิจากเนื้อมะพร้าวที่เก็บเกี่ยวมาเป็นเวลาไม่เกิน 24 ชั่วโมง องค์ประกอบในน้ำกะทิประกอบด้วยน้ำมัน น้ำ โปรตีนและอื่นๆ จากนั้นหมักน้ำกะทิเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง น้ำมันจะแยกชั้นออกจากชั้นน้ำ ให้ความร้อนแก่น้ำมันเพื่อกำจัดความชื้นและกรอง ข้อเสียของกระบวนการนี้คือการผลิตจะเป็นไปในระดับเล็ก ทำให้การควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้สม่ำเสมอได้ยาก (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2548)

โดยทั่วไปแล้ววิธีการสกัดเย็นเป็นวิธีที่ได้ผลผลิตต่ำประมาณ 30-40% ของเนื้อมะพร้าวสด (Che Man *et al.*, 1997) หรือประมาณ 20% ของน้ำกะทิ (มะพร้าวผสมน้ำอุ่น1:1) ที่ผ่านกระบวนการหมักตามธรรมชาติ (Fuangworawong *et al.*, 2008) มักจะมีคุณภาพทางด้านเคมีต่ำคือมีความชื้นและปริมาณกรดไขมันอิสระสูงดังนั้นมักหืนง่ายและเปลี่ยนเป็นสีคล้ำจึงมีอายุการเก็บรักษาทางด้านประสาทสัมผัสสั้น (Soeka *et al.*, 2008) นอกจากนี้กระบวนการผลิตต้องใช้แรงงานมากและเวลานาน แต่ในขณะเดียวกันผลิตภัณฑ์ที่ได้คงรักษากลิ่นรสได้ดี (Villarino *et al.*, 2007; Loo, 1982) และคงรักษาคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สมบัติการต้านอนุมูลอิสระและเมทาบอลิซึมของไขมันได้ดีกว่าน้ำมันที่สกัดจากมะพร้าวแห้ง (Nevin & Rajamohan, 2009)

มาตรฐานผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าว

1. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน

มาตรฐานน้ำมันมะพร้าว (มผช ๖๗๐/๒๕๔๗) น้ำมันมะพร้าว หมายถึง น้ำมันที่ได้จากการนำเนื้อมะพร้าวมาผ่านกรรมวิธีต่างๆ เช่น บีบ อัดให้ความร้อน เพื่อให้ได้น้ำมันมะพร้าว แล้วนำมาแยกตะกอน

คุณลักษณะที่ต้องการ

1.1 ลักษณะทั่วไป

ต้องใส ไม่มีตะกอนหรือแยกชั้น

1.2 สี

ต้องมีสีที่ดีตามธรรมชาติของน้ำมันมะพร้าว

1.3 กลิ่น

ต้องมีกลิ่นที่ดีตามธรรมชาติของน้ำมันมะพร้าว ปราศจากกลิ่นหืนหรือกลิ่นอื่นที่ไม่พึงประสงค์ เมื่อตรวจสอบโดยวิธีให้คะแนนโดยวิธีทดสอบที่แนะนำแล้ว ต้องได้คะแนนเฉลี่ยของแต่ละลักษณะจากผู้ตรวจสอบทุกคนไม่น้อยกว่า 3 คะแนน และไม่มีลักษณะใดได้ 1 คะแนน จากผู้ตรวจสอบคนใดคนหนึ่ง

1.4 สิ่งแปลกปลอม

ต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ เช่น เส้นผม ดิน ทราย กรวด ชิ้นส่วนหรือสิ่งปฏิกูลจากสัตว์

1.5 น้ำและสิ่งที่ระเหยได้ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส

ต้องไม่เกินร้อยละ 0.2 ของน้ำหนัก

1.6 ค่าเพอร์ออกไซด์

ต้องไม่เกิน 10 มิลลิกรัมสมมูลเพอร์ออกไซด์ออกซิเจนต่อกิโลกรัม

1.7 สารปนเปื้อน

1.7.1 ตะกั่ว ต้องไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

1.7.2 สารหนู ต้องไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

1.8 วัตถุเจือปนอาหาร

หากมีการใช้วัตถุเจือปนอาหาร ให้ใช้ได้ตามชนิดและปริมาณที่กฎหมายกำหนด

1.9 ค่าของกรด

ต้องไม่เกิน 4 มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัม

1.10 จุลินทรีย์

จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ต้องไม่เกิน 1.5×10^{3} โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

1.11 การสอบลักษณะทั่วไป สี และกลิ่น

1.11.1 ให้แต่งตั้งคณะผู้ตรวจสอบ ประกอบด้วยผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจสอบน้ำมันมะพร้าวอย่างน้อย 5 คน แต่ละคนจะแยกกันตรวจและให้คะแนนโดยอิสระ

1.11.2 เทตัวอย่างน้ำมันมะพร้าวลงในจานกระเบื้องสีขาว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบโดยการตรวจพินิจ หลักเกณฑ์การให้คะแนนให้เป็นไปตามตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 หลักเกณฑ์การให้คะแนนตรวจสอบน้ำมันมะพร้าว

ลักษณะที่ตรวจสอบ	เกณฑ์ที่กำหนด	ระดับการตัดสิน (คะแนน)			
		ดีมาก (4)	ดี (3)	พอใช้ (2)	ต้องปรับปรุง (1)
ลักษณะทั่วไป	ต้องใส ไม่มีตะกอนหรือแยกชั้น				
สี	ต้องมีสีที่ดีตามธรรมชาติของน้ำมันมะพร้าว				
กลิ่น	ต้องมีกลิ่นที่ดีตามธรรมชาติของน้ำมันมะพร้าว ปราศจากกลิ่นหืน หรือกลิ่นอื่นที่ไม่พึงประสงค์				

ที่มา: มผช.๖๗๐/๒๕๔๗

2. มาตรฐาน อย.

น้ำมันมะพร้าวเป็นอาหารควบคุมเฉพาะ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 57 (พ.ศ.2524) เรื่อง น้ำมันมะพร้าว กำหนดให้น้ำมันมะพร้าวที่ผลิตเพื่อจำหน่าย นำเข้าเพื่อจำหน่าย หรือที่จำหน่าย เพื่อใช้รับประทานหรือใช้ปรุงแต่งอาหาร ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐาน ดังต่อไปนี้

2.1 มีค่าของกรด (acid value) ไม่เกิน 4.0 มิลลิกรัม โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ต่อน้ำมัน 1 กรัม สำหรับน้ำมันมะพร้าวที่ทำโดยวิธีธรรมชาติ และไม่เกิน 0.6 มิลลิกรัม โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ต่อน้ำมัน 1 กรัม สำหรับน้ำมันมะพร้าวที่ทำโดยวิธีผ่านกรรมวิธี

2.2 มีค่าเพอร์ออกไซด์ (peroxide value) ไม่เกิน 10.0 มิลลิกรัมสมมูลย์เพอร์ออกไซด์ ออกซิเจน ต่อน้ำมัน 1 กิโลกรัม

2.3 มีส่วนประกอบของกรดไขมัน (fatty acid) เป็นร้อยละของกรดไขมันทั้งหมดโดยใช้วิธีก๊าซลิควิด โครมาโตกราฟฟีหรือ จี แอล ซี (gas liquid chromatography หรือ GLC) ดังตารางที่ 2.3 ดังนี้

ตารางที่ 2.3 ส่วนประกอบของกรดไขมัน (fatty acid) เป็นร้อยละของกรดไขมันทั้งหมดโดยใช้วิธีก๊าซลิควิดโครมาโตกราฟฟี

ส่วนประกอบของกรดไขมัน (fatty acid compo ition)	จำนวนคาร์บอน:พันธะคู่	% ของกรดไขมันทั้งหมด
กรดคาโปรอิค (Caproic acid)	C 6:0	ไม่เกิน 1.2
กรดคาปรีลิค(Caprylic acid)	C 8:0	ระหว่าง 3.4 ถึง 15
กรดคาปริค (Capric acid)	C 10:0	ระหว่าง 3.2 ถึง 15
กรดลอริค (Lauric acid)	C 12:0	ระหว่าง 41 ถึง 56
กรดไมริสติค (Myristic acid)	C 14:0	ระหว่าง 13 ถึง 23
กรดปาล์มมิติค (Palmitic acid)	C 16:0	ระหว่าง 4.2 ถึง 12
กรดสเตียริค (Stearic acid)	C 18:0	ระหว่าง 1.0 ถึง 4.7

ที่มา: ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 57 (พ.ศ.2524) เรื่อง น้ำมันมะพร้าว

2.4 มีค่าสปอนิฟิเคชั่น (saponification value) ระหว่าง 248 ถึง 265 มิลลิกรัม โพแทสเซียมไฮดรอกไซต่อน้ำมัน 1 กรัม

2.5 มีค่าไอโอดีนแบบวิจส์ (iodine value, Wijs) ระหว่าง 6 ถึง 11

2.6 มีสารที่สปอนิฟายไม่ได้ (unsaponifiable matter) ไม่เกินร้อยละ 1.5 ของน้ำหนัก

2.7 มีสิ่งที่ระเหยได้ (volatile matter) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ไม่เกินร้อยละ 0.2 ของน้ำหนัก

2.8 มีปริมาณสบู่ (soap content) ไม่เกินร้อยละ 0.005 ของน้ำหนัก

2.9 มีกลิ่นและรสตามลักษณะเฉพาะสำหรับน้ำมันมะพร้าว

2.10 มีสิ่งอื่นที่ไม่ละลาย (insoluble impurities) ไม่เกินร้อยละ 0.05 ของน้ำหนัก

2.11 ไม่มีกลิ่นหืน

2.12 ไม่มีน้ำมันแร่

คุณสมบัติของน้ำมันมะพร้าว

น้ำมันมะพร้าวเป็นน้ำ มันที่สกัดจากเนื้อมะพร้าวแห้ง (copra) ของต้นมะพร้าว ซึ่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า โคคอสนิวซิเฟอรา (*Cocos nucifera*) น้ำมันมะพร้าวมีสีตั้งแต่สีเหลืองอ่อนจนถึงไม่มีสีอยู่ในสภาพของเหลวที่อุณหภูมิสูงกว่า 26 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 23 องศาเซลเซียส ลงมาเล็กน้อย น้ำมันมะพร้าวจะแข็งตัว ทั้งนี้เนื่องจากมีกรดไขมันโมเลกุลสั้นอยู่มากถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันอิ่มตัว การมีกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) น้อย ทำให้น้ำมันมะพร้าวมีความคงทนต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี ค่ามาตรฐานของน้ำมันมะพร้าวแสดงใน ตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 กรดไขมันอิสระและค่ามาตรฐานของน้ำมันมะพร้าว

ค่ามาตรฐาน	ค่ามาตรฐานที่กำหนด
ความถ่วงจำเพาะ ที่ 99 / 15.5 องศาเซลเซียส	0.869-0.874
ที่ 25 / 15.5 องศาเซลเซียส	0.917-0.919
ดัชนีหักเห ที่ 40 องศาเซลเซียส	1.448-1.450
ค่าไอโอดีน (iodine number)	7.5-10.5
จุดหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	23-26
ค่าสปอนิฟิเคชั่น (sponification number)	250-264
มีสารที่สปอนิฟายไม่ได้ (unsponifiable matter), %	ไม่เกิน 0.5
titer, องศาเซลเซียส	20-24
setting point, องศาเซลเซียส	21.8-23
Reichert-Meissel value	6-8
Polenske value	15-18

ปัจจุบันมีการนำน้ำมันมะพร้าวมาใช้ในหลายรูปแบบ ทั้งน้ำมันที่ไม่ได้ไฮโดรจิเนต (unhydrogenated oil) น้ำมันที่ไฮโดรจิเนตบางส่วน (partially hydrogenated oil) และน้ำมันที่ไฮโดรจิเนตจนแข็งตัว (fully hydrogenated oil) น้ำมันที่ไม่ได้ไฮโดรจิเนตใช้เป็นตัวเคลือบ (coating) ของไอศครีมแท่งเนื่องจากแข็งตัวเมื่ออยู่ในรูปผลิตภัณฑ์และหลอมตัวอย่างรวดเร็วเมื่อรับประทาน นอกจากนี้ยังนำมาใช้เป็นน้ำมันทอดพวกผลไม้เปลือกแข็ง (nuts) และอาหารว่าง (snacks) การที่น้ำมันมะพร้าวมีกรดไขมันโมเลกุลสายสั้น ทำให้มีค่าความหนืดต่ำกว่าน้ำมันทั่วไปจึงทำให้มีความรู้สึกเลี่ยน (greasy) น้อยเมื่อรับประทาน และเหมาะที่จะใช้ในการฉีดเคลือบ (spray coating) ผลิตภัณฑ์จากธัญชาติและขนมปังกรอบ และใช้เป็นสารหล่อลื่นผลิตภัณฑ์ลูกกวาดต่างๆ เช่น คาราเมล (caramel) ส่วนน้ำมันมะพร้าวที่ไฮโดรจิเนตบางส่วนนั้น มีการนำมาใช้แทนน้ำมันเนยในการผลิตนมข้นหวาน ประโยชน์ของนมข้นหวาน นอกจากจะใช้บริโภคโดยตรงแล้ว ยังสามารถใช้แทนน้ำมันเนยในการทำขนมอบต่างๆ ไอศครีม ลูกกวาด ขนมพาย เอแคลร์ และมายองเนส ส่วนน้ำมันมะพร้าวที่ทำให้แข็งตัว มักใช้ในผลิตภัณฑ์พวกไขมันครีมสังเคราะห์แทนไขมันจากเนย

สมบัติของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์

น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ เป็นผลิตภัณฑ์ที่สร้างมูลค่าเพิ่มให้กับมะพร้าว มีสรรพคุณในการใช้ทาผิวช่วยชะลอการเหี่ยวย่น ป้องกันแสงแดด และบำรุงสุขภาพผิวให้ชุ่มชื้น นอกจากนั้นยังสามารถนำมารับประทาน เพื่อช่วยลดปัญหาคอเลสเตอรอลในเลือด ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอ้วนและโรคหัวใจสร้างภูมิคุ้มกันโรค และเสริมสุขภาพให้แข็งแรงได้

น้ำมันมะพร้าวประกอบด้วยธาตุคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) มาเกาะรวมกันเรียกว่า กรดไขมัน (fatty acids) กรดไขมันเมื่อรวมกับกลีเซอรอล (glycerol) จะได้เป็นกลีเซอไรด์ (glyceride) น้ำมันมะพร้าวประกอบด้วยไตรกลีเซอร์ไรด์ (triglyceride) เป็นส่วนมาก และมีโมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) และไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) เพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับไขมันและน้ำมันอย่างอื่น

น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์จะมีเปอร์เซ็นต์ของกลีเซอรอลสูงกว่า 13.5-15 เปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำมันชนิดอื่นมีกลีเซอรอล 9-11 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่งที่มีส่วนประกอบทางเคมีคล้ายน้ำตาล โครงสร้างของน้ำมันมะพร้าว เมื่อพิจารณาถึงคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบของกรดไขมันที่อิ่มตัวน้ำมันมะพร้าวจัดเป็นไตรกลีเซอไรด์ที่มีสายโซ่คาร์บอน (carbon chain) ขนาดกลาง เพราะมีคาร์บอนไม่เกิน 12 อะตอม หรือเรียกว่า MCFA (Medium Chain Fatty Acids; C8-C12) ซึ่งต่างจากไขมันสัตว์ที่มี carbon chain ขนาดยาวคือมีคาร์บอนเกินกว่า 12 อะตอม ซึ่งมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน

ดังนั้นถ้าบริโภคน้ำมันมะพร้าวในปริมาณที่พอเหมาะกับความต้องการของร่างกาย ไขมันจะถูกใช้ในการเผาผลาญให้เกิดพลังงานแก่ร่างกายจนหมด ไม่มีเหลือสะสมจนก่อให้เกิดผลร้ายแก่ร่างกายนอกจากนั้นในน้ำกะทิ (coconut milk) น้ำมันมะพร้าว และเนื้อมะพร้าว ยังมีกรดลอริก (lauric acid) ปริมาณสูง โดยเฉพาะน้ำมันมะพร้าวมีมากถึง 40-50 เปอร์เซ็นต์ กรดลอริกนี้สามารถเปลี่ยนเป็นโมโนลอริน (monolaurin) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสได้ โดยเฉพาะไวรัสเอชไอวี (HIV), หัด (measles) และเริม (herpes) กลไกที่สารโมโนลอรินฆ่าไวรัส คือการที่โมโนลอรินสามารถแทรกซึมเข้าไปในส่วนไขมันที่ห่อหุ้มไวรัส (fatty envelope) และทำให้เยื่อหุ้มนั้นถูกทำลายไวรัสจึงตาย จากการศึกษาพบว่าโมโนลอรินสามารถยับยั้งและลดการกระจายตัวของไวรัสเอชไอวีได้ และกรดไขมันสายปานกลาง (MCFA) ในน้ำมันมะพร้าวมีโครงสร้างเหมือนกับไขมันในน้ำนมมารดาที่ช่วยสร้างภูมิคุ้มกันโรคให้แก่เด็กทารก และสามารถละลายเกราะหุ้มของเชื้อโรคที่สารปฏิชีวนะอื่นๆ ไม่สามารถทำลายได้ น้ำมันมะพร้าวสามารถลดอัตราเสี่ยงของการแข็งตัวของหลอดเลือดหัวใจ ลดอัตราการเกิดโรคมะเร็ง โรคกระดูกพรุน และควบคุมโรคเบาหวาน โดยน้ำมันมะพร้าวจะไปขัดขวางเชื้อโรคโดยสร้างภูมิคุ้มกัน ช่วยให้สุขภาพแข็งแรง และเป็นแหล่งพลังงานได้ รวมทั้งให้ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อร่างกาย โดยร่างกายสามารถดูดซึมได้ง่าย (ธนานันท์ ตันฑกูล, 2549)

จะเห็นได้ว่าน้ำมันมะพร้าวมีคุณค่าต่อสุขภาพทั้งด้านอาหารและยา จึงควรพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ สำหรับบริโภค ใช้ในเครื่องสำอาง และโดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในกิจการสปา ซึ่งปัจจุบันเป็นธุรกิจที่มีการขยายตัวสูง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนากระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ

ประโยชน์ของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์

น้ำมันมะพร้าวจัดเป็นน้ำมันพืชชนิดแรกๆ ที่เรารู้จักและนำมาใช้ปรุงอาหารหรือบำรุงความงาม เช่น ทาผิว หมักผม เป็นต้น แต่ภายหลังนิยมบริโภคน้อยลง เพราะมีกรดไขมันอิ่มตัวสูงทำให้อ้วนและเกิดไขมันสะสม ส่วนน้ำมันมะพร้าวที่กินเพื่อลดความอ้วนในปัจจุบันไม่เหมือนกับน้ำมันมะพร้าวแบบเดิมที่สกัดโดยใช้ความร้อน แต่เป็นน้ำมันมะพร้าวที่เรียกว่า Virgin coconut oil ซึ่งผ่านกระบวนการบีบเย็น คือใช้วิธีการปั่น บีบน้ำมันออกมาโดยตรง หรือการแยกหมักด้วยแบคทีเรียเพื่อแยกน้ำมัน และด้วยกรรมวิธีที่แตกต่างนี้เองที่ทำให้สรรพคุณของน้ำมันมะพร้าวสองชนิดแตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง

น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มีองค์ประกอบของกรดไขมันที่มีประโยชน์อยู่มาก โดยเฉพาะกรดไขมันความยาวขนาดกลาง ซึ่งเมื่อกินเข้าไปจะมีปฏิกิริยาคล้ายน้ำตาล คือจะถูกส่งผ่านกระแสเลือดโดยตรง จึงเข้าสู่เซลล์และสลายตัวได้เร็ว แตกต่างจากน้ำมันพืชชนิดอื่น นอกจากนี้ยังพบสารไมโครนิวเตรียนบางตัวที่อยู่ในมะพร้าว เช่น กลุ่มฮอร์โมนพืช ซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพและช่วยให้ผิวเปล่งปลั่ง น้ำมันมะพร้าวมีประโยชน์ทั้งในแง่ของสุขภาพและความงาม ดังนี้

1. บทบาทของน้ำมันมะพร้าวต่อสุขภาพ

1.1 การรักษาสุขภาพให้แข็งแรง ผู้บริโภคน้ำมันมะพร้าวมีสุขภาพดี แข็งแรง เพราะได้พลังงานทันทีที่บริโภคน้ำมันมะพร้าว มีวิตามิน และเกลือแร่ ที่ช่วยให้ร่างกายแข็งแรง อีกทั้งยังช่วยเพิ่มคุณค่าของอาหารโดยการเพิ่มการดูดซึมวิตามิน เกลือแร่ และกรดอะมิโน เนื่องจากน้ำมันมะพร้าวเป็นโมเลกุลขนาดเล็ก จึงถูกย่อยง่าย และเคลื่อนที่เร็วไปตามของเหลวในร่างกาย จึงเป็นที่นิยมใช้หุงต้มอาหารสำหรับคนไข้ที่มีปัญหาการย่อยไขมัน และยังใช้ในสูตรน้ำนม เพื่อให้ไขมันที่จำเป็นแก่เด็กทารก และช่วยในการดูดซึมแคลเซียม และแมกนีเซียม ซึ่งจำเป็นสำหรับการพัฒนากระดูก

1.2 ช่วยให้ปลอดจากโรคไม่ติดเชื้อ โรคไม่ติดเชื้อที่น้ำมันมะพร้าวมีส่วนในการลดอัตราการเกิดโรคดังกล่าว ได้แก่

1.2.1 โรคหัวใจ น้ำมันมะพร้าวมีคอเลสเตอรอลน้อยมาก เมื่อบริโภคน้ำมันมะพร้าวเข้าไปร่างกายก็ไม่ได้เปลี่ยนเป็นคอเลสเตอรอลในกระแสโลหิต ทั้งไม่ทำให้หลอดเลือดแข็งตัวเหมือนกับน้ำมันพืชประเภทไม่อิ่มตัว เช่นน้ำมันถั่วเหลืองที่ถูกเติมไฮโดรเจน (hydrogenate) ในขบวนการผลิต และถูกเติมออกซิเจน (oxidize) ระหว่างเดินทางก่อนถูกบริโภค จนเกิดเป็น trans fatty acids ซึ่งเป็นตัวการทำให้เกิดลิ่มเลือด และไปอุดตันหลอดเลือด นอกจากนั้นน้ำมันมะพร้าวยังมีวิตามินอีที่ช่วยขยายหลอดเลือดและป้องกันการแข็งตัวของหลอดเลือดที่เป็นสาเหตุของโรคหัวใจ

นักโภชนาการสมัยใหม่จึงสรุปว่า น้ำมันมะพร้าวช่วยทำให้หัวใจมีสุขภาพดี เพราะเป็นหนึ่งในสองชนิดของน้ำมันบริโภค ซึ่งช่วยลดความหนืด (stickiness) ของเลือดที่เป็นสาเหตุของโรคหัวใจ

1.2.2 โรคมะเร็ง น้ำมันมะพร้าวมีประสิทธิภาพในการป้องกันไม่ให้เกิดโรคมะเร็ง ด้วยกลไก 2 วิธี คือ

1) เนื่องจากเป็นน้ำมันประเภทอิ่มตัว จึงไม่ถูกเติมไฮโดรเจน (hydrogenate) และแตกตัวเมื่อถูกกับอุณหภูมิสูง

2) มีวิตามินอี ช่วยต่อต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุของการกลายพันธุ์ของยีน เกิดเป็นเซลล์มะเร็ง และการทำร้ายเซลล์ การใช้น้ำมันมะพร้าวชโลมตัว ก็ช่วยป้องกันมะเร็งผิวหนังได้ดีกว่ายาทากันแดดราคาแพง

1.2.3 โรคอ้วน โรคอ้วนนั้นมีความสัมพันธ์กับสภาพต่างๆ เช่น การมีไขมันในเลือดสูงเป็นโรคเบาหวานมีความดันโลหิตสูง เป็นโรคหัวใจและหลอดเลือด ตลอดจนโรคข้ออักเสบ ภาวะหยุดหายใจขณะหลับ ฯลฯ การบริโภคน้ำมันมะพร้าวจะช่วยทำให้ร่างกายเกิดความร้อนสูง (ในขบวนการ thermogenesis) ทำให้ร่างกายมีอัตราการเผาผลาญอาหาร หรือเมตาบอลิซึม (metabolism) สูงเกิดเป็นพลังงานสำหรับใช้ในการดำรงชีวิต อีกทั้งยังช่วยทำลายไขมันที่ร่างกายสะสมอยู่ นำไปใช้เป็นพลังงาน ดังนั้น ผู้บริโภคน้ำมันมะพร้าวเป็นประจำจึงไม่อ้วน

1.2.4 โรคเบาหวาน ผลพลอยได้ของการเพิ่มอัตราการเผาผลาญอาหารให้เป็นพลังงาน จากการบริโภคน้ำมันมะพร้าวทำให้ร่างกายไม่สะสมน้ำตาล เพราะถูกใช้ไปเป็นพลังงานหมด อีกทั้งยังไม่ทำให้ผู้ป่วยอยากรับประทานอาหารที่เป็นแป้งหรือน้ำตาล จึงช่วยลดอัตราการเกิดโรคเบาหวานได้

1.2.5 โรคปวดเมื่อย โรคชราภาพก่อนวัย โรคมะเร็งผิวหนัง และโรคกระดูก น้ำมันมะพร้าวเป็นน้ำมันที่ถูกดูดซึมเข้าทางผิวหนังได้ดี เพราะมีขนาดของโมเลกุลเล็ก จึงนิยมใช้นวดตัวให้หายปวดเมื่อย และผ่อนคลายความเครียด อีกทั้งยังปกป้องการทำลายของแสงอัลตราไวโอเลตที่ทำให้ผิวหนังเหี่ยวย่นแก่ก่อนวัย และเป็นมะเร็งผิวหนัง ช่วยเสริมสร้างพัฒนาการของกระดูกให้แข็งแรง แพทย์แผนไทยจึงนิยมนำน้ำมันมะพร้าว มาประกอบเป็นสูตรยาแผนโบราณในการรักษาโรคที่เกี่ยวกับกระดูก อันเนื่องมาจากการประสบอุบัติเหตุ

1.3 ช่วยให้ร่างกายปลอดจากโรคติดเชื้อ จุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรคเป็นสาเหตุของโรคมากมาย แต่ก็แปลกที่เด็กทารกแรกคลอดที่ดูดน้ำนมมารดาเป็นประจำมักไม่ค่อยเป็นโรคเหล่านี้ ทั้งนี้ก็เพราะมีภูมิคุ้มกันที่ได้มาจากน้ำนมมารดา ได้มีการค้นพบว่าสารสำคัญในนมน้ำเหลือง (cholostum) ของมารดานี้ คือ กรดลอริก ซึ่งเมื่อเข้าไปในร่างกายก็เปลี่ยนไปเป็นสารโมโนลอริน ซึ่ง

มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะนั่นเอง ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันมะพร้าว พบว่า มีปริมาณกรดลอริกสูงมากถึง 48-53% ซึ่งมากกว่าในน้ำนมมารดามาก ในปัจจุบันวงการแพทย์สมัยใหม่ได้แนะนำให้ประชาชนกินยาเม็ดที่มีโมโนลอรินเพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกันโรค

1.4 การรักษาโรค น้ำมันมะพร้าวมีคุณสมบัติเป็นยาฆ่าเชื้อ และสามารถดูดซึมเข้าไปในร่างกายได้ดี และรวดเร็ว ตำราอายุรเวทของอินเดียจึงได้ใช้น้ำมันมะพร้าวรักษาโรคมาไม่ต่ำกว่า 4,000 ปี แพทย์แผนไทยก็ได้ใช้น้ำมันมะพร้าวรักษาโรคทั้งภายในและภายนอกมาเป็นเวลาช้านาน เช่น ในตำราพระโอสถพระนารายณ์ ตั้งแต่สมัยกรุงศรีอยุธยาได้ใช้น้ำมันมะพร้าวเป็นยานวดแก้ปวดเมื่อย ยารักษาโรคกระดูก ยารักษาแผลเน่าเปื่อย ส่วนตำราแพทย์แผนไทยในปัจจุบันก็แนะนำให้ใช้น้ำมันมะพร้าวรักษาโรคกระดูกที่เกิดจากอุบัติเหตุ รักษาเม็ดผดผื่นคัน ลบริ้วรอย แผลฟกช้ำ ซ่อมแซมส่วนสึกหรอ ป้องกันแสงแดดและความร้อน แม้กระทั่งแพทย์แผนปัจจุบันชาวตะวันตกก็ให้คนไข้ที่มีปัญหาเกี่ยวกับการย่อยอาหารหรือการดูดซึมอาหาร เด็กทารกรวมทั้งเด็กเล็กที่ไม่สามารถย่อยไขมัน กินน้ำมันมะพร้าวเป็นยารักษาโรค ศักยภาพของน้ำมันมะพร้าวในการรักษาโรคมีดังนี้

โรคที่เกิดจากการติดเชื้อต่างๆ เชื้อโรคที่กรดลอริกในน้ำมันมะพร้าวสามารถทำลายได้ ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ รา โปรโตซัว และเชื้อไวรัส โมโนลอรินหรือสารปฏิชีวนะในน้ำมันมะพร้าว มีจุดเด่น 2 ประการ คือ ไม่ทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อโรคและสามารถฆ่าเชื้อโรคบางชนิดที่มีเกราะไขมันห่อหุ้มเซลล์ ที่ยาปฏิชีวนะธรรมดาไม่สามารถฆ่าได้ แต่น้ำมันมะพร้าวสามารถละลายเกราะไขมันนี้ได้ จึงเข้าไปฆ่าเชื้อโรคเหล่านี้ การวิจัยพบว่าเชื้อโรคที่มีเกราะไขมันห่อหุ้มนี้เป็นโรคร้ายในปัจจุบันที่รักษายากมาก เพราะทำลายมันไม่ได้ อย่างดีก็หยุดไม่ให้มันขยายพันธุ์โรคเหล่านี้ เช่น ไวรัส โรคเอดส์ โรค SARS ซึ่งได้ผลเป็นที่น่าพอใจ และกำลังมีการทดลองเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผล

2. บทบาทของน้ำมันมะพร้าวต่อความงาม

น้ำมันมะพร้าวเป็นน้ำมันที่ได้จากธรรมชาติ ปราศจากสารเคมีสังเคราะห์ใดๆ เจือปน โดยเฉพาะยากำจัดศัตรูพืช ซึ่งมักจะมีอยู่ในน้ำมันพืชอื่นๆ เนื่องจากกรดไขมันในน้ำมันมะพร้าวมีขนาดโมเลกุลที่เล็ก ทำให้ถูกดูดซึมเข้าไปได้ง่าย เราสามารถใช้น้ำมันมะพร้าวในสภาพที่สกัดได้ตามธรรมชาติทันที โดยไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ ฟอกสี และกำจัดกลิ่น ดังเช่นน้ำมันพืชอื่นๆ จึงปลอดภัยจากอันตรายจากสารเคมี น้ำมันมะพร้าวมีบทบาทต่อความงาม ในเรื่องดังต่อไปนี้

2.1 รูปร่างได้สัดส่วน ไม่อ้วน แต่แข็งแรง เนื่องจากน้ำมันมะพร้าวที่เราบริโภคเข้าไปสามารถเปลี่ยนเป็นพลังงานได้ทันที จึงไม่มีไขมันสะสมในร่างกาย อีกทั้งยังกระตุ้นให้ต่อมไทรอยด์ทำงานดีขึ้น จึงนำเอาไขมันที่ร่างกายสะสมไว้ก่อนหน้า ไปใช้เผาผลาญให้เกิดพลังงาน จึง

ช่วยลดความอ้วนได้ ดังนั้นผู้ที่บริโภคน้ำมันมะพร้าวเป็นประจำจึงไม่อ้วน (เพราะไม่มีไขมันสะสม) แต่ร่างกายก็สันทัดสมส่วน และแข็งแรง

2.2 ผิวสวย การนวดหรือชโลมตัวด้วยน้ำมันมะพร้าว ช่วยให้ผิวสวยได้ดังนี้

2.2.1 ผิวดูอ่อนวัย น้ำมันมะพร้าวที่ใช้ชโลมตัว ทั้งในรูปน้ำมันมะพร้าวสดๆ หรือในรูปของผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าว เช่น ครีม และโลชันจะทำให้ผิวพรรณนุ่มไม่แตกแห้งเป็นกระ หรือฝ้า แต่ชุ่มชื้นและผิวเนียน ปราศจากริ้วรอยเหี่ยวย่น ทั้งนี้เพราะน้ำมันมะพร้าวมีวิตามินอีที่มีอานุภาพมากกว่าวิตามินอีในเครื่องสำอาง ช่วยต่อต้านอนุมูลอิสระที่เป็นตัวการที่ทำให้เกิดการเสื่อมของเซลล์ผิวหนัง ป้องกันการเสื่อมโทรมของเซลล์จากขบวนการเติมออกซิเจน ช่วยกำจัดเซลล์ผิวหนังที่ตายแล้วและทับถมกันจนทำให้ผิวแห้ง ขณะเดียวกันก็ช่วยกระตุ้นให้มีการสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นมาแทนที่จึงทำให้ผิวพรรณดูอ่อนกว่าวัย

2.2.2 ผิวนุ่มและเนียน ตามปกติผิวหนังจะสูญเสียความชื้นเพราะถูกแดดและลม น้ำมันมะพร้าวมีคุณสมบัติเป็นสารรักษาความชุ่มชื้น (moisturizer) จึงช่วยให้ผิวหนังนุ่มและเนียน

2.2.3 ช่วยป้องกันและรักษาฝ้าและกระ อนุมูลอิสระเป็นตัวการอันหนึ่งของการเกิดฝ้าและกระ วิตามินอีในน้ำมันมะพร้าวจะทำหน้าที่ทำลายอนุมูลอิสระเหล่านี้ เราสามารถใช้นำมันมะพร้าวเป็นยากันแดด ได้ดีอีกทั้งยังไม่เหนียวเหนอะหนะเหมือนยากันแดดบางชนิด และราคาก็ถูกกว่า

2.3 ผมงาม น้ำมันมะพร้าวมีคุณสมบัติเป็นตัวเพิ่มความชุ่มชื้น อีกทั้งยังมีสารปฏิชีวนะ (จากโมโนลอริน) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) จากสารโทโคทรินอลในวิตามินอี จึงมีส่วนทำให้ผมงามจากคุณสมบัติดังต่อไปนี้

2.3.1 ช่วยปรับสภาพของผม น้ำมันมะพร้าวเป็นน้ำมัน hair conditioner ที่ช่วยทำให้ผมนุ่มดำเป็นเงางาม เพราะมีวิตามินอีที่ช่วยเสริมการเจริญของเส้นผม

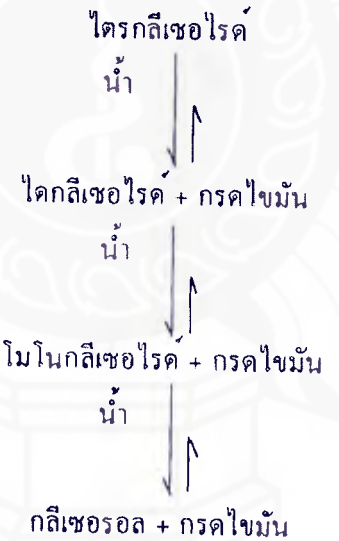
2.3.2 ช่วยรักษาสุขภาพของหนังศีรษะ เพราะมีสารปฏิชีวนะที่คอยทำลายเชื้อโรค หนังศีรษะจึงไม่มีรังแค และมีวิตามินอีที่ต่อต้านอนุมูลอิสระ หนังศีรษะจึงไม่เหี่ยวย่นและมีสุขภาพดี

2.3.3 ช่วยให้เส้นผมมีสุขภาพดี เส้นผมประกอบด้วยส่วนนอก (culticle) ที่ทำหน้าที่หุ้มส่วนใน (cortex) หากส่วนนอกอยู่ในสภาพดี ไม่ฉีกขาด เส้นผมก็จะปกติ มีความยืดหยุ่น (elasticity) ทนทานต่อการบิดงอและมีความเหนียว ส่วนในซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่เรียกว่าเคอราทิน (keratin) ที่ประกอบด้วยเส้นเล็กๆ มัดรวมกัน โปรตีนของเส้นผมจะสูญเสียหรือสลายตัวไปตามอายุขัย แต่อาจเร็วขึ้นจากการไม่รักษาผมให้ดี และการทำร้ายเส้นผม เช่น จากการดัดผม การย้อมผม

ด้วยน้ำยาเคมี แม้กระทั่งการหวีผมที่ใช้หวีที่คม น้ำมันมะพร้าวจึงช่วยลดปริมาณการสูญเสียของเส้นผม เพราะน้ำมันมะพร้าวมีคุณสมบัติยึดเกาะ (affinity) กับโปรตีนของเส้นผมได้ดี อีกทั้งยังมีขนาดเล็กจึงแทรกซึมเข้าไปในเส้นผมได้สะดวก ในขณะที่น้ำมันทานตะวันและน้ำมันแร่ (mineral oil) ซึ่งเป็นที่นิยมใช้เป็นส่วนประกอบในอุตสาหกรรมน้ำมันใส่ผม ไม่ได้มีส่วนช่วยแต่อย่างใด เพราะไม่สามารถซึมเข้าไปในเส้นผมได้เหมือนน้ำมะพร้าว (จีราภรณ์ สังข์ผุด และคณะ, 2554)

เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส (Triacylglycerol acylhydrolase, E.C.3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ (ester bond) ของไตรกลีเซอไรด์ซึ่งมีกรดไขมันสายยาวเป็นส่วนประกอบ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระ, ไดกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์ และกลีเซอรอล ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นบริเวณผิวสัมผัสระหว่างชั้นของสับสเตรทกับชั้นน้ำ (ol-waterinterface) นอกจากนี้ไลเปสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับได้โยเร่งการสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างกลีเซอรอลกับกรดไขมันอิสระ ภาพที่ 2.2 (สมรเมธ เจียรนัยกูร, 2540)



ภาพที่ 2.2 ปฏิกิริยาการสลายและการสร้างไตรกลีเซอไรด์โดยไลเปส

1. แหล่งของไลเปส

ไลเปสพบในสัตว์ พืช แบคทีเรีย และรา ในสัตว์พบได้ในน้ำนมและตับอ่อน (pancrease) ไลเปสจากพืชพบในเมล็ดที่กำลังงอกเช่น เมล็ดข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวไร่ย์ ฝ้าย ถั่วเหลือง และละหุ่ง เป็นต้น ไลเปสจากพืชและสัตว์มีความเสถียร (stabilty) ต่ำกว่าจุลินทรีย์ และมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ไลเปสที่ได้จากแบคทีเรียจะพบทั้งที่สร้างอยู่ในเซลและที่ขับออกมานอกเซล ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ไลเปสที่ได้จากเชื้อราส่วนมากจะสร้างแล้วขับออกนอกเซล ไลเปสจากจุลินทรีย์มีข้อดีกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ เนื่องจากจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้รวดเร็ว และเลี้ยงง่ายกว่าสัตว์ ไม่ต้องใช้พื้นที่มาก และไม่ขึ้นกับฤดูกาล นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตได้โดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์ (ทั้งวิธีการกลายพันธุ์และพันธุวิศวกรรม)

มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตไลเปสได้ ซึ่งไลเปสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดก็มีคุณสมบัติแตกต่างกัน จุลินทรีย์บางชนิดผลิตไลเปสที่ทำงานที่พีเอชเป็นด่าง (alkaline lipase) เช่น *Alcaligenes sp.*NO 579 บางชนิดผลิตไลเปสที่ทำงานที่พีเอชเป็นกลาง (neutral lipase) เช่นไลเปสชนิด A และ B จาก *Chromobacterium sp.* และบางชนิดผลิตไลเปสที่ทนอุณหภูมิสูง (Thermostable lipase) เช่น *Pseudomonas sp.* ซึ่งผลิตไลเปสที่สามารถทนอุณหภูมิได้ถึง 100 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์บางชนิดมีความสามารถผลิตไลเปสได้มากกว่าหนึ่งชนิด เช่น *Candida cylindracea* สามารถผลิตไลเปส A และ B ซึ่งไลเปสทั้งสองชนิดมีส่วนประกอบของอรดอะมิโน (amino acid composition) และน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน แต่มีคุณสมบัติต่างกันในด้านความเสถียรต่ออุณหภูมิและพีเอช ความไม่ชอบน้ำ และความจำเพาะต่อสับสเตรท การที่จุลินทรีย์สามารถผลิตไลเปสที่มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันทำให้สามารถเลือกไลเปสมาใช้ประโยชน์ให้เหมาะกับอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้มากมาย

2. ความจำเพาะของไลเปสต่อสับสเตรท

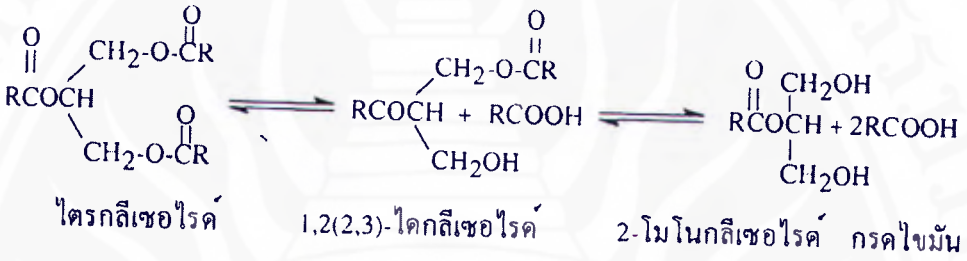
เอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะต่อสับสเตรท ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

2.1 ความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (positional specificity) ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

1) ไลเปสที่มีความจำเพาะที่ตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (1,3-specific lipases)

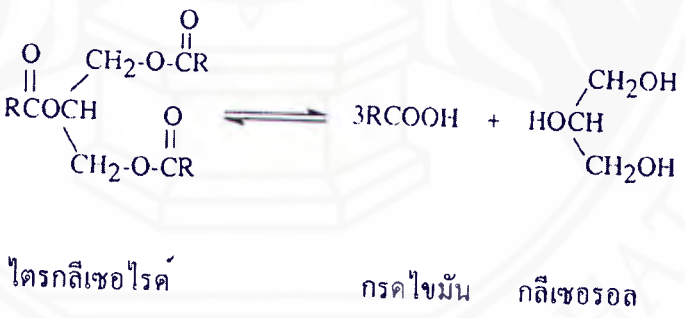
ไลเปสในกลุ่มนี้จะเร่งปฏิกิริยาการตัดกรดไขมันเฉพาะตำแหน่งที่อยู่ด้านนอกของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ คือตำแหน่งที่ 1 และ 3 เท่านั้น ได้กรดไขมันอิสระ, 1,2(2,3)-ไดกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ แต่เนื่องจากโมเลกุลของ 1,2(2,3)-ไดกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์

ไม่คงตัว ถ้าปล่อยให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นต่อไปการย้ายกรดไขมันจากตำแหน่งที่ 2 ไปยังตำแหน่งที่ 1 และ 3 ได้เป็น 1,3-ไดกลีเซอไรด์ และ1-โมโนกลีเซอไรด์ ซึ่งจะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้เป็นกลีเซอรอล และกรดไขมันอิสระ เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไลเปสจากตับอ่อน ไลเปสจากเชื้อรา เช่น *Aspergillus niger, Mucor javanicus* และ *Rhizopus delemar* ปฏิกิริยาของเอนไซม์กลุ่มนี้แสดงไว้ในภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 ปฏิกิริยาสลายไตรกลีเซอไรด์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

2) ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (non-speific lipases) ไลเปสในกลุ่มนี้สามารถตัดกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ได้ทั้งสามตำแหน่ง โดยไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมัน เมื่อมีการย่อยอย่างสมบูรณ์จะได้กรดไขมันอิสระ และ กลีเซอรอล ภาพที่ 1.4 แต่อาจพบไดกลีเซอไรด์และโมดนกลีเซอไรด์เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาได้ ไลเปสกลุ่มนี้ ได้แก่ ไลเปสจาก *Candida cylindracea, Pseudomonas cyclopium, Corynebacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น



ภาพที่ 2.4 ปฏิกิริยาการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ โดยไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

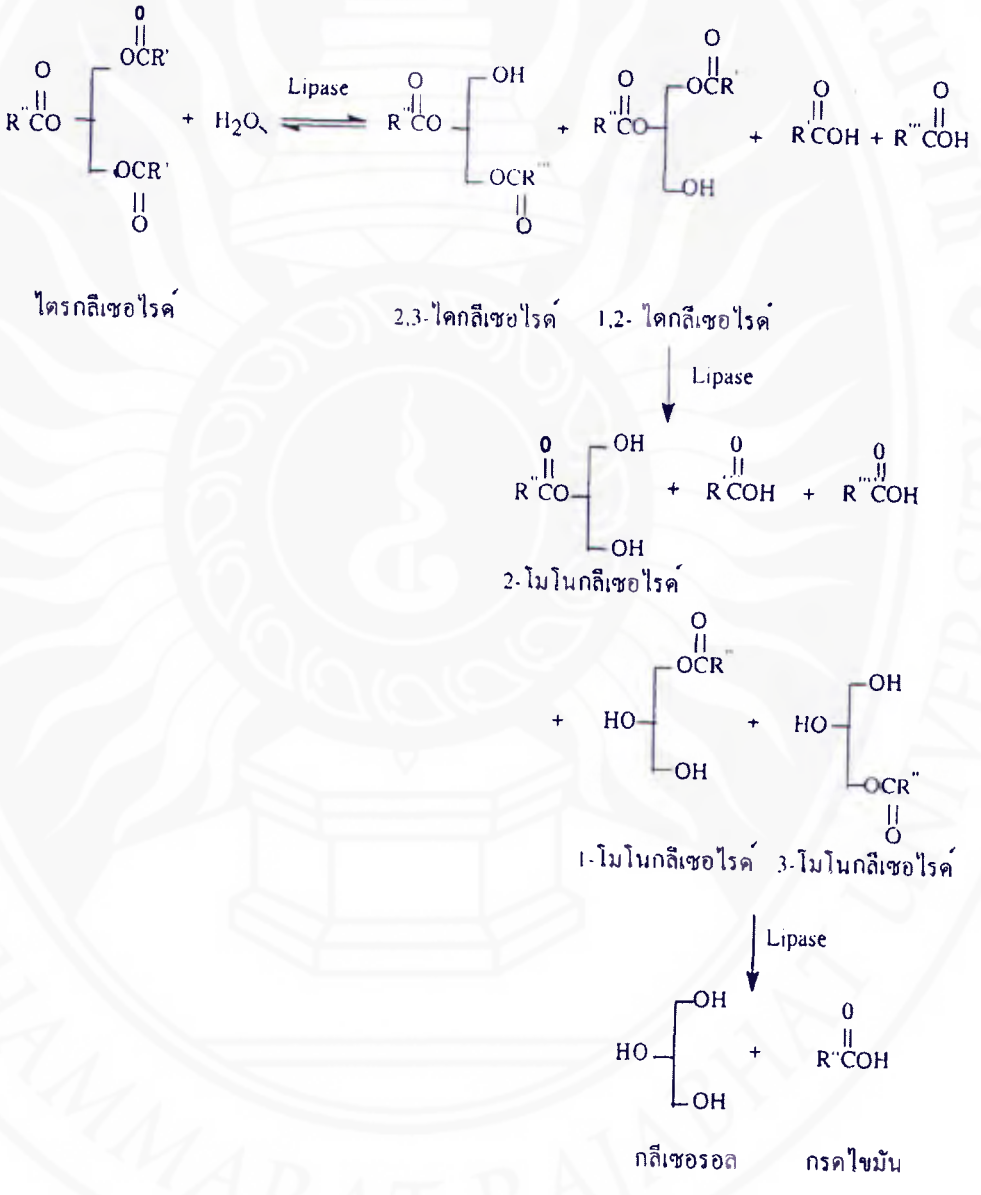
2.2 ความจำเพาะต่อกรดไขมัน (fatty acid specificity) ไลเปสในกลุ่มนี้จะมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันของกรดไขมัน โดยจะสารารถเร่ง ปฏิกิริยาการย่อยสลายกรดไขมันชนิดใดชนิดหนึ่งด้วยอัตราเร็วสูงๆ ซึ่งบางชนิดมีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดสั้น (ต่ำกว่า C8) เช่น ไลเปสจาก *Penicillium cyclopium* บางชนิดมีจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดกลาง (C8-C14) เช่นไลเปสจาก *Aspergillus niger* และ *Rhizopus delemar* และบางชนิดมีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดยาว (ตั้งแต่ C14 เป็นต้นไป) อัตราการย่อยสลายกรดไขมันชนิดต่างๆ ของไลเปสแต่ละชนิดจะแตกต่างกันเช่น ไลเปสจาก *Candida Paralipolytica* สามารถไฮโดรไลซ์ ไตรคาไพรลิน (tricaprylin , C10) ได้เร็วมาก แต่ไฮโดรไลซ์พวกเมทิลบิวทีเรท (methyl butyrate, C4:0), เมทิลคาโพรเอท (methyl caproate, C8:0) และโมโนโอลิอีน (monoolein) ได้ค่อนข้างช้าแสดงว่าไสเปส *C Paralipolytica* นี้มีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดกลางมากกว่าขนาดสั้น และขนาดยาว ส่วนไลเปสจาก *Geotrichum candidum* มีความจำเพาะต่อกรดไขมัน (C18) ที่มีพันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 (cis-9 double bond) แต่ถ้ามีพันธะคู่มากกว่าหนึ่งอัตราการไฮโดรไลซ์จะลดลง จากความจำเพาะของไลเปสที่มีต่อกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ทำให้สามารถนำเอนไซม์ไลเปสไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม เช่น การใช้ไลเปสเพิ่มความเข้มข้นของกรดไขมันไม่อิ่มตัว และใช้ในการสังเคราะห์เอสเทอร์ที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบ

2.3 Enantioselectivity Enantiomers คือสารประกอบสองชนิดที่มีสูตรโครงสร้างเหมือนกัน แต่มีการเรียงตัวของบางโมเลกุลในทิศทางตรงกันข้ามคล้ายการมองภาพในกระจก (มี mirror image ซึ่งกันและกัน) enantiomers มี 2 รูปแบบ คือ R-isomer และ S-isomer การใช้สารรูปที่บริสุทธิ์หรือการใช้เพียงรูปใดรูปหนึ่ง ก่อให้เกิดผลที่มีรวมทั้งเกิดผลข้างเคียงน้อย ตัวอย่างเช่น สาร Ibuprofen ที่มีอยู่ในรูป S-isomer ให้ผลการรักษาที่ดีกว่ารูป R-isomer ดังนั้น จึงจำเป็นที่จะต้องมีการจำแนกสารให้อยู่ในรูปใดรูปหนึ่งซึ่งอาจทำได้หลายวิธี เช่น วิธีการตกตะกอน หรือ โครมาโตกราฟี เป็นต้น เมื่อมีการพบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะต่อสารที่เป็น enantiomers ในรูปแบบใดรูปแบบหนึ่งจึงนำมาใช้แยกสารใช้มีความจำเพาะสูงขึ้น เช่น Mustranta ใช้ไลเปส จาก *C. cyindracea* เร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันระหว่าง Ibuprofen (racemic mixture) กับแอลกอฮอล์ พบว่าสารตั้งต้นที่อยู่ในรูป S-isomer สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tsai และ Wei ซึ่งพบว่าไลเปสจาก Porcine pancreas, *A. niger, M. javanicus* และ *Ps. fluorescens* มีความจำเพาะต่อสารในรูป R-isomer ส่วนไลเปสจาก Wheat germ ไม่มีความจำเพาะต่อทั้งรูป R และ S-isomer เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะชนิดนี้สามารถใช้เร่งได้ทั้งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส, เอสเทอริฟิเคชัน และทรานซ์เอสเทอริฟิเคชัน

3. การทำงานของไลเปส

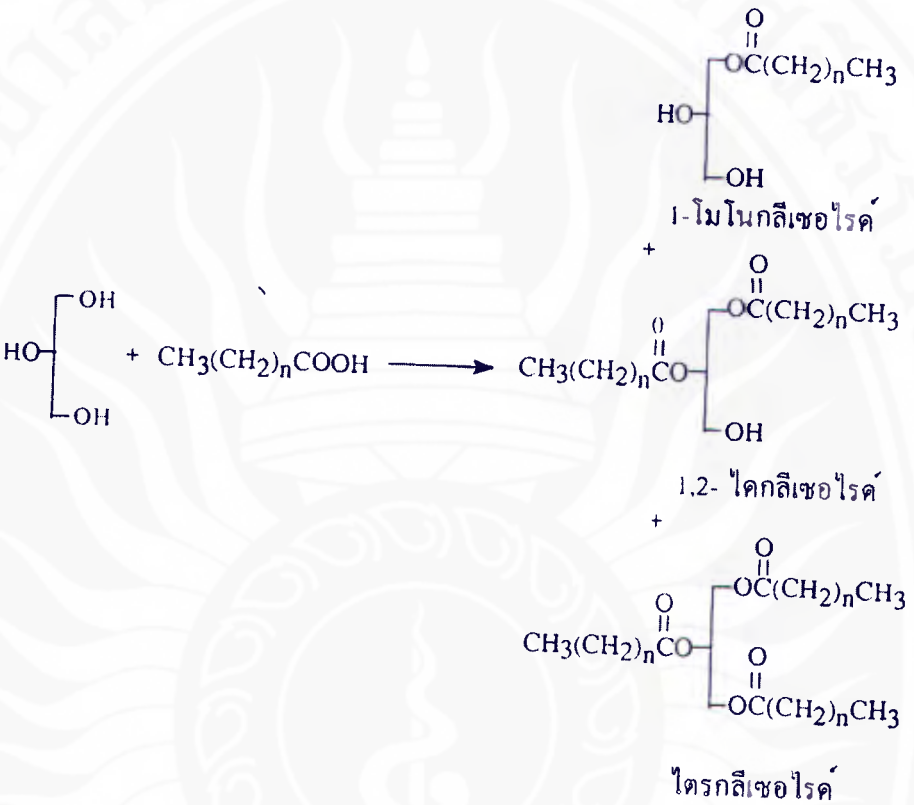
ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 3 ชนิด คือ

3.1 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส (Hydrolysis) ปฏิกิริยานี้ต้องการน้ำในการทำปฏิกิริยาผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์จะได้กลีเซอรอล และกรดไขมัน ดังภาพที่ 2 5



ภาพที่ 2.5 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซีลไตรกลีเซอไรด์

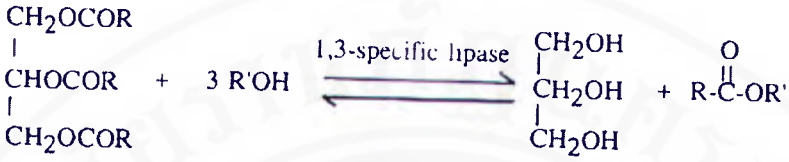
3.2 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (Esterification) เป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส คือการสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างแอลกอฮอล์กับกรดไขมัน ปฏิกิริยานี้ต้องการน้ำน้อยมาก ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้เป็นไตรกลีเซอไรด์ ดังภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน

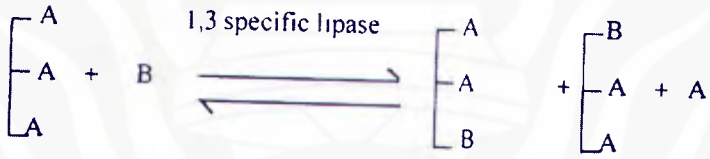
3.3 ปฏิกิริยาทรานซ์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) เป็นปฏิกิริยาสับเปลี่ยนหมู่จากสารชนิดหนึ่งไปยังสารชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นสารเคมีประเภทเดียวกัน เช่น การแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างโมโนเอสเทอร์ หรือ โพลีเอสเทอร์ การแลกเปลี่ยนหมู่ของแอลกอฮอล์ในกรดไขมันเอสเทอร์ ปฏิกิริยาทรานซ์เอสเทอริฟิเคชันยังแบ่งออกเป็นปฏิกิริยาย่อย ๆ ได้อีก 4 ปฏิกิริยา คือ

1) alcoholysis เป็นการแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างไตรกลีเซอไรด์ กับไขมันแอลกอฮอล์ (fatty alcohol) ดังภาพที่ 2.7



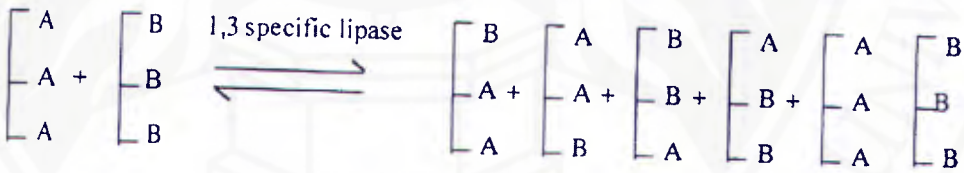
ภาพที่ 2.7 ปฏิกิริยา alcoholysis ระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับไขมันแอลกอฮอล์

2) acidolysis ปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับกรดไขมันอิสระดังภาพที่ 2 8



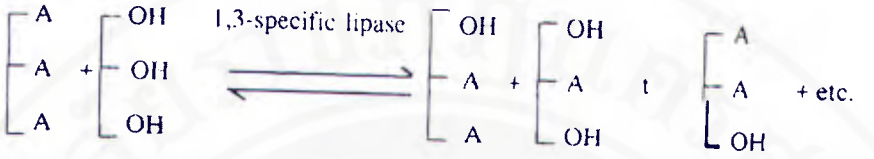
ภาพที่ 2.8 ปฏิกิริยา acidolysis ระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับกรดไขมันอิสระ (A และ B เป็นกรดไขมัน)

3) ester-ester interchange (interesterification) เป็นปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างไตรกลีเซอไรด์ ดังภาพที่ 2 9



ภาพที่ 2.9 ปฏิกิริยา ester-ester interchange (A และ B เป็นกรอไขมัน)

4) glycerolysis เป็นปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับกลีเซอรอล ดังภาพที่ 2.10



ภาพที่ 2.10 ปฏิกิริยา glycerolysis (A และ B เป็นกรดไขมัน)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีงานวิจัยหลายชิ้นพัฒนาวิธีการทางเลือกใหม่เกี่ยวกับการสกัดน้ำมันมะพร้าวให้ได้คุณภาพและปริมาณผลผลิตสูงด้วยวิธีสกัดเย็น เริ่มต้นจาก McGlone และคณะ (1986) พบว่าการสกัดน้ำมันมะพร้าวด้วยเอนไซม์ผสมระหว่างแอลฟา-อะมัยเลส โพลีกาแลคทูโรเนส และเอนไซม์โปรตีเอสในเนื้อมะพร้าวบดเปียกให้ผลผลิตน้ำมันคุณภาพดีสูงถึง 80% ต่อมา Suhardiyono (1992) ประยุกต์ใช้ยีสต์ขนมปังเพื่อเป็นแหล่งของเอนไซม์ในระหว่างการหมักปกติพบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตได้สูงกว่า Che Man และคณะ (1992) ศึกษาผลการเติมกรดอะซีติก (25%) ในปริมาณ 0.1-0.4% พบว่าสามารถเก็บเกี่ยวน้ำมันที่คุณภาพดีได้ 58.3-60.3% ต่อมา Che Man และคณะ (1996) พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตได้ถึง 73.8% เมื่อมีการผสมเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟา-อะมัยเลส โพลีกาแลคทูโรเนส และโปรตีเอสอย่างละ 1% (w/w) ที่ค่าพีเอช 7.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

ต่อมาได้เริ่มมีการพัฒนาการสกัดน้ำมันมะพร้าวด้วยวิธีการหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ ซึ่งจากการศึกษาอย่างต่อเนื่องของ Che Man และคณะ (1997) พบว่าเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ *Lactobacillus plantarum* 1041 IAM ลงไปจำนวน 5% ในระหว่างการหมักอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดได้ผลผลิตสูงถึง 95.06% Handayani และคณะ (2009) ศึกษาวิธีการหมักด้วยการใช้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์จากแหล่งต่างๆ ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย พบว่าการหมักโดยเติมกล้าเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* ลงไปจำนวน 5% ให้ผลผลิตน้ำมันสูงสุด และน้ำมันยังมีคุณสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญหลายชนิด ล่าสุด Marasabessy และคณะ (2010) พัฒนาภูมิปัญญาการใช้เนื้อปูนาบดผสมกับเนื้อมะพร้าวขูดแล้วนำไปหมักสกัดน้ำมันของชาวชวาพบว่าสามารถสกัดน้ำมันออกได้ 54% (w/w) และเมื่อนำเนื้อปูไปแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เพื่อประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มสำหรับการหมักสกัดน้ำมันจากสบู่ดำพบว่าจุลินทรีย์ชนิดที่มีบทบาทสำคัญคือ *Bacillus licheniformis* strain BK23

การทำงานของเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์ จากการค้นพบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยมีโมเลกุลของน้ำเพียงเล็กน้อยที่จับกับโมเลกุลของเอนไซม์ในการรักษาโครงรูปของเอนไซม์ให้สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ (active conformation state) ทำให้มี

การตื่นตัวในด้านงานค้นคว้าและวิจัย เกี่ยวกับการใช้ตัวเร่งทางชีวภาพ ในการเร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ ในตัวทำละลายอินทรีย์มากขึ้น ซึ่งเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ในตัวกลางที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ได้มีหลายชนิด ได้แก่ เอนไซม์ในกลุ่ม Oxidoreductases, Transferases, Hydrolases, Lyases และ Isomerases ทำให้มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่นอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง เภสัชกรรมหรือเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในทางการแพทย์ การใช้เอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์ในสภาพที่มีปริมาณน้ำต่ำมีข้อดีอยู่หลายประการ คือ ช่วยเพิ่มความสามารถในการทำละลายของสับสเตรท หรือผลิตภัณฑ์ที่ไม่ละลายกันน้ำ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมดุลเทอร์โมไดนามิกส์ของปฏิกิริยาไปในทิศทางการสังเคราะห์ซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของไฮโดรไลซีส ลดการยับยั้งปฏิกิริยาโดยสับสเตรทหรือผลิตภัณฑ์ เนื่องจากเอนไซม์ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ จึงสามารถใช้การตรึงเอนไซม์แบบง่าย ๆ เช่น การดูดซับเอนไซม์บนพาหะตรึง ไม่จำเป็นต้องตรึงแบบโควาเลนท์ สามารถป้องกันการปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ การแยกเอนไซม์ทำได้ง่ายช่วยเพิ่ม steroselectivity และ enantioselectivity ของเอนไซม์ ช่วยลดปริมาณฟองในระบบ และเป็นการเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ต่อความร้อนให้ดีขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์อาจมีข้อเสียก็คือตัวทำละลายอินทรีอาจทำให้เอนไซม์เกิดการเสียสภาพธรรมชาติ (denature) หรืออาจเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ระบบมีความซับซ้อนเพิ่มขึ้น และเพิ่มค่าใช้จ่ายสำหรับตัวทำละลายอินทรีย์

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. วัตถุดิบ

มะพร้าว ตัวอย่างมะพร้าวมะพร้าวพันธุ์หนักเปลือกนอกทรงกลม กะลาทรงกลมก้นแป้นเตี้ย ดังภาพที่ 3.1 ที่ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการวิจัยครั้งนี้ได้มาจากพื้นที่อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช

ภาพที่ 3.1 มะพร้าวพันธุ์หนักเปลือกนอกทรงกลม กะลาทรงกลมก้นแป้นเตี้ย

2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมวัตถุดิบ เช่น มีด เครื่องขูดมะพร้าว และเครื่องคั้นกะทิ

2.2 เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น บีกเกอร์ บิวเรต ปิเปต กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (porcelain crucible) ถ้วยอะลูมิเนียมสำหรับหาความชื้นและโถดูดความชื้น

2.3 เครื่องมือ ได้แก่

- ตู้อบ (hot air oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น um500
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (electric balance) ยี่ห้อ Sartorius รุ่น pb-210s
- เครื่องกวนความเร็วสูง
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Hotpack รุ่น 352602
- เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ยี่ห้อ Buchi รุ่น b – 811
- ชุดอุปกรณ์กลั่นแบบรีฟลั๊ก
- เครื่องวัดค่าพีเอช
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ

3. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

-อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar, MRS broth, Nutrient agar (NA) Mueller Hinton broth (MHB), Muller-Hinton agar (MHA), McFarland เบอร์ 0.5, diffusion dimethyl sulfoside (DMSO) และแผ่น Disc ขนาด 6.0 มิลลิเมตร

วิธีการวิจัย

1. วิธีการหมักแยกน้ำมันมะพร้าว

1.1 กรรมวิธีการเตรียมครีม

นำมะพร้าวระยะสุกห้าวขูดเอาเนื้อชั่งน้ำหนัก 2,000 กรัม แล้วผ่านเครื่องบีบคั้นเพื่อเอากะทิสดด้วยเครื่องคั้นน้ำกะทิโดยไม่เติมน้ำด้วยความดัน 40 ปอนด์/ตารางนิ้ว จากนั้นนำมาผสมกับน้ำกรองในอัตราส่วนน้ำกะทิต่อน้ำประมาณ 1:1 โดยน้ำหนัก เพื่อให้ได้น้ำหนักกะทิสุดท้าย 2,000 กรัม ปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องกวนความเร็วสูง 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วบรรจุใส่ในถุงพลาสติกใส ใช้ยางผูกรัดปิดปากถุงให้แน่นโดยไม่มีช่องว่างอากาศ วางทิ้งไว้ในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแยกชั้นของน้ำและครีม จากนั้นใช้เข็มเจาะก้นถุงเพื่อแยกน้ำใสทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นครีมเพื่อใช้สำหรับการสกัดน้ำมัน ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ 3.2

ก. การขูดและคั้นน้ำกะทิ

ข. กวน 1,500 รอบต่อนาที

ค. แช่เย็น 4 องศาเซลเซียส

ง. แยกครีม

ภาพที่ 3.2 กรรมวิธีการเตรียมครีม

1.2 วิธีการเตรียมเอนไซม์

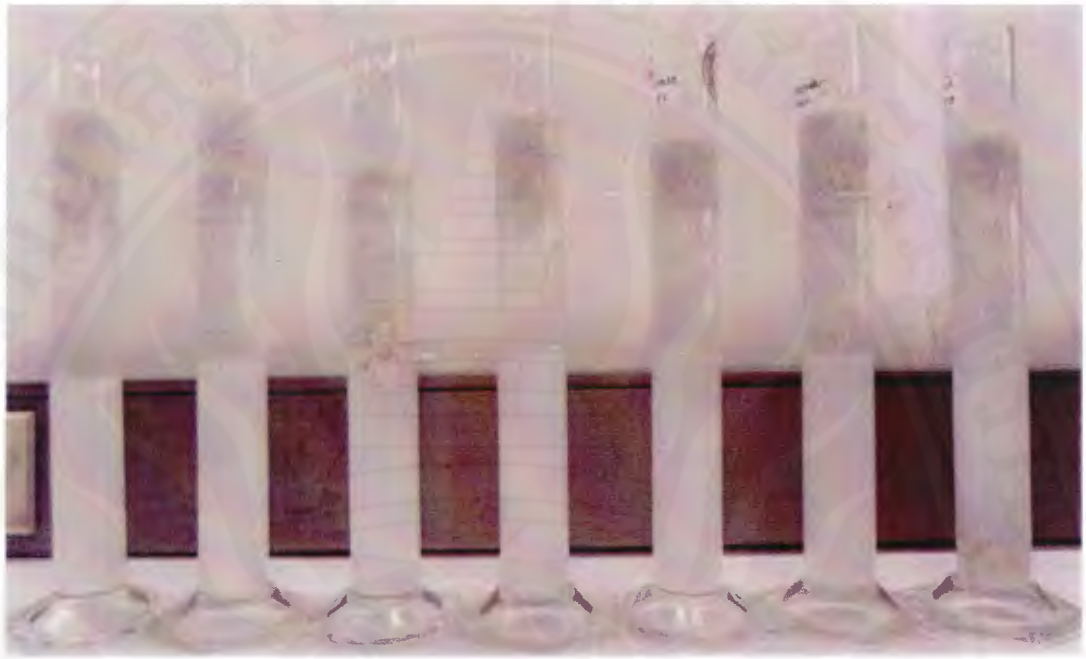
นำเอนไซม์ไลเปสทางการค้าชนิดผงที่มีความจำเพาะต่อโครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ต่างกันซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท Amano Enzyme ประเทศญี่ปุ่นจำนวน 6 ชนิด คือ เอนไซม์ไลเปส AY, M, F-AP15, PS, D และ Pancreatic lipase ละลายในสารละลาย 1.0 M phosphate buffer pH 6.5 ระดับความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการทดลองต่อไป

1.3 วิธีการทดลองการปรับปรุงโครงสร้างน้ำมันด้วยเอนไซม์

1.3.1 การศึกษาผลของชนิดเอนไซม์ไลเปส

ชั่งครีมที่เตรียมในข้อ 1.1 จำนวน 1.0 กิโลกรัม มาใส่ในขวดโหลแก้วใส ขนาด 2.0 ลิตร ซึ่งมีระดับความสูงของตัวอย่างไม่เกิน ¾ ของความสูงภาชนะ จำนวน 7 ทรีทเม้นต์ ๆ ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ขวดโหล นำไปแช่อ่างน้ำอุ่นปรับอุณหภูมิให้ได้ประมาณ 30 องศาเซลเซียส แล้วเติมเอนไซม์ไลเปสแต่ละชนิด คือ ชุดควบคุมไม่เติมเอนไซม์ ไลเปส AY, M, F-AP15, PS, D และ Pancreatic lipase ลงไป 10 มิลลิลิตร กวนผสมเพื่อให้เอนไซม์เร่งการทำปฏิกิริยาความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศ (30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที ดังภาพที่ 3.3 แยกตัวอย่างมาทรีทเม้นต์ละ 1 ขวดโหล แบ่งบรรจุใส่กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 กระบอก จากนั้นนำไปหมักแยกน้ำมันในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแยกชั้นน้ำมันที่สมบูรณ์ อ่านค่าปริมาณผลผลิตน้ำมันเทียบกับครีม (% VCO yield from coconut cream) จากสเกลของกระบอกตวง ดังภาพที่ 3.4 ตักน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นออกและกรองแยกด้วยกระดาษทิชชู บรรจุในขวดพลาสติกใส ไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน ปิดฝา ดังภาพที่ 3.5 เพื่อใช้สำหรับวัดค่า %FFA และค่ากรด ทดสอบคุณสมบัติฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์

ภาพที่ 3.3 กวนผสมเพื่อเร่งการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์



ภาพที่ 3.4 การอ่านค่าปริมาณผลผลิตน้ำมันเทียบกับครีมจากสเกลของกระบอกตวง

ก. รูปแบบการบ่มควบคุมอุณหภูมิ

ข. ลักษณะการแยกชั้น

ค. การตักกรองแยกน้ำมัน

ภาพที่ 3.5 วิธีการหมักครีมเพื่อสกัดน้ำมันมะพร้าว

1.3.2 การศึกษาผลของกลีเซอรอลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสแต่ละชนิด

ชั่งครีมที่เตรียมในข้อ 1.1 จำนวน 1.0 กิโลกรัม มาใส่ในขวดโหลแก้วใส ขนาด 2.0 ลิตร ซึ่งมีระดับความสูงของตัวอย่างไม่เกิน ¾ ของความสูงภาชนะ จำนวน 7 ทรีทเม้นต์ ๆ ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ขวดโหล นำไปแช่อ่างน้ำอุ่นปรับอุณหภูมิให้ได้ประมาณ 30 องศาเซลเซียส เติมกลีเซอรอลลงไปขวดโหลละ 50 กรัม และเติมเอนไซม์ไลเปสแต่ละชนิด คือ ชุดควบคุมไม่เติมเอนไซม์ ที่เหลือเติม AY, M, F-AP15, PS, D และ Pancreatic lipase ลงไป 10 มิลลิลิตร กวนผสมเพื่อให้เอนไซม์เร่งการทำปฏิกิริยาความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศ (30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที ดังภาพที่ 3.2 แยกตัวอย่างมาทรีทเม้นต์ละ 1 ขวดโหล แบ่งบรรจุใส่กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 กระบอก จากนั้นนำไปหมักแยกน้ำมันในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแยกชั้นน้ำมันที่สมบูรณ์ อ่านค่าปริมาณผลผลิตน้ำมันจากครีม (% VCO yield from coconut cream) จากสเกลของกระบอกตวง ดังภาพที่ 3 3 ตักน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นออกและกรองแยกด้วยกระดาษทิชชู บรรจุในขวดพลาสติกใส ไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน ปิดฝา ดังภาพที่ 3.5 เพื่อใช้สำหรับวัดค่า %FFA และค่ากรด ทดสอบคุณสมบัติฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์

ผลผลิตน้ำมัน = {VCO(g)/น้ำหนักครีมเริ่มต้น(g)} x 100
(VCO yield from coconut cream)

เปอร์เซ็นต์การเก็บเกี่ยวน้ำมัน = {ผลผลิตน้ำมันที่สกัดได้ (%)/ปริมาณน้ำมันในครีม* (%)} x 100
(% oil recovery from coconut cream)

*วิธีวิเคราะห์แบบ proximate analysis ด้วยชุดสกัด Soxhlet asparatus โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นสารสกัด ตามวิธี AOAC. (2000)

1.3.3 การศึกษาปริมาณของกลีเซอรอลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส D

ชั่งครีมที่เตรียมในข้อ 1.1 จำนวน 900, 925, 950, 975 และ 1,000 กรัม มาใส่ในขวดโหลแก้วใสขนาด 2.0 ลิตร ซึ่งมีระดับความสูงของตัวอย่างไม่เกิน ¾ ของความสูงภาชนะ จำนวน 6 ทรีทเม้นต์ ๆ ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ขวดโหล นำไปแช่อ่างน้ำอุ่นปรับอุณหภูมิให้ได้ประมาณ 30 องศาเซลเซียส เติมกลีเซอรอลลงไปขวดโหลละ 100, 75, 50, 25 และ 0 กรัม ตามลำดับ จากนั้นเติมเอนไซม์ไลเปส D ลงไป 10 มิลลิลิตร ชุดควบคุมไม่เติมเอนไซม์ กวนผสมเพื่อให้เอนไซม์เร่งการทำปฏิกิริยาความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศ (30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที ดังภาพที่ 3.2 แยกตัวอย่างมาทรีทเม้นต์ละ 1 ขวดโหล แบ่งบรรจุใส่กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 กระบอก จากนั้นนำไปหมักแยกน้ำมันในตู้บ่มที่

อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแยกชั้นน้ำมันที่สมบูรณ์ อ่านค่าปริมาณผลผลิตน้ำมันจากครีม (% VCO yield from coconut cream) จากสเกลของกระบอกตวง ดังภาพที่ 3.3 ตักน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นออกและกรองแยกด้วยกระดาษทิชชู บรรจุในขวดพลาสติกใส ไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน ปิดฝา ดังภาพที่ 3.5 เพื่อใช้สำหรับวัดค่า %FFA และค่ากรด ทดสอบคุณสมบัติฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์

1.3.4 การศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส D

ชั่งครีมที่เตรียมในข้อ 1.1 จำนวน 975 กรัม มาใส่ในขวดโหลแก้วใส ขนาด 2.0 ลิตร ซึ่งมีระดับความสูงของตัวอย่างไม่เกิน ¾ ของความสูงภาชนะ จำนวน 6 ทรีทเม้นต์ ๆ ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ขวดโหล นำไปแช่อ่างน้ำอุ่นปรับอุณหภูมิให้ได้ประมาณ 30 องศาเซลเซียส เติมกลีเซอรอลลงไปขวดโหลละ 25 กรัม และเติมเอนไซม์ไลเปส D ที่เตรียมในสารละลาย 1.0 M phosphate buffer พีเอชแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ พีเอช 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรลงไป 10 มิลลิลิตร สำหรับชุดควบคุมไม่เติมเอนไซม์ กวนผสมเพื่อให้เอนไซม์เร่งการทำปฏิกิริยาความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศ (30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที ดังภาพที่ 3.2 แยกตัวอย่างมาทรีทเม้นต์ละ 1 ขวดโหล แบ่งบรรจุใส่กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 กระบอก จากนั้นนำไปหมักแยกน้ำมันในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแยกชั้นน้ำมันที่สมบูรณ์ อ่านค่าปริมาณผลผลิตน้ำมันเทียบกับครีม (% VCO yield from coconut cream) จากสเกลของกระบอกตวง ดังภาพที่ 3.3 ตักน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นออกและกรองแยกด้วยกระดาษทิชชู บรรจุในขวดพลาสติกใส ไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน ปิดฝา ดังภาพที่ 3.5 เพื่อใช้สำหรับวัดค่า %FFA และค่ากรด ทดสอบคุณสมบัติฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์

1.3.5 การศึกษาผลของการควบคุมอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ชั่งครีมที่เตรียมในข้อ 1.1 จำนวน 975 กรัม มาใส่ในขวดโหลแก้วใสขนาด 2.0 ลิตร ซึ่งมีระดับความสูงของตัวอย่างไม่เกิน ¾ ของความสูงภาชนะ จำนวน 5 ทรีทเม้นต์ ๆ ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ขวดโหล นำไปแช่อ่างน้ำอุ่นปรับอุณหภูมิให้ได้ประมาณ 30 องศาเซลเซียส เติมกลีเซอรอลลงไปขวดโหลละ 25 กรัม และเติมเอนไซม์ไลเปส D ที่เตรียมในสารละลาย 1.0 M phosphate buffer พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรลงไป 10 มิลลิลิตร สำหรับชุดควบคุมไม่เติมเอนไซม์ กวนผสมเพื่อให้เอนไซม์เร่งการทำปฏิกิริยาความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกตัวอย่าง

มาทรีทเม้นต์ละ 1 ขวดโหล แบ่งบรรจุใส่กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 กระบอก จากนั้นนำไปหมักแยกน้ำมันในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแยกชั้นน้ำมันที่สมบูรณ์ อ่านค่าปริมาณผลผลิตน้ำมันเทียบกับ จากสเกลของกระบอกตวง ตักน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นออกและกรองแยกด้วยกระดาษทิชชู บรรจุในขวดพลาสติกใส ไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน ปิดฝา เพื่อใช้สำหรับวัดค่า %FFA และค่ากรด ทดสอบคุณสมบัติฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์

1.3.6 การศึกษาผลความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส

ชั่งครีมที่เตรียมในข้อ 1 1 จำนวน 975 กรัม มาใส่ในขวดโหลแก้วใสขนาด 2.0 ลิตร ซึ่งมีระดับความสูงของตัวอย่างไม่เกิน ¾ ของความสูงภาชนะ จำนวน 6 ทรีทเม้นต์ ๆ ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ขวดโหล นำไปแช่อ่างน้ำอุ่นปรับอุณหภูมิให้ได้ประมาณ 30 องศาเซลเซียส เติมกลีเซอรอลลงไปขวดโหลละ 25 กรัม และเติมเอนไซม์ไลเปส D ที่เตรียมในสารละลาย 1.0 M phosphate buffer พีเอช 6.0 ความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 5, 10, 15, 20 และ 25 กรัมต่อลิตรลงไป 10 มิลลิลิตร สำหรับชุดควบคุมไม่เติมเอนไซม์ กวนผสมเพื่อให้เอนไซม์เร่งการทำปฏิกิริยาความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกตัวอย่างมาทรีทเม้นต์ละ 1 ขวดโหล แบ่งบรรจุใส่กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 กระบอก จากนั้นนำไปหมักแยกน้ำมันในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแยกชั้นน้ำมันที่สมบูรณ์ อ่านค่าปริมาณผลผลิตน้ำมันเทียบกับ จากสเกลของกระบอกตวง ตักน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นออกและกรองแยกด้วยกระดาษทิชชู บรรจุในขวดพลาสติกใส ไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน ปิดฝา เพื่อใช้สำหรับวัดค่า %FFA และค่ากรด ทดสอบคุณสมบัติฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์

1.3.7 การศึกษาผลระยะเวลาการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส

ชั่งครีมที่เตรียมในข้อ 1.1 จำนวน 975 กรัม มาใส่ในขวดโหลแก้วใสขนาด 2.0 ลิตร ซึ่งมีระดับความสูงของตัวอย่างไม่เกิน ¾ ของความสูงภาชนะ จำนวน 6 ทรีทเม้นต์ ๆ ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ขวดโหล นำไปแช่อ่างน้ำอุ่นปรับอุณหภูมิให้ได้ประมาณ 30 องศาเซลเซียส เติมกลีเซอรอลลงไปขวดโหลละ 25 กรัม และเติมเอนไซม์ไลเปส D ที่เตรียมในสารละลาย 1.0 M phosphate buffer พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรลงไป 10 มิลลิลิตร สำหรับชุดควบคุมไม่เติมเอนไซม์ กวนผสมเพื่อให้เอนไซม์เร่งการทำปฏิกิริยาความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที แยกตัว

อย่างมาทรีทเม้นต์ละ 1 ขวดโหล แบ่งบรรจุใส่กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 กระบอก จากนั้นนำไปหมักแยกน้ำมันในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแยกชั้นน้ำมันที่สมบูรณ์ อ่านค่าปริมาณผลผลิตน้ำมันเทียบกับ จากสเกลของกระบอกตวง ตักน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นออกและกรองแยกด้วยกระดาษทิชชู บรรจุในขวดพลาสติกใส ไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน ปิดฝา เพื่อใช้สำหรับวัดค่า %FFA และค่ากรด ทดสอบคุณสมบัติฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์

1) การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันมะพร้าวเปรียบเทียบกับวิตามินซี และ butylated hydroxyanisole (BHA) โดยการวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของน้ำมันมะพร้าวในรูป DPPH radical scavenging assay กิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระเป็นกิจกรรมในการกำจัด hydrogen radicals โดย DPPH (1,1-diphenyl-2-picrydrazyl) ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่ให้สีม่วงเมื่อละลายในเอทธิลแอลกอฮอล์ จึงสามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร เมื่อ DPPH รับอิเล็กตรอนหรือ hydrogen radicals สีม่วงจะจางลง แสดงว่าน้ำมันมะพร้าวสมุนไพรสกัดเย็นมีสารประกอบที่สามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยไปกำจัดอนุมูลอิสระ

วิธีการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดัดแปลงตามวิธีของ Maria, *et al.* (2009, 114-123); ปิยาภัทร ไตรสนธิ (2550); Agbor, *et al.* (2006, 659-663) และ Chang, *et al.* (2001, 3420-3424) โดยชั่งตัวอย่างน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น 1 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตร เติมเอทธิลแอลกอฮอล์ 99% ลงไปปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ใช้อัตราการเจือจางระหว่างสารสกัดน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นกับเอทธิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 1 : 10 และเจือจางอีกเป็น 1 : 50 และเจือจางอีกเป็น 1 : 100 นำไปสกัดที่มืด เป็นเวลา 30 นาที นำสารสกัดมาทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยแบ่งชุดการทดสอบเป็น 4 ชุด ดังนี้

ชุด A (test sample) = 1.1 ml ของ sample ทั้งหมด + 1 ml ของ DPPH 150 ไมโครโมล

ชุด B (sample blank) = 1.1 ml ของ sample ทั้งหมด + 1 ml ของ absolute ethanol

ชุด C (control) = 1.1 ml ของ absolute ethanol + 1 ml ของ DPPH 150 ไมโครโมล

ชุด D (standard) = 1.1 ml ของ standard ทั้งหมด + 1 ml ของ DPPH 150 ไมโครโมล

ปั่นผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโตสโกปี (UV/VIS) ยี่ห้อ perkin รุ่น lambda 12 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลายแอสคอร์บิก (วิตามินซี) และ BHA เป็นสารละลายมาตรฐาน (วิตามินซีความเข้มข้น 0, 0.006, 0.0125, 0.025 และ 0.05 ไมโคร

โมล และ BHA ความเข้มข้น 0, 0.13, 0 025, 0 05 และ 0.1 ไมโครโมล) คำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%radical scavenging activity) และค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถออกฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เพื่อเปรียบเทียบกับวิตามินซี และ BHA

1. 1) การคำนวณค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%radical scavenging activity) ของน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น จากสูตร

ร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%radical scavenging activity) $= \frac{1 - (Abs_{sample} - Abs_{sample\ blank})}{Abs_{control}} \times 100$

1.2) คำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นที่สามารถออกฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ได้จากการทำ calibration curve ระหว่าง %radical scavenging activity กับระดับความเข้มข้นของสารสกัดน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น

2) ทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพ

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* โดยได้ความอนุเคราะห์จากหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช นำเชื้อที่ทดสอบมาทำการเขี่ยลากบนอาหาร Nutrient Agar (NA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อลงในอาหาร Mueller Hinton Broth (MHB) บ่มที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง นำมาทำการปรับความเข้มข้นเท่ากับ McFarland เบอร์ 0.5 ด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ซึ่งมีค่าเทียบกับจำนวนเชื้อประมาณ 10^6 CFU/ml

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันมะพร้าวด้วยวิธี Disc diffusion ดัดแปลงจาก Tangwatcharin and Khopaibool (2012, 969-985) และ Bannasan, *et al.* (2011, 373-376) ทำได้โดยเตรียมน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างที่เจือจางด้วย dimethyl sulfoside (DMSO) เข้มข้น 100% ให้มีระดับความเข้มข้นลดลงลำดับส่วนครึ่งละ 2 เท่า เริ่มต้นจากความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.50, 6.25, 3.12 และ 1.56% ตามลำดับ นำไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มเชื้อที่เตรียมไว้ แล้วนำมาป้ายลงบน Muller-Hinton Agar (MHA) ให้ทั่ว จากนั้นทำการวางดิสก์ที่หยดน้ำมันมะพร้าวสมุนไพรสกัดเย็นแต่ละระดับเจือจาง ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อดิสก์ วางดิสก์บรรจุ DMSO และน้ำมันดอกทานตะวันเป็น negative control และวางดิสก์ที่บรรจุสารละลายฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 15 และ 20% ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อดิสก์ เช่นเดียวกัน เป็น positive control นำจานเพาะเชื้อไป

บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้ววัดขนาด วงแหวนการยับยั้ง (Inhibition zone) รายงานในรูปค่าสัมประสิทธิ์ของวงแหวนการยับยั้งเทียบเท่ากับสารฟีนอล (%phenol equivalent)

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของผลิตภัณฑ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (minimum inhibitory concentration; MIC) ทำการทดสอบความสามารถของน้ำมันมะพร้าวในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ด้วยเทคนิค broth dilution techniques ทดสอบการเจริญในอาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) ด้วยวิธี serial dilution test ครั้งละ 2 เท่า เตรียมด้วยการเจือจางน้ำมันมะพร้าวกับ DMSO ให้มีความเข้มข้น 50, 25, 12.50, 6.25, 3.12 และ 0% ตามลำดับ จากนั้นเติมลงในอาหาร MHB ที่เตรียมระดับความเข้มข้น 2 เท่า จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันมะพร้าวในอาหารเหลวเป็น 25, 12.50, 6.25, 3.12, 1.56 และ 0% ตามลำดับ จากนั้นเติมเชื้อทดสอบลงไป 10 ไมโครลิตร (จากการปรับความเข้มข้นเท่ากับ McFarland เบอร์ 0.5 ซึ่งเทียบกับจำนวนเชื้อประมาณ 10^6 CFU/ml) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Abs) ที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้ MHB เป็น blank ปรับ 0 หาค่า MIC ได้จากระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดค่า Abs ได้ต่ำกว่า 0.05

6. การเปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษา

ศึกษาผลของการกำจัดความชื้นต่อคุณภาพในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างโดยนำผลิตภัณฑ์มาผ่านวิธีการกำจัดความชื้นด้วยวิธีการอังในอ่างน้ำร้อน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นบรรจุขวดแก้วสีเขียว ไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน ปิดด้วยฝาเกลียว แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 เดือน เพื่อเก็บตัวอย่างมาทดสอบการเปลี่ยนแปลงโดยใช้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ไม่ผ่านขั้นตอนการเก็บรักษาเป็นชุดควบคุม โดยทดสอบดังนี้คือ

นำตัวอย่างน้ำมันมะพร้าวไปวัดค่า moisture and volatile matter (%MC) ด้วยวิธี ISO 622: 1998 วัดค่า saponification value (SN) ด้วยวิธี IUPAC 2.202 วัด free fatty acid (%FFA) และ acid value (AV) ด้วยวิธี ISO 660: 1996 วัดค่า peroxide value (PV) ด้วยวิธี IUPAC 2.501 เพื่อเปรียบกับค่ามาตรฐานของผลิตภัณฑ์ Anisidine value (AnV) ด้วยวิธี AOCS methods, Cd 18-90 และคำนวณหาค่าการเกิดออกซิเดชันทั้งหมดหรือ Totox จากสูตร Totox = AnV + (2PV)

7. การผลิตเจลโลชั่นแต้มสิวจากน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้าง

นำน้ำมันมะพร้าวสที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างข้างต้นมาทดลองผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิว จำนวน 4 สูตร ดังแสดงในตารางที่ 3.1 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทดสอบลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ค่าพีเอช ความใส ฟองอากาศ ความเหนอะหนะเมื่อทา ความ

เนียน และความข้นหนืด รวมทั้งคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อ เป็นต้น และทำการสำรวจความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์ โดยให้อาสาสมัครทั้งหมด 10 คนทดสอบผลิตภัณฑ์ดังกล่าวแล้วตอบแบบสอบถามในการประเมิน ดังแสดงในภาคผนวก

ตารางที่ 3.1 สูตรการเตรียมผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิวจากน้ำมันมะพร้าว

Phase	ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์)			
		MO	MOS	VCO	VCOS
A	สารป้องกันการระคายเคือง คือ Allontoin	0.2	0.2	0.2	0.2
	น้ำสะอาด	43	43	43	43
	สารเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิวหนัง คือ				
	- Raffinose	1.5	1.5	1.5	1.5
	- Bentain	1	1	1	1
B	สารก่อเจล คือ Ammonium Acyloydimethltaurate	0.5	0.5	0.5	0.5
C	สารประสานน้ำกับน้ำมัน คือ Polysorbate 20	25	25	25	25
	น้ำมันตัวอย่าง	27	25	27	25
D	Propylene glycol	1	1	1	1
	สารเคมียับยั้งสิว คือ Salicylic acid	0	2	0	2
E	สารแต่งกลิ่น	0.5	0.5	0.5	0.5
	สารกันเสีย คือ DMDM Hydration	0.3	0.3	0.3	0.3

หมายเหตุ: MO คือ สูตรใช้น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างอย่างเดียว

MOS คือ สูตรใช้น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างร่วมกับ Salicylic acid

VCO คือ สูตรใช้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์อย่างเดียว

VCOS คือ สูตรใช้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ร่วมกับ Salicylic acid

ขั้นตอนการผลิต

1. ชั่งส่วน A ผสมใส่ในเหยือกสแตนเลส นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ยกลงจากเตาให้ความร้อน รอให้อุณหภูมิเย็นไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส

2. เติมส่วน B ลงในส่วน A แล้วกวนให้เข้ากัน

3. ผสมส่วน D ให้ละลายเข้ากันในภาชนะ และผสมส่วน C ให้ละลายเข้ากันในภาชนะ จากนั้นนำส่วนผสมส่วน C เทลงในส่วนผสม D แล้วกวนให้เข้ากัน

4. นำส่วนผสม C และ D ที่ผสมเข้ากันเรียบร้อยแล้วใส่ลงในส่วน A และ B ที่ผสมกันเรียบร้อยแล้ว กวนสวนผสมทั้งหมดให้เป็นเนื้อเดียวกัน

5. เติมส่วน E แล้วกวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน

6. แบ่งบรรจุใส่หลอดที่ปลอดเชื้อ

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลผลิตที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการสกัดน้ำมันมะพร้าว

ผลการศึกษาปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้นตลอดขั้นตอนการสกัดน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นด้วยวิธีการหมัก พบว่า การนำมะพร้าวทั้งเปลือกมาปอกเปลือกออกจะได้ผลมะพร้าวโดยเฉลี่ยประมาณ 60% ของน้ำหนักผล และส่วนของเปลือกประมาณ 40% โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือที่เหมาะสำหรับการนำไปย่อยให้เล็กลงแล้วใช้เป็นส่วนผสมสำหรับการปรับสภาพดิน หรือวัสดุปลูก

จากนั้นเมื่อนำผลมะพร้าวไปผ่าเอาน้ำมะพร้าวออกพบว่าจะได้น้ำมะพร้าวสดประมาณ 400-500 มิลลิลิตรต่อผล ส่วนของน้ำมะพร้าวที่ได้ดังกล่าวนี้อุดมไปด้วยแร่ธาตุหลายชนิด เช่น โพแทสเซียม เหล็ก โซเดียม แคลเซียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส ทองแดง กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ และวิตามินบี มีน้ำตาลกลูโคส และฮอร์โมนพืชที่สำคัญ ปัจจุบันจึงมีการนำไปใช้ประโยชน์ที่หลากหลาย เช่น การแปรรูปเป็นเครื่องดื่มเกลือแร่ธรรมชาติ การผลิตวุ้นสวรรค์ และการหมักน้ำส้มสายชู เป็นต้น

เมื่อนำมะพร้าวผ่าซีกไปขูดเอาเฉพาะเนื้อมะพร้าวจะได้ผลผลิตเนื้อมะพร้าวประมาณ 70% โดยน้ำหนักของมะพร้าวผ่าซีก ที่เหลืออีกประมาณ 30% เป็นส่วนของกะลามะพร้าว กะลามะพร้าวแห้งจะประกอบไปด้วย เซลลูโลส ลิกนิน แพนโตแซน และเถ้า ซึ่งเหมาะสำหรับใช้ทำเชื้อเพลิง หรือทำเครื่องใช้ในครัวเรือน เช่น กระบวยตักน้ำ ทัพพี ถ้วย และชาม เป็นต้น ต่อมาประดิษฐ์เป็นเครื่องตกแต่งบ้าน เช่น โคมไฟ และตะเกียงเจ้าพายุ เป็นต้น เครื่องประดับ เครื่องแต่งกายสุภาพสตรี เช่น กระเป๋าถือ เข็มขัด ปิ่นปักผม และสร้อย เป็นต้น

และเมื่อนำเนื้อมะพร้าวขูดไปบีบคั้นเอาน้ำกะทิ พบว่า จะได้น้ำกะทิสดประมาณ 75% โดยน้ำหนักของเนื้อมะพร้าวขูด จากนั้นเมื่อนำน้ำกะทิไปแช่เย็นเพื่อแยกเอาเฉพาะครีมพบว่าจะได้ครีมน้ำหนักประมาณ 75% โดยน้ำหนัก ซึ่งส่วนของครีมนี่เองที่จะนำไปใช้สำหรับการหมักเพื่อผลิตน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น ซึ่งพบว่าจะให้ผลิตน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นหลังการหมักไม่ต่ำกว่า 30% โดยน้ำหนักหมัก แสดงในรูปแผนภูมิการผลิตดังภาพที่ 4.1

ภาพที่ 4.1 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของผลผลิตต่างๆ ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการสกัดน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์

ผลของแหล่งหรือชนิดของเอนไซม์ไลเปส

ผลการสำรวจเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ ทางการค้าที่มีความจำเพาะต่อโครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ต่างกัน ผู้วิจัยสามารถจัดหาได้ 6 ชนิด จากบริษัท Amano ประเทศญี่ปุ่น คือ เอนไซม์ไลเปส AY, M, F-AP15, PS, D และ Pancreatic lipase จากนั้นนำมาเตรียมละลายในสารละลาย 1.0 M phosphate buffer pH 6.5 ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ จากนั้นนำส่วนที่เป็นครีม 1 กิโลกรัม มาใส่ในขวดโหลแก้วใสขนาด 2.0 ลิตร โดยใส่ระดับความสูงไม่เกิน ¾ องความสูงภาชนะ แล้วเติมเอนไซม์ไลเปสแต่ละแหล่งลงไป 10 มิลลิลิตร คนผสมกันเพื่อให้เอนไซม์เร่งการทำปฏิกิริยาที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำไปหมักในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแยกชั้นน้ำมันที่สมบูรณ์ จากนั้นตักน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นออกและกรองแยกด้วยกระดาษทิชชู บรรจุในขวดพลาสติกใส ไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน ปิดฝา ดังแสดงในภาพที่ 4.2 ชั่งน้ำหนักของน้ำมันที่ได้ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณผลผลิตเทียบกับครีม (% VCO yield from coconut cream) วัดค่า %FFA และ ค่ากรด และทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ได้ผลการทดลองพอสังเขปดังนี้

1. ปริมาณผลผลิต

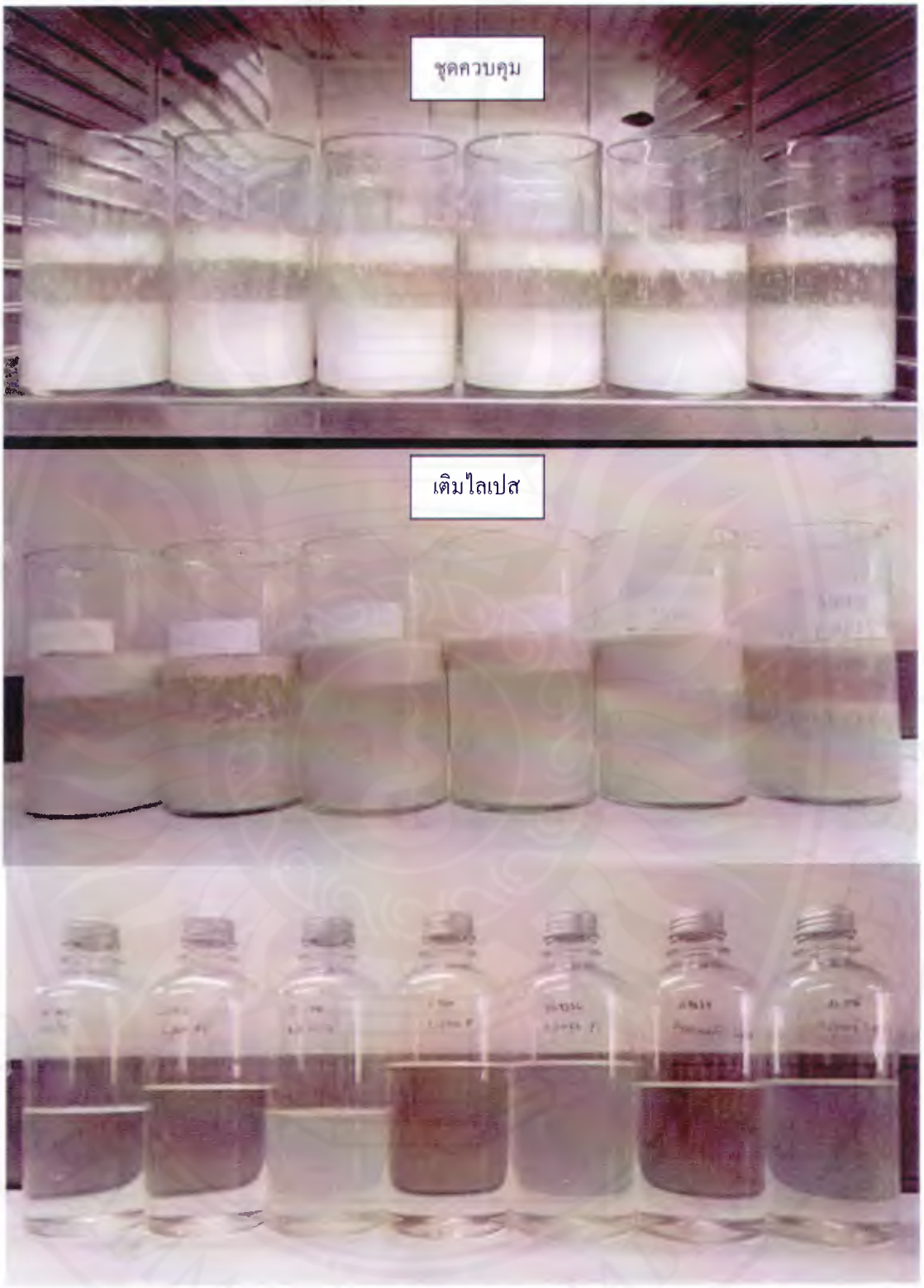
ผลการทดลอง พบว่า ผลการใช้เอนไซม์ไลเปสทั้ง 6 ชนิด ยังคงทำให้เกิดการแยกชั้นของน้ำมันหลังผ่านกระบวนการหมัก แต่ผลผลิตของน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นและน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างที่สกัดได้มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ผลการเติมเอนไซม์ไลเปส D และ F-AP15 เป็นตัวเร่งการดัดแปลงโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันก่อนหมักแยกให้ปริมาณผลผลิตชั้นของน้ำมันสูงสุดแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติคือ 36.2-36.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลการใช้ไลเปสชนิดอื่น ๆ จะให้ปริมาณผลผลิตที่ต่ำกว่า แต่อย่างไรก็ตามยังคงได้ผลผลิตน้ำมันที่สูงกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ คืออยู่ในช่วง 31.5-32.5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การหมักแยกแบบปกติโดยไม่มีการดัดแปลงโครงสร้างก่อนให้ผลผลิต 35.3 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 นอกจากนี้ยังพบว่า ผลิตภัณฑ์น้ำมันที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปสก่อนการหมักแยกมีลักษณะสีขาวนวล มีกลิ่นฉุน และมีความหนืดที่สูงกว่า (ดังแสดงในภาพที่ 4.2) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมผลิตภัณฑ์น้ำมันจะใสไม่มีสี มีกลิ่นหอมมะพร้าว และไม่หนืด

จากรายงานวิจัยของ Che Man และคณะ (1997, 1115-1119) ทดลองหมักใช้เชื้อ *Lactobacillus plantarum* 1041 IAM จากนั้น Handayani และคณะ (2009, 151-157) ทดลองใช้เชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* ต่อมา Marasabessy และคณะ (2010, 1141-1148) ทดลองใช้เชื้อ *Bacillus*

licheniformis strain BK23 และฉัตรชัย สังข์ผุด (2557, 26-38) ทดลองใช้เชื้อ *Lactobacillus plantarum* ในรูปเชื้อบริสุทธิ์ พบว่า แบคทีเรียแลกติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการหมักสกัดน้ำมันมะพร้าว เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมัน ทำให้สามารถทำลายคุณสมบัติการเป็นอิมัลชันของน้ำกะทิไม่ให้มีความคงตัว จึงทำให้เกิดการแยกชั้นของน้ำมันอยู่ด้านบน สำหรับโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและน้ำจะอยู่ชั้นล่าง (Soeka *et al*, 2008, 91-95; Rahayu *et al*, 2008, 679-686) โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Che Man และคณะ (1996, 683-686) ที่พบว่า ผลการเติมเอนไซม์ผสมระหว่างเซลลูเลส แอลฟา-อะมัยเลส โพลีกาแลคทูโรเนส และโปรตีเอส อย่างละ 1% (w/w) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดน้ำมันมะพร้าวได้ จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการเติมเอนไซม์ไลเปสไม่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียแลกติก เพียงแต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์ไลเปส คือ กรดไขมัน และโมโนกลีเซอไรด์ของกรดไขมันอิ่มตัวสายกลางมีความหนืดที่สูงกว่าน้ำมันที่อยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ขั้นตอนการกรองแยกจึงช้ากว่าเล็กน้อย

2. ค่า %FFA และค่ากรด

ผลการนำผลิตภัณฑ์น้ำมันที่สกัดได้ไปทดสอบวัดค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรด ด้วยวิธีการไทเตรท พบว่า ค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรดมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับการหมักแบบปกติที่ไม่เติมไลเปส ผลการเร่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปส D ให้ค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรดสูงสุด เท่ากับ 35.52$\pm$1 73% และ 99.45$\pm$4 85 ตามลำดับ รองลงมาคือการเร่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปส F-AP15 มีค่าเท่ากับ 12.27$\pm$1.83% และ 34.34$\pm$5.11 ตามลำดับ สำหรับผลการเร่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปส AY, M, PS, และ Pancreatic lipase พบว่ามีความจำเพาะต่อน้ำมันมะพร้าวต่ำมากวัดค่า %FFA ได้เพียง 1.15-5.62% เมื่อเทียบกับการหมักแบบปกติมีค่า %FFA เท่ากับ 0.44$\pm$0 21% ดังแสดงในตารางที่ 4 1 นอกจากนี้ยังสามารถทดสอบแบบง่ายๆ โดยใช้กระดาษลิสมัส พบว่า ผลการใช้เอนไซม์ไลเปส D และ F-AP15 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา กระดาษลิสมัสจะเปลี่ยนเป็นสีแดงอย่างชัดเจน



ภาพที่ 4.2 ลักษณะการแยกชั้นและผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ปรับปรุงโครงสร้างโดยเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ตารางที่ 4.1 ปริมาณผลผลิต เปอร์เซ็นต์กรด และค่ากรดของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับโครงสร้างโมเลกุลด้วยเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ

แหล่งของไลเปส	%FFA	Acid value	%Yield	สีกระดาษลิตมัส
หมักแบบปกติ	0.44±0 21^{d}	1.24±0 58^{d}	35.3±0 5^{b}	
Lipase AY	1.15±0 24^{d}	3.23±0 68^{d}	31.5±0 5^{e}	
Lipase D	35.52±1.73^{a}	99.45±4 85^{a}	36.2±0 8^{a}	
Lipase M	1.24±0.12^{d}	3.47±0 33^{d}	31.7±0 5de	
Lipase PS	5.62±0.63^{c}	15.74±1 77^{c}	32.3±0 5^{cd}	
Pancreatic Lipase	1.18±0.61^{d}	3.29±1 70^{d}	32.5±0 5^{c}	
Lipase F-AP15	12.27±1.83^{b}	34.34±5 11^{b}	36.5±0 5^{a}	

หมายเหตุ : เครื่องหมาย a, b, c, d และ e ในแต่ละสดมภ์ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT
ค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการนำผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส AY, M, F-AP15, PS, D และ Pancreatic lipase มาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ 1,1-diphenyl-2-picrydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity assay ดัดแปลงตามวิธีของ Maria, *et al.* (2009, 114-123); ปิยาภัทร ไตรสนธิ (2550); Agbor, *et al.* (2006, 659-663) และ Chang, *et al.* (2001, 3420-3424) ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การยับยั้งอนุมูลอิสระของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับโครงสร้างโมเลกุลด้วยเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ

หน่วย : %DPPH free radical scavenging activity

ตัวอย่างน้ำมันมะพร้าว	ระดับความเข้มของน้ำมันมะพร้าว (mg/ml)			r^2	IC_{50} (mg/ml)
	20	100	200		
หมักแบบปกติ	33.12	46.92	67.24	0.9979	111.42
เร่งด้วย Lipase AY	34.54	48.40	68.64	0.9981	103.90
เร่งด้วย Lipase D	35.64	56.11	99.75	0.9801	68.94
เร่งด้วย Lipase M	34.05	46.14	65.72	0.9949	114.34
เร่งด้วย Lipase PS	35.83	48.36	74.80	0.9808	93.21
เร่งด้วย Pancreatic Lipase	35.54	46.99	66.24	0.9934	109.04
เร่งด้วย Lipase F-AP15	36.30	50.23	76.58	0.9875	87.52
Ascorbic acid	-	-	-	0.9997	6.32
BHA	-	-	-	0.9995	11.41

จากการทดสอบ พบว่า น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้าง ที่ระดับความเข้มข้นทดสอบ 20-200 mg/ml สามารถรีดิวซ์อนุมูลอิสระของ DPPH ได้โดยสังเกตจากการเปลี่ยนสารทดสอบจากสีม่วงเป็นไม่มีสีได้เช่นเดียวกับผลการใช้สารตัวอย่างควบคุมผลบวกคือกรดแอสคอบิกและ BHA โดยน้ำมันมะพร้าวที่เร่งด้วยไลเปส D มีค่า IC_{50} ต่ำสุดคือ 68.94 mg/ml เมื่อเทียบกับน้ำมันมะพร้าวที่สกัดแบบปกติมีค่า IC_{50} เท่ากับ 111.42 mg/ml ในขณะที่งานวิจัยของ Marina, *et al.* (2009, 114-123) รายงานว่าน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.24-1.66 mg/ml และเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมผลบวกคือกรดแอสคอบิก และ BHA พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.32 และ 11.41 mg/ml ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองของงานวิจัยนี้แสดงให้ว่าน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยไลเปสก่อนการหมักสกัดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ทั่วไป

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

4.1 ผลการทดสอบวิธี disc diffusion method

ผลการนำผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส AY, M, F-AP15, PS, D และ Pancreatic lipase มาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 2 ชนิด *S. aureus* และ *E. coli* วิธี disc diffusion method ด้วยการทดสอบบนอาหารแข็ง MHA โดยใช้สารละลายฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 1-20% เป็นตัวอย่างควบคุมเปรียบเทียบผลบวกทั้งเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ 4.3 และ 4.4 จากนั้นใช้น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงมาเจือจางเริ่มต้นจากระดับความเข้มข้น 12.5% ลดลงครั้งละ 2 เท่า จนถึง 1.56% มาทดสอบ โดยใช้สาร DMSO 100% และน้ำมันดอกทานตะวันเป็นตัวอย่างควบคุม แล้วบันทึกภาพวงแหวนการยับยั้ง (clear zone) ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ 4.5 และ 4.6 เปรียบเทียบกับความกว้างของวงแหวนการยับยั้งที่ทดสอบกับสารฟีนอล จากนั้นรายงานผลในรูปของค่าประสิทธิภาพความกว้างของรูปวงแหวนการยับยั้งเทียบเท่ากับ %ของสารฟีนอล (%phenol equivalent) ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 4.3 และตารางที่ 4.4

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S aureus* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก พบว่า น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส M, F-AP15, PS และ D มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าวได้ ในขณะที่ผลการทดสอบกับน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ และน้ำมันที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส AY และ Pancreatic lipase ชุดควบคุมน้ำมันดอกทานตะวันและ DMSO 100% ไม่แสดงผลการยับยั้ง (ตารางที่ 4.3) น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส D มีฤทธิ์การยับยั้งสูงสุด โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้เทียบเท่ากับผลการทดสอบกับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15% เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 6.25-12.5%

น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* รองลงมาคือน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส PS และ F-AP15 เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 6.25% พบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งเทียบเท่ากับฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 10% ในขณะที่ผลการใช้ไลเปส M พบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งเทียบเท่ากับฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 5%

ตารางที่ 4.3 ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ

หน่วย : phenol equivalent (%)

ตัวอย่างน้ำมันมะพร้าว	ระดับความเข้มข้นของน้ำมันตัวอย่างที่ทดสอบ (%)			
	1.56	3.12	6.25	12.50
หมักแบบปกติ	0	0	0	0
หมักกับ Lipase AY	0	0	0	0
หมักกับ Lipase D	5	10	15	15
หมักกับ Lipase M	0	0	5	5
หมักกับ Lipase PS	5	5	10	10
หมักกับ Pancreatic Lipase	0	0	0	0
หมักกับ Lipase F-AP15	5	5	10	10
DMSO 100%	0			
น้ำมันดอกทานตะวัน 100%	0			

หมายเหตุ : ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเมื่อเทียบกับผลการใช้สารละลายฟีนอล (phenol equivalent) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 15 และ 20%

สำหรับผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ พบว่า ให้ผลการทดสอบไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* กล่าวคือน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส M, F-AP15, PS และ D มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าวได้ ในขณะที่ผลการทดสอบกับน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ และน้ำมันที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส AY และ Pancreatic lipase ชุดควบคุมน้ำมันดอกทานตะวัน และ DMSO 100% ไม่แสดงผลการยับยั้ง (ตารางที่ 4 4) น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส D และ F-AP15 มีฤทธิ์การยับยั้งสูงสุด โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้เทียบเท่ากับผลการทดสอบกับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15% เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 6.25-12.5% น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* รองลงมาคือน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส PS และ M เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 12.5% พบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งเทียบเท่ากับฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 10% และ 5% ตามลำดับ

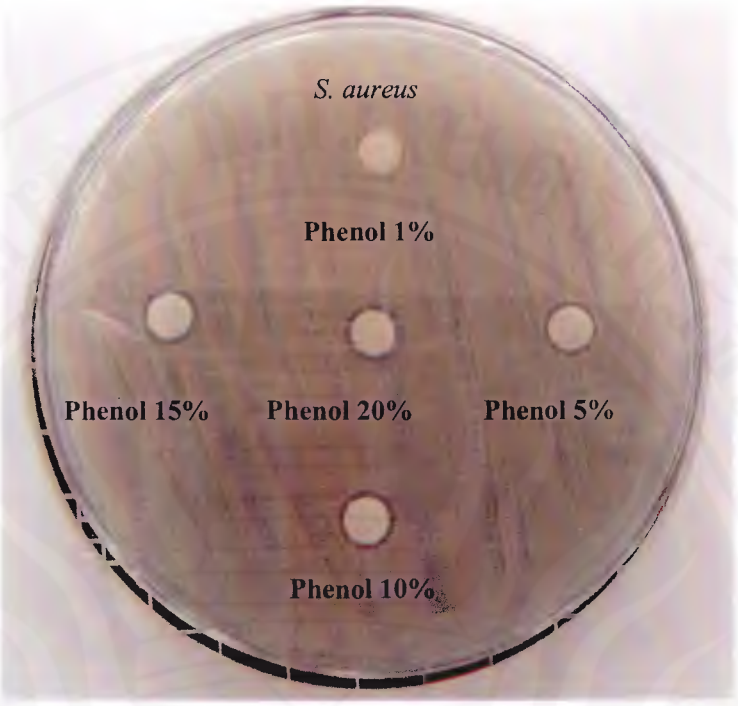
Kamariah (2006) ได้ค้นพบและจดเอกสารสิทธิบัตร US 2010/0016430 A1, Jan. 21, 2010 ว่าการดัดแปลงโครงสร้างของน้ำมันมะพร้าวโดยใช้เอนไซม์ไลเปสชนิด 1,3 specific มีผลทำให้เพิ่มคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันได้ในวงกว้างขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานกรดไขมันอิสระสายกลาง (C8-C12) และโมโนกลีเซอไรด์ของกรดไขมันสายกลาง เช่น monolaurin เป็นต้น ดังนั้นผู้วิจัยคาดว่า สารที่ออกฤทธิ์ดังกล่าวน่าจะเป็นกรดไขมัน และโมโนกลีเซอไรด์ของกรดไขมัน เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Bannasan และคณะ (2011, 373-376) ทดลองนำน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มาสกัดกรดไขมันด้วยการทำปฏิกิริยา saponification ให้เกิดเป็นสบู่ แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นลงไปสกัดแยก จากนั้นนำมาทดสอบด้วยวิธี disc diffusion พบว่ามีฤทธิ์การยับยั้ง *S. aureus, B. subtilis, B. cereus UVK* และ *V. parahaemolyticus* ได้ดี

ตารางที่ 4.4 ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ

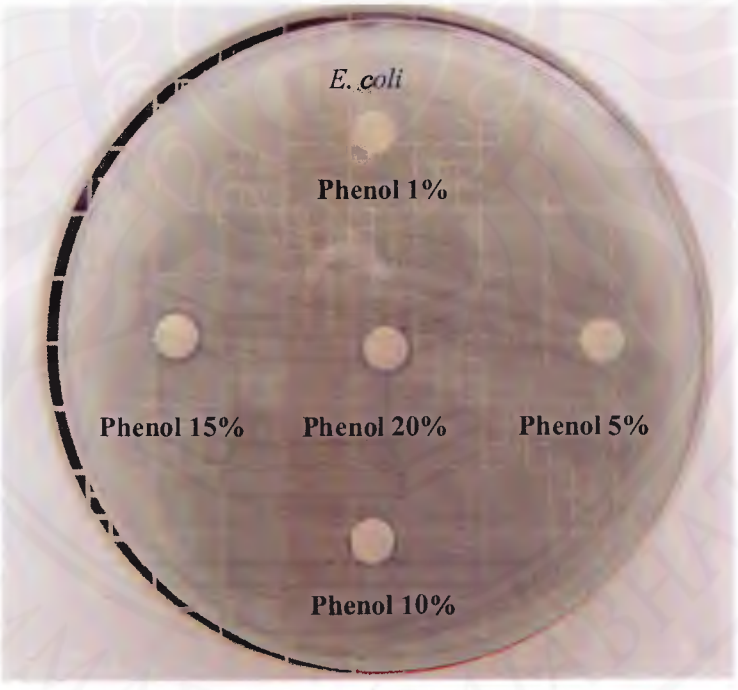
หน่วย : phenol equivalent (%)

ชนิดของเอนไซม์ไลเปส	ระดับความเข้มข้นของน้ำมันตัวอย่างที่ทดสอบ (%)			
	1.56	3.12	6.25	12.50
หมักแบบปกติ	0	0	0	0
หมักกับ Lipase AY	0	0	0	0
หมักกับ Lipase D	10	10	15	15
หมักกับ Lipase M	0	0	5	5
หมักกับ Lipase PS	0	5	5	10
หมักกับ Pancreatic Lipase	0	0	0	0
หมักกับ Lipase F-AP15	5	10	15	15
DMSO 100%	0			
น้ำมันดอกทานตะวัน 100%	0			

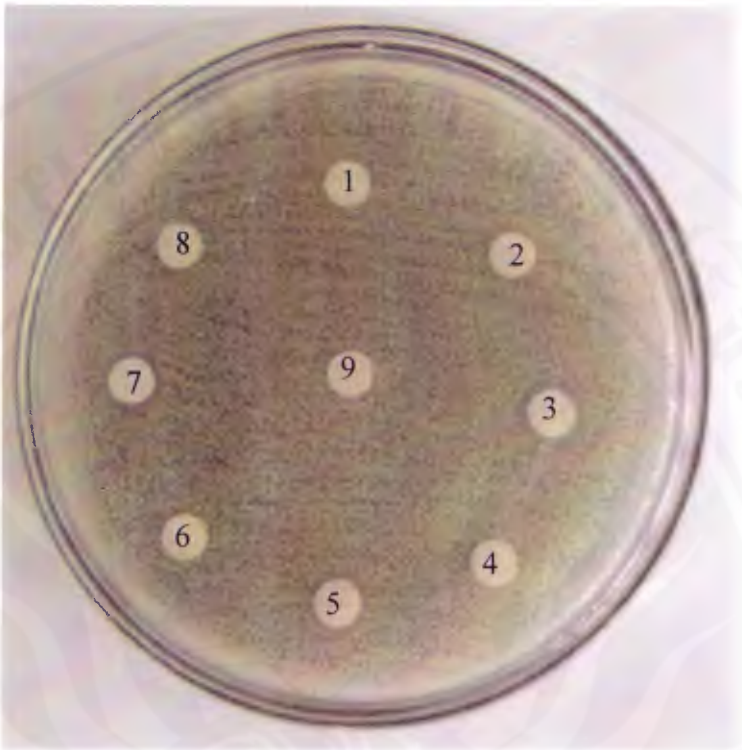
หมายเหตุ : ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเมื่อเทียบกับผลการใช้สารละลายฟีนอล (phenol equivalent) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 15 และ 20%



ภาพที่ 4.3 ประสิทธิภาพของวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* บนอาหาร MHA ของสารละลายฟีนอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

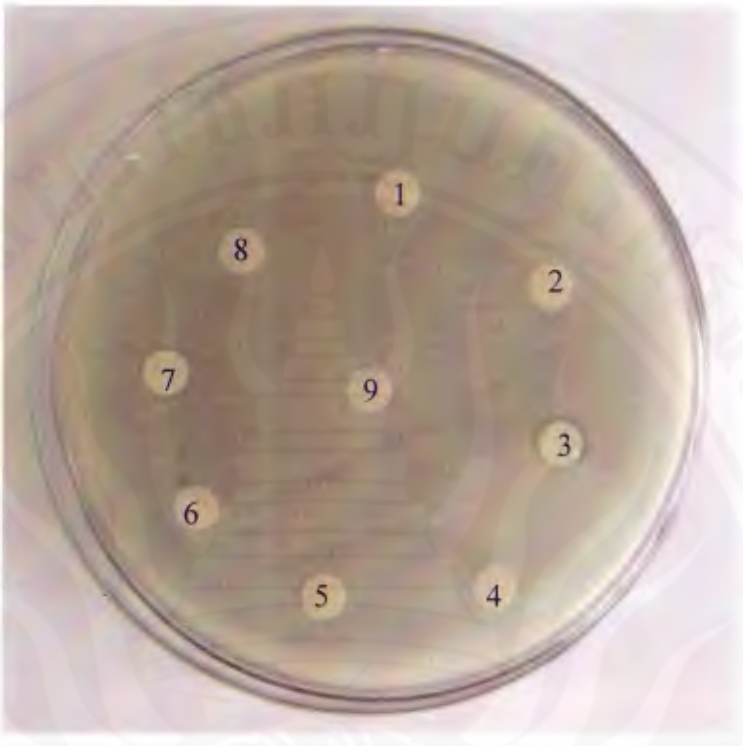


ภาพที่ 4.4 ประสิทธิภาพของวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* บนอาหาร MHA ของสารละลายฟีนอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ



ภาพที่ 4.5 วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้น 12.5%

หมายเหตุ : 1=หมักแบบปกติ, 2=Lipase AY, 3=Lipase D, 4= Lipase M, 5= Lipase PS, 6= Pancreatic Lipase, 7= Lipase F-AP15, 8=น้ำมันดอกทานตะวัน และ 9= DMSO



ภาพที่ 4.6 วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้น 12.5%

หมายเหตุ : 1=หมักแบบปกติ, 2=Lipase AY, 3=Lipase D, 4= Lipase M, 5= Lipase PS, 6= Pancreatic Lipase, 7= Lipase F-AP15, 8=น้ำมันดอกทานตะวัน และ 9= DMSO

4.2 ผลการทดสอบวิธี broth dilution techniques

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* โดยใช้เทคนิค broth dilution techniques ทดสอบการเจริญในอาหารเหลว Mueller Hinton broth (MHB) ด้วยวิธี serial dilution test ครั้งละ 2 เท่า เพื่อทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันมะพร้าวเสริมสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (minimum inhibitory concentration; MIC) เบื้องต้นพบปัญหาการละลายของตัวอย่างน้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้ระดับความเข้มข้นสูงสุดคือ 12.5% และหลังจากเจือจางตัวอย่างน้ำมันลดความเข้มข้นต่ำลงจนถึง 1.65% เมื่อเติมเชื้อเสร็จเขย่าให้เกิดการผสมกันและฆ่าเชื้อเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปบ่ม พบว่า เชื้อยังคงเจริญได้ในทุกระดับความเข้มข้นของน้ำมันดัดแปลงที่ใช้ทดสอบซึ่งสังเกตได้จากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงพบว่ามีค่า Abs เกิน 0.05 จึงไม่สามารถคำนวณหาค่า MIC ได้ แต่อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยได้นำตัวอย่างดังกล่าวไปนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร PCA พบว่า ผลการเติมน้ำมันมะพร้าว

ดัดแปลงที่ระดับความเข้มข้น 12.5% มีผลทำให้ปริมาณเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ในชุดควบคุมเจริญได้สูงสุด 10^9 CFU/ml ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมน้ำมันดัดแปลงเจริญได้สูงสุดเพียง 10^6 CFU/ml ซึ่งมีจุลินทรีย์ต่ำกว่าถึง 3 ล็อก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mansour and Milliere (2001, 87-94) ศึกษาผลการใช้ monolaurin เติมลงในนมความเข้มข้น 250 µg/ml แล้วเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่า จำนวน vegetative cells ของ *Bacillus* sp. ลดลงจาก 4 $1x10^4$ cfu/ml เหลือ $7.0 x10^3$ Sp/ml และงานวิจัยของ Cotton and Marshall (1997, 830–833) ที่แสดงให้เห็นว่าการเตรียม monolaurin ในสารละลาย ethanol จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ vegetative cells ของเชื้อ *B. cereus* ได้สูงกว่าการเตรียมด้วยการละลายในน้ำโดยจะลดลงจาก 10^5 CFU/ml เหลือ 10^3 CFU/ml

ผลของการเติมกลีเซอรอลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสแต่ละชนิด

ผลการนำครีมจำนวน 1.0 กิโลกรัม มาเติมกลีเซอรอลลงไปขวดโหลละ 50 กรัม และเติมเอนไซม์ไลเปสแต่ละชนิด คือ ชุดควบคุมไม่เติมเอนไซม์ ที่เหลือเติม AY, M, F-AP15, PS, D และ Pancreatic lipase ลงไป 10 มิลลิลิตร กวนผสมเพื่อให้เอนไซม์เร่งการทำปฏิกิริยาความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศ (30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปหมักแยกน้ำมันในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแยกชั้นน้ำมัน จากนั้นตักน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นออกและกรองแยกด้วยกระดาษทิชชู บรรจุในขวดพลาสติกใส ไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน ปิดฝา ชั่งน้ำหนักของน้ำมันที่ได้ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณผลผลิตเทียบกับครีม วัดค่า %FFA และ ค่ากรด และทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ได้ผลการทดลองดังนี้

1. ปริมาณผลผลิต

ผลการทดลอง พบว่า ผลการเติมกลีเซอรอลและใช้เอนไซม์ไลเปสทั้ง 6 ชนิด ยังคงทำให้เกิดการแยกชั้นของน้ำมันหลังผ่านกระบวนการหมัก แต่ลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์และการแยกชั้นของน้ำมันมีความแตกต่างกัน (ดังแสดงในภาพที่ 4.7) ผลผลิตของน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นและน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างที่แยกได้มีปริมาณที่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ผลการเติมเอนไซม์ไลเปส D เป็นตัวเร่งการดัดแปลงโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันก่อนแยกให้ปริมาณผลผลิตของน้ำมันต่ำสุด (30.3 เปอร์เซ็นต์) และมีความแตกต่างกันทางสถิติกับทรีทเมนต์อื่น ๆ ส่วนผลการใช้ไลเปสชนิดอื่น ๆ จะให้ปริมาณผลผลิตที่สูงกว่า (30.7-35.7 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งพบว่าการเติมกลีเซอรอลกับไลเปส D มีผลทำให้ปริมาณ

ผลผลิตลดต่ำลงเมื่อเทียบกับการไม่เติม (ผลผลิต 36.2 เปอร์เซ็นต์ ในตารางที่ 4.1) แต่อย่างไรก็ตาม ผลการเติมเอนไซม์ไลเปส D ยังคงได้ผลผลิตน้ำมันที่สูงกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการหมักแยกแบบปกติโดยไม่มีการดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปสได้ผลผลิต 35.2 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่า ผลิตภัณฑ์น้ำมันที่ผ่านขั้นตอนการดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส D และกลีเซอรอลมีลักษณะสีขาวขุ่น มีกลิ่นฉุน และมีความหนืดที่สูงกว่า (ดังแสดงในภาพที่ 4.2) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมผลิตภัณฑ์น้ำมันจะใสไม่มีสี มีกลิ่นหอมมะพร้าว และไม่หนืด

ตารางที่ 4.5 ปริมาณผลผลิต เปอร์เซ็นต์กรด และค่ากรดของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับโครงสร้างโมเลกุลด้วยการเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ

แหล่งของไลเปส	%FFA	Acid value	%Yield
หมักแบบปกติ	0.72±0.54^{e}	2.02±1.51^{e}	35.2±0 4^{a}
Lipase AY + Glycerol	11.28±1 47^{d}	31.59±4 13^{d}	34.2±0.4^{a}
Lipase D + Glycerol	46.21±4.52^{a}	129.39±12.65^{a}	30.3±2.6^{c}
Lipase M + Glycerol	9.49±0.64^{d}	26.57±1.80^{d}	33.3±2.3^{ab}
Lipase PS + Glycerol	22.63±2 39^{c}	63.35±6.69^{c}	35.7±2.0^{a}
Pancreatic Lipase + Glycerol	2.90±1.13^{e}	8.13±3.16^{e}	31.7±1.4^{bc}
Lipase F-AP15 + Glycerol	33.94±5.29^{b}	95.02±14.82^{b}	35.7±3.3^{a}

หมายเหตุ : เครื่องหมาย a, b, c, d และ e ในแต่ละสดมภ์ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT
ค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ

ภาพที่ 4.7 ลักษณะการแยกชั้นของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ปรับปรุงโครงสร้างโดยเติมกลีเซอรอล และเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

2. ค่ากรด และ %FFA

ผลการนำผลิตภัณฑ์น้ำมันที่สกัดได้ไปทดสอบวัดค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรด ด้วยวิธีการไทเตรท พบว่า ค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรดมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับการหมักแบบปกติที่ไม่เติมไลเปส ผลการเร่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปส D ให้ค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรดสูงสุด เท่ากับ 46.21±4.52% และ 129.39±12.65 ตามลำดับ รองลงมาคือการเร่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปส F-AP15 มีค่าเท่ากับ 33.94±5.29% และ 95.02±14.82 ตามลำดับ ผลการเร่งโดยใช้เอนไซม์ Pancreatic lipase พบว่ามีความจำเพาะต่อน้ำมันมะพร้าวต่ำมากวัดค่า %FFA ได้เพียง 2.90±1.13% สำหรับการหมักแบบปกติมีค่า %FFA เท่ากับ 0.72±0.54% ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และเมื่อเทียบกับการเร่งโดยไม่เติมกลีเซอรอลในตอนที่ 1 พบว่า การเติมกลีเซอรอลมีผลช่วยให้ค่า %FFA ของน้ำมันสูงกว่าเดิมจาก 35.52±1.73% เพิ่มเป็น 46.21±4.52%

ตารางที่ 4.6 การยับยั้งอนุมูลอิสระของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับโครงสร้างโมเลกุลด้วยการเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ

หน่วย : %DPPH free radical scavenging activity

ตัวอย่างน้ำมันมะพร้าว	ระดับความเข้มของน้ำมันมะพร้าว (mg/ml)			r^2	IC_{50} (mg/ml)
	20	100	200		
หมักแบบปกติ	32.12	53.54	69.89	0.9801	97.94
เติม Lipase AY + Glycerol	33.54	50.31	64.23	0.9862	110.4
เติม Lipase D + Glycerol	37.55	62.11	109.32	0.9866	58.38
เติม Lipase M + Glycerol	36.77	47.42	67.65	0.9872	103.65
เติม Lipase PS + Glycerol	35.22	49.98	64.28	0.9947	107.73
เติม Pancreatic Lipase + Glycerol	35.12	50.04	60.25	0.9708	117.42
เติม Lipase F-AP15 + Glycerol	36.10	50.66	66.53	0.9985	100.17
Ascorbic acid	-	-	-	0.9997	6.32
BHA	-	-	-	0.9995	11.41

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการนำผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยการเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส AY, M, F-AP15, PS, D และ Pancreatic lipase มาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ 1,1-diphenyl-2-picrydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity assay ดัดแปลงตามวิธีของ Maria, *et al.* (2009, 114-123); ปิยาภัทร ไตรสนธิ (2550); Agbor, *et al.* (2006, 659-663) และ Chang, *et al.* (2001, 3420-3424) ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 4.6

พบว่า น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้าง ที่ระดับความเข้มข้นทดสอบ 20-200 mg/ml สามารถรีดิวซ์อนุมูลอิสระของ DPPH ได้ดี น้ำมันมะพร้าวที่เร่งด้วยไลเปส D มีค่า IC_{50} ต่ำสุดคือ 58.38 mg/ml เมื่อเทียบกับน้ำมันมะพร้าวที่สกัดแบบปกติมีค่า IC_{50} เท่ากับ 97.94 mg/ml ในขณะที่ตัวอย่างน้ำมันทรีทเมนต์อื่น ๆ มีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 100-117 mg/ml แสดงให้ว่าน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยไลเปส D ก่อนการหมักสกัดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าตัวอย่างน้ำมันมะพร้าวนทรีทเมนต์อื่น ๆ ประมาณ 2 เท่า แต่ก็ยังคงมีฤทธิ์ต่ำกว่ากรดแอสคอบิกและ BHA

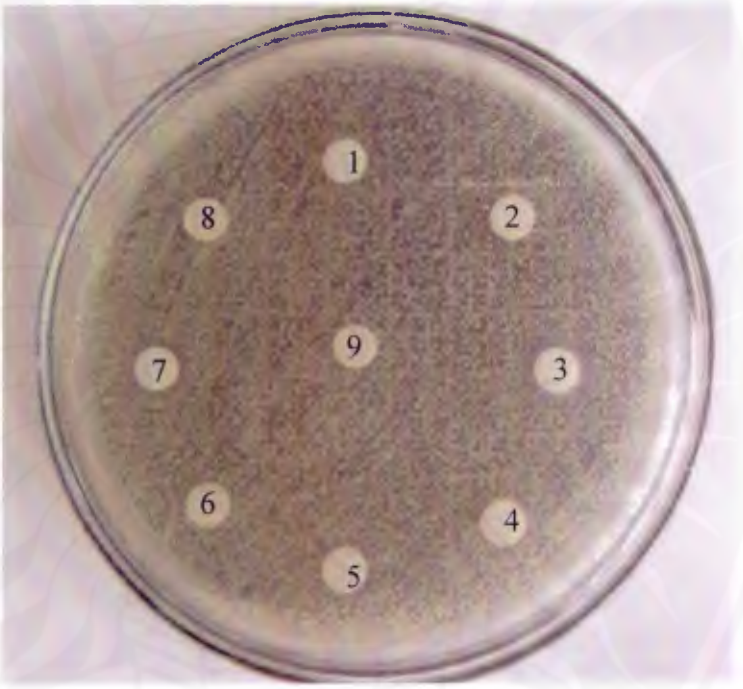
4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ผลการนำผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส AY, M, F-AP15, PS, D และ Pancreatic lipase มาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 2 ชนิด *S. aureus* และ *E. coli* วิธี disc diffusion method ด้วยการทดสอบบนอาหารแข็ง MHA โดยใช้สารละลายฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 1-20% เป็นตัวอย่างควบคุมเปรียบเทียบผลบวก จากนั้นใช้น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงมาเจือจางเริ่มต้นจากระดับความเข้มข้น 12.5% ลดลงครั้งละ 2 เท่า จนถึง 1.56% มาทดสอบ โดยใช้สาร DMSO 100% และน้ำมันดอกทานตะวันเป็นตัวอย่างควบคุม แล้วบันทึกภาพวงแหวนการยับยั้ง (clear zone) ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ 4 8 และ 4.9 เปรียบเทียบกับความกว้างของวงแหวนการยับยั้งที่ทดสอบกับสารฟีนอล จากนั้นรายงานผลในรูปของค่าประสิทธิภาพความกว้างของรูปวงแหวนการยับยั้งเทียบเท่ากับ % ของสารฟีนอล (%phenol equivalent) ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 4.7 และตารางที่ 4.8

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก พบว่า น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส M, F-AP15, PS, Pancreatic lipase และ D มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าวได้ ในขณะที่ผลการทดสอบกับน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ และน้ำมันที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส AY น้ำมันดอกทานตะวัน และ DMSO 100% ไม่แสดงผลการยับยั้ง (ตารางที่ 4.7) น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลง

โครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส D มีฤทธิ์การยับยั้งสูงสุด โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้เทียบเท่ากับผลการทดสอบกับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15% เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 12.5% เช่นเดียวกับการทดลองในตอนที่ 1

น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* รองลงมาคือน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส F-AP15 และ PS เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 12.5% เท่ากันพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเทียบเท่ากับฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 10% สำหรับผลการใช้ไลเปส M และ Pancreatic lipase พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียเทียบเท่ากับฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 1%



ภาพที่ 4.8 วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 12.5%

หมายเหตุ : 1=หมักแบบปกติ, 2=Lipase AY, 3=Lipase D, 4= Lipase M, 5= Lipase PS, 6= Pancreatic Lipase, 7= Lipase F-AP15, 8=น้ำมันดอกทานตะวัน และ 9= DMSO

สำหรับผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ พบว่า ให้ผลการทดสอบไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบในตอนที่ 1 กล่าวคือน้ำมันมะพร้าวที่

ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปสทุกชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าวได้ ในขณะที่ผลการทดสอบกับน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ น้ำมันดอกทานตะวัน และ DMSO 100% ไม่แสดงผลการยับยั้ง (ตารางที่ 4.8) น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส D มีฤทธิ์การยับยั้งสูงสุด โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้เทียบเท่ากับผลการทดสอบกับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15% เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 12.5%

ตารางที่ 4.7 ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้าง ด้วยการเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ

หน่วย : phenol equivalent (%)

ตัวอย่างน้ำมันมะพร้าว	ระดับความเข้มข้นของน้ำมันตัวอย่างที่ทดสอบ (%)			
	1.56	3.12	6.25	12.50
หมักแบบปกติ	0	0	0	0
เติม Lipase AY + Glycerol	0	0	0	0
เติม Lipase D + Glycerol	5	5	10	15
เติม Lipase M + Glycerol	0	0	1	1
เติม Lipase PS + Glycerol	1	1	5	10
เติม Pancreatic Lipase + Glycerol	0	0	0	1
เติม Lipase F-AP15 + Glycerol	1	5	5	10
DMSO 100%	0			
น้ำมันดอกทานตะวัน 100%	0			

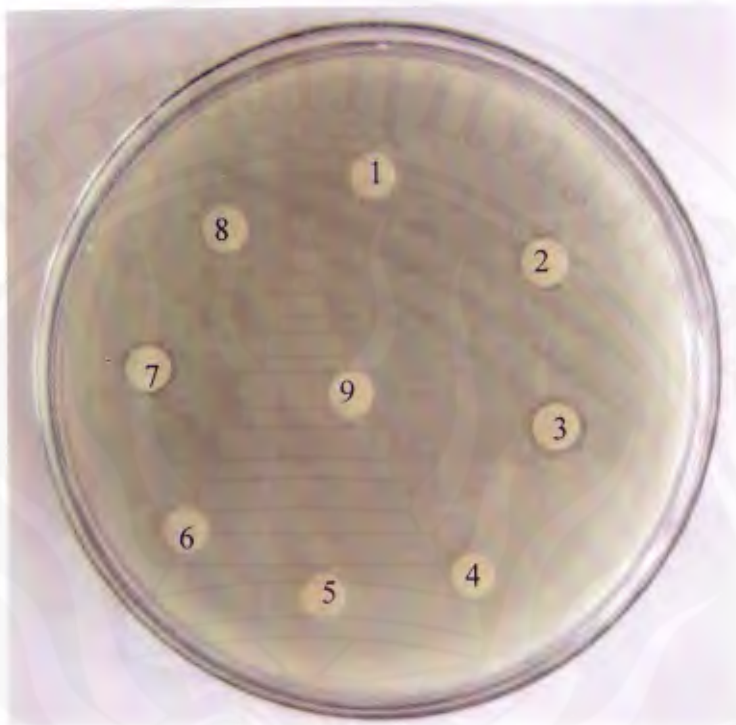
หมายเหตุ : ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเมื่อเทียบกับผลการใช้สารละลายฟีนอล (phenol equivalent) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 15 และ 20%

ตารางที่ 4.8 ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้าง ด้วยการเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ

หน่วย : phenol equivalent (%)

ตัวอย่างน้ำมันมะพร้าว	ระดับความเข้มข้นของน้ำมันตัวอย่างที่ทดสอบ (%)			
	1.56	3.12	6.25	12.50
หมักแบบปกติ	0	0	0	0
เติม Lipase AY + Glycerol	0	0	1	5
เติม Lipase D + Glycerol	5	5	10	15
เติม Lipase M + Glycerol	0	1	1	5
เติม Lipase PS + Glycerol	0	1	1	5
เติม Pancreatic Lipase + Glycerol	0	0	0	5
เติม Lipase F-AP15 + Glycerol	1	1	5	10
DMSO 100%	0			
น้ำมันดอกทานตะวัน 100%	0			

หมายเหตุ : ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเมื่อเทียบกับผลการใช้สารละลายฟีนอล (phenol equivalent) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 15 และ 20%



ภาพที่ 4.9 วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 12.5%

หมายเหตุ : 1=หมักแบบปกติ, 2=Lipase AY, 3=Lipase D, 4= Lipase M, 5= Lipase PS, 6= Pancreatic Lipase, 7= Lipase F-AP15, 8=น้ำมันดอกทานตะวัน และ 9= DMSO

น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* รองลงมาคือน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส F-AP15 เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 12.5% พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเทียบเท่ากับฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 10% สำหรับน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส AY, M, , PS และ Pancreatic lipase พบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งเทียบเท่ากับฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 5% เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 12.5% (ตารางที่ 4.8)

เนื่องจากความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมัน (fatty acid specificity) ของไลเปสที่ต่างกัน โดยจะสามารถเร่ง ปฏิกิริยาการย่อยสลายกรดไขมันชนิดใดชนิดหนึ่งด้วยอัตราเร็วสูง ๆ ซึ่งบางชนิดมีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดสั้น (ต่ำกว่า C8) บางชนิดมีจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดกลาง (C8-C14) เช่น ไลเปสจาก *Aspergillus niger* และ *Rhizopus delemar* และบางชนิดมีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดยาว (ตั้งแต่ C14 เป็นต้นไป) ตัวอย่างเช่น Freitas, *et al.*, (2010, 87-90) ศึกษาการสังเคราะห์โมโนกลีเซอไรด์

ด้วยเอนไซม์ไลเปสจาก *Penicillium camembertii* ที่ถูกตรึงบน epoxy SiO_2-PVA composite ด้วยปฏิกิริยา esterification พบว่า เอนไซม์ที่ถูกตรึงมีความจำเพาะสูงกับกรด myristic และ palmytic acids สำหรับงานวิจัยนี้พบว่าไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดกลางมากที่สุดโดยเฉพาะกรดลอริก คือ ไลเปส D

จากความจำเพาะของไลเปสที่มีต่อกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ทำให้สามารถนำเอนไซม์ไลเปสไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม เช่น การใช้ไลเปสเพิ่มความเข้มข้นของกรดไขมันไม่อิ่มตัว และใช้ในการสังเคราะห์เอสเทอร์ที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้นทั้งด้านปริมาณผลผลิต คุณสมบัติความกรด และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งสองตอนที่ศึกษา ผู้วิจัยจึงตัดสินใจคัดเลือกใช้เอนไซม์ไลเปส D เป็นเอนไซม์ที่เหมาะสำหรับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนต่อไป

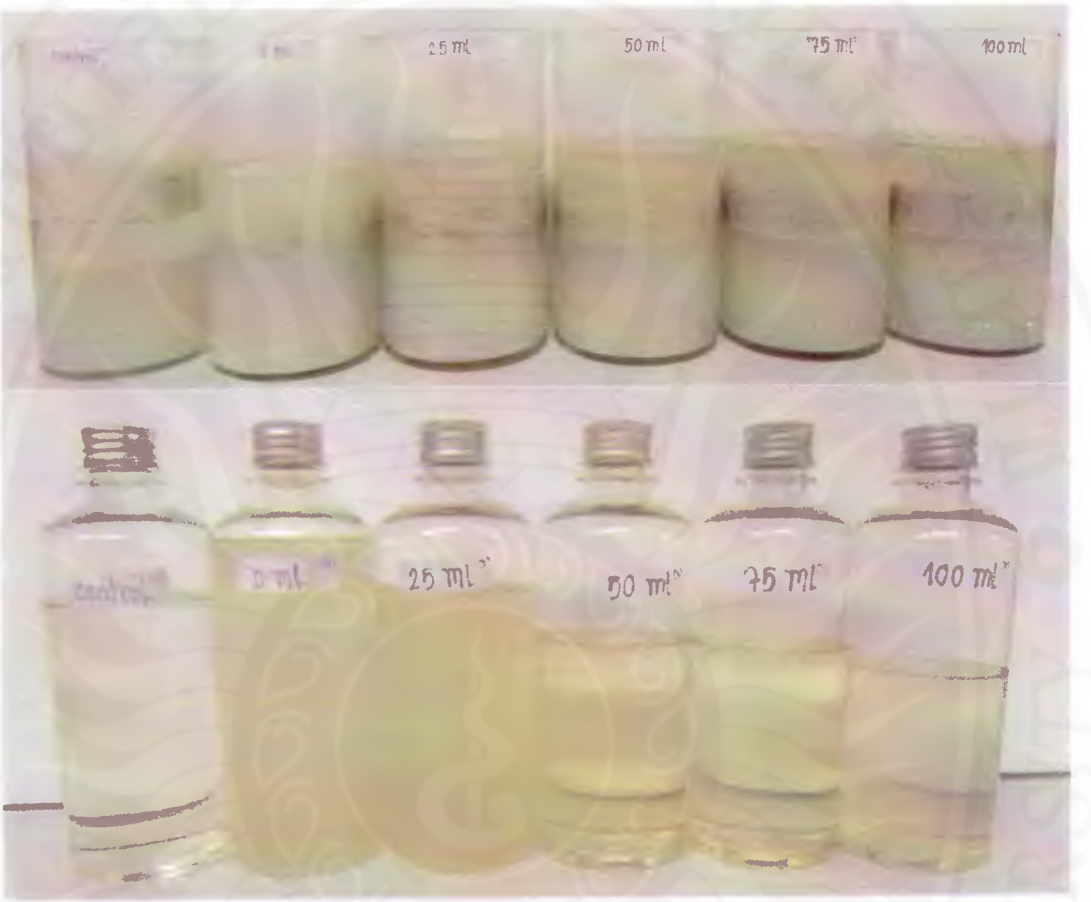
ปริมาณกลีเซอรอลที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส D

ผลจากการชั่งครีมจำนวน 900, 925, 950, 975 และ 1,000 กรัม มาใส่ในขวดโหลแก้วใสขนาด 2.0 ลิตร ซึ่งมีระดับความสูงของตัวอย่างไม่เกิน ¾ ของความสูงภาชนะ เติมกลีเซอรอลลงไปขวดโหลละ 100, 75, 50, 25 และ 0 กรัม ตามลำดับจากนั้นเติมเอนไซม์ไลเปส D ลงไป 10 มิลลิลิตร ชุดควบคุมไม่เติมเอนไซม์ กวนผสมเพื่อให้เอนไซม์เร่งการทำปฏิกิริยาความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศ (30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที หมักแยกน้ำมันในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแยกชั้นน้ำมัน วัดค่าปริมาณผลผลิตน้ำมันเทียบกับครีม ตักน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นออกและกรองแยกด้วยกระดาษทิชชูบรรจุในขวดพลาสติกใส ไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน ปิดฝา แล้ววัดค่า %FFA และค่ากรดทดสอบคุณสมบัติฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ ได้ผลการทดลองดังนี้

1. ปริมาณผลผลิต

ผลการทดลอง พบว่า ผลการแปรปริมาณกลีเซอรอลตั้งแต่ 25-100 มก./1000 ก.ของครีม โดยใช้เอนไซม์ไลเปส D เป็นตัวเร่ง ยังคงทำให้เกิดการแยกชั้นของน้ำมันหลังผ่านกระบวนการหมักแยก ดังแสดงในภาพที่ 4 10 โดยผลผลิตของน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นและน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างที่แยกได้มีปริมาณที่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0$ 05) ดังแสดงในตารางที่ 4.9 ผลการเติมกลีเซอรอล 25 มก./1000 ก.ของครีมในปฏิกิริยาการดัดแปลงโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันก่อนหมักแยกให้ปริมาณผลผลิตของน้ำมันดัดแปลงสูงสุด (27.67±2.34 เปอร์เซ็นต์) และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการหมักแบบปกติที่ไม่ใช้เอนไซม์

การเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลมากกว่า 25 มก./1000 ก. ของครีม จะแปรผกผันตามกับปริมาณผลผลิตของน้ำมัน กล่าวคือ เมื่อเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลจะมีผลทำให้ปริมาณผลผลิตลดลง



ภาพที่ 4.10 ลักษณะการแยกชั้นของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยเติมกลีเซอรอลที่ระดับต่าง ๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ตารางที่ 4.9 ปริมาณผลผลิต เปอร์เซ็นต์กรด และค่ากรดของน้ำมันมะพร้าวที่ปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลด้วยไลเปส D โดยเติมกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

กลีเซอรอล (มก./1000 ก.)	%FFA	Acid value	%Yield
Control	0.58±0 21^{c}	1.62±0.59^{c}	30.00±3.35^{a}
0	40.25±0.17^{bc}	106.12±1 11^{bc}	21.67±2.14^{c}
25	41.53±0.67^{a}	116.27±1.88^{a}	27.67±2.34^{ab}
50	40.40±0 54^{bc}	113.12±1 51^{bc}	21.83±1.72^{c}
75	40.02±0.50^{c}	112.06±1 40^{c}	13.50±1.22^{d}
100	38.86±0.44^{d}	108.79±1 22^{d}	10.83±1.17^{e}

หมายเหตุ : เครื่องหมาย a, b และ c ในแต่ละสดมภ์ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT
ค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ

2. ค่ากรด และ %FFA

ผลการนำผลิตภัณฑ์น้ำมันที่สกัดได้ไปทดสอบวัดค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรด ด้วยวิธีการไทเตรท พบว่า ค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรดมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับการหมักแบบปกติที่ไม่เติมไลเปส ผลการเติมกลีเซอรอล 25 มก./1000 ก. และเร่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปส D ให้ค่า %FFA และค่ากรดสูงสุด เท่ากับ 41.53±0.67 % และ 116.27±1.88 ตามลำดับ จากนั้นเมื่อเพิ่มปริมาณกลีเซอรอล พบว่าค่ากรดค่อย ๆ ลดลงเหลือ 108.79±1.22 เมื่อเติมกลีเซอรอลเพิ่มสูงขึ้นเป็น 100 มก./1000 ก. ดังแสดงในตารางที่ 4.9 เช่นเดียวกับรายงานวิจัยของ McNeill, G.P., Shimizu, S. & Yamane., T. (1991) ที่พบว่า การเติมเอนไซม์ไลเปสลงไปในส่วนผสมระหว่างกลีเซอรอล น้ำมันไตรกลีเซอไรด์ และน้ำจะมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยา glycerolysis ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นโมโนกลีเซอไรด์สูงขึ้นและมีกรดไขมันอิสระน้อยลง สำหรับการทดลองนี้พบว่าน้ำมันดัดแปลงมีค่ากรดเพิ่มสูงขึ้นเป็นร้อย แสดงว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เป็นปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นตัวหลักคือกรดลอริก ส่วนโมโนลอรินคาดว่าน่าจะมีน้อยกว่า อาจเป็นเพราะว่าในปฏิกิริยามีค่า aw สูง เนื่องจาก Ferreira-Dias, S. and Fonseca, M. M. R. (1995, 327-337) รายงานว่าปริมาณผลผลิตโมโนกลีเซอไรด์ที่ได้

จากปฏิกิริยา glycerolysis ขึ้นอยู่กับค่า aw โดยจะให้ผลผลิตสูงถึง 70% ของสารผสมในปฏิกิริยา หากควบคุมให้มีค่า aw ต่ำกว่า 0.23

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการนำผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยการเติมกลีเซอรอลระดับต่าง ๆ มาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ 1,1-diphenyl-2-picrydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity assay พบว่า น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างระดับความเข้มข้นทดสอบ 20-200 mg/ml สามารถรีดิวซ์อนุมูลอิสระของ DPPH ได้ ดี น้ำมันมะพร้าวที่เร่งด้วยไลเปส D และเติมกลีเซอรอลทุกระดับความเข้มข้นมีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกัน คือ 41-50 mg/ml เมื่อเทียบกับน้ำมันมะพร้าวที่สกัดแบบปกติมีค่า IC_{50} เท่ากับ 79 mg/ml ดังแสดงในตารางที่ 4.10 ซึ่งแสดงให้ว่าน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยไลเปส D มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการสกัดแบบปกติ

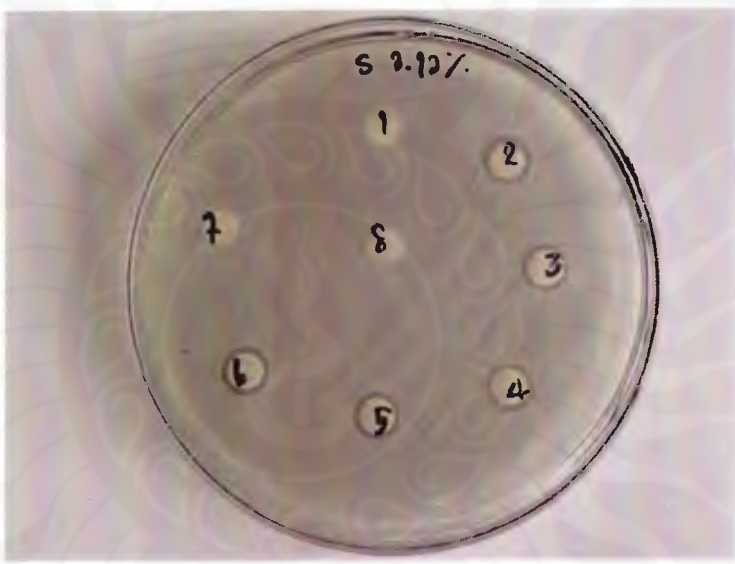
ตารางที่ 4.10 สมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระของน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลด้วยไลเปส D โดยเติมกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

หน่วย : %DPPH free radical scavenging activity

กลีเซอรอล (มล.)	ระดับความเข้มของน้ำมันมะพร้าว (mg/ml)			r^2	IC_{50} (mg/ml)
	20	100	200		
Control	31.24	53.66	67.30	0.9986	78.55
0	43.91	65.45	91.10	0.9998	42.46
25	44.87	64.50	90.21	0.9998	41.20
50	44.04	64.43	86.52	0.9983	43.06
75	44.04	63.54	84.54	0.9982	46.03
100	44.32	59.57	83.31	0.9963	49.86
Ascorbic acid	-	-	-	0.9997	6.32
BHA	-	-	-	0.9995	11.41

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก พบว่า น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วย เอนไซม์ไลเปส D ควบคู่กับการแปรระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าวได้ ในขณะที่ผลการทดสอบกับน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ น้ำมันดอกทานตะวัน และ DMSO 100% ไม่แสดงผลการยับยั้ง (ภาพที่ 4.11) น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยการเติมกลีเซอรอล 25 มก./ ก.ก. มีฤทธิ์การยับยั้งสูงสุด โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้เทียบเท่ากับผลการทดสอบกับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15% เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 12.5% เช่นเดียวกับการทดลองในตอนที่ผ่านมา ดังแสดงในตารางที่ 4.11



ภาพที่ 4.11 วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส D และเติมกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ : 1=หมักแบบปกติ, 2=0, 3=25, 4=50, 5=75, 6=100 มล. ต่อ 1000 มล.
7=น้ำมันดอกทานตะวัน และ 8= DMSO

ตารางที่ 4.11 ประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลด้วยการเติมกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

หน่วย : phenol equivalent (%)

กลีเซอรอล (มล.)	ระดับความเข้มข้นของน้ำมันตัวอย่างที่ทดสอบ (%)			
	1.56	3.12	6.25	12.50
Control	0	0	0	0
0	5	5	10	10
25	5	10	10	15
50	5	10	10	10
75	5	10	10	10
100	5	10	10	10
DMSO 100%	0	0	0	0
น้ำมันดอกทานตะวัน	0	0	0	0

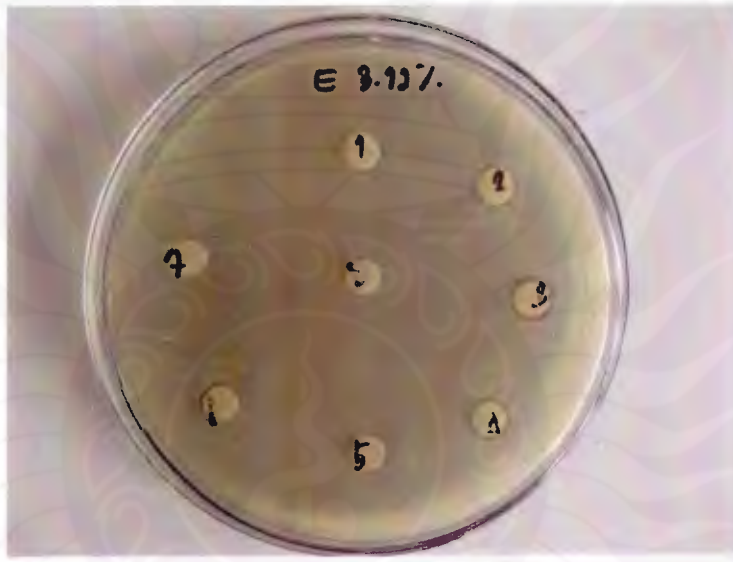
หมายเหตุ : ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเมื่อเทียบกับผลการใช้สารละลายฟีนอล (phenol equivalent) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 15 และ 20%

สำหรับผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *E. coli* พบว่า ให้ผลการทดสอบไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบที่ที่ผ่านมา กล่าวคือ น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส D มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* ได้ ในขณะที่ผลการทดสอบกับน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ น้ำมันดอกทานตะวัน และ DMSO 100% ไม่แสดงผลการยับยั้ง (ภาพที่ 4.12) ผลการเติมกลีเซอรอลในน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส D ทุกระดับความเข้มข้นมีฤทธิ์การยับยั้ง *E. coli* ไม่แตกต่างกัน โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้เทียบเท่ากับผลการทดสอบกับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15%, 10% และ 5% เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 12.5%, 6.25% และ 3.2% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.12)

ผลการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ให้ผลสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Handayani *et al.* (2009, 151-157) และBatovska *et al.* (2009, 43-47) นอกจากนี้ Mbandi, *et al.*, (2004, 815-818) ยังแสดงให้เห็นถึงผลการประยุกต์ใช้กรดไขมันอิสระโดยเฉพาะกรดลอริก และโมโนกลีเซอไรด์ของกรดลอริกต่อการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์ hot dogs และ

Hauerlandova, *et al*., (2014, 37-43) แสดงผลประยุกต์ใช้โมโนลอรินในผลิตภัณฑ์ cheese พบว่า มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ spore-forming bacteria ได้ดี

ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้นทั้งด้านปริมาณผลผลิต คุณสมบัติความกรด และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ผู้วิจัยจึงตัดสินใจคัดเลือกใช้เอนไซม์ไลเปส D ควบคู่กับการเติมกลีเซอรอลในปริมาณ 25 มก./ ก ก. เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 4.12 วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส D และเติมกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ : 1=หมักแบบปกติ, 2=0, 3=25, 4=50, 5=75, 6=100 มล. ต่อ 1000 มล.
7=น้ำมันดอกทานตะวัน และ 8= DMSO

ตารางที่ 4.12 ประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลด้วยการเติมกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

หน่วย : phenol equivalent (%)

กลีเซอรอล (มล.)	ระดับความเข้มข้นของน้ำมันตัวอย่างที่ทดสอบ (%)			
	1.56	3.12	6.25	12.50
Control	0	0	0	0
0	5	5	10	15
25	5	5	10	15
50	5	5	10	15
75	5	5	10	15
100	5	5	10	15
DMSO 100%	0	0	0	0
น้ำมันดอกทานตะวัน	0	0	0	0

หมายเหตุ : ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเมื่อเทียบกับผลการใช้สารละลายฟีนอล (phenol equivalent) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 15 และ 20%

พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส D

ผลจากการเตรียมครีมจำนวน 975 กรัม เติมกลีเซอรอล 25 กรัม เติมเอนไซม์ไลเปส D ที่เตรียมในสารละลายละลาย 1.0 M phosphate buffer พีเอชแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ พีเอช 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรลงไป 10 มิลลิลิตร ชุดควบคุมไม่เติมเอนไซม์ กวนผสมเพื่อให้เอนไซม์เร่งการทำปฏิกิริยาความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศเป็นเวลา 30 นาที หมักแยกน้ำมันในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าปริมาณผลผลิตน้ำมันเทียบกับครีม ตักน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นออกและกรองแยกด้วยกระดาษทิชชูบรรจุในขวดพลาสติกใส ไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน ปิดฝา แล้ววัดค่า %FFA และค่ากรดทดสอบคุณสมบัติฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ ได้ผลการทดลองดังนี้

2. ค่ากรด และ %FFA

ผลการนำน้ำมันที่สกัดได้ไปทดสอบวัดค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรดด้วยวิธีการไทเตรท พบว่า ค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรดมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับการหมักแบบปกติที่ไม่เติมไลเปส ผลจากการเติมกลีเซอรอล 25 มก./1000 ก. และเร่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปส D ที่พีเอช 5.5-7.0 ให้ค่า %FFA และค่ากรดสูงสุด เท่ากับ 42.88±1.30 % และ 120 06±3.63 ตามลำดับ หากปรับลดค่าพีเอชของเอนไซม์ไลเปส D ลงเหลือ 5.0 ค่ากรดของน้ำมันสกัดจะลดต่ำลงเหลือ 109 18±1 90 ดังแสดงในตารางที่ 4.9 ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fu, *et al.* (1995) ทดลองย่อยสลายน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันชนิดอื่น ๆ ด้วยเอนไซม์ไลเปสจาก *Aspergillus* sp. พบว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 6.5-7.0 และจะทำงานได้ดีขึ้นในสภาวะที่มี Ca^{2+}

ตารางที่ 4 13 ปริมาณผลผลิต เปอร์เซ็นต์กรด และค่ากรดของน้ำมันมะพร้าวที่ปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลโดยเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับพีเอชต่าง ๆ

ระดับค่าพีเอชของปฏิกิริยา	%FFA	Acid value	%Yield
แบบปกติ ไม่เติมไลเปส	1.46±0.07^{c}	4.09±0.19^{c}	32.0±1 1^{a}
pH 5 0	38.99±0.68^{b}	109.18±1 90^{b}	27.2±1.0^{bc}
pH 5 5	41.84±1.53^{a}	117.14±4 28^{a}	26.7±1.0^{bc}
pH 6 0	42.17±1.77^{a}	118.06±4.94^{a}	28.7±2.3^{b}
pH 6 5	42.88±1.30^{a}	120.06±3.63^{a}	28.2±2 6^{bc}
pH 7 0	41.42±1.17^{a}	115.97±3.27^{a}	26.5±1 0^{c}

หมายเหตุ : เครื่องหมาย a, b และ c ในแต่ละสดมภ์ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT
ค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการนำผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยการเติมกลีเซอรอลระดับกลีเซอรอล 25 มก./1000 ก. และเร่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปส D ที่พีเอช 5.0-7.0 มาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ 1,1-diphenyl-2-picrydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity assay

พบว่า น้ำมันดัดแปลงมีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกัน คือ 42-44 mg/ml เมื่อเทียบกับน้ำมันมะพร้าวที่สกัดแบบปกติมีค่า IC_{50} เท่ากับ 110.21 mg/ml ดังแสดงในตารางที่ 4.14 ซึ่งแสดงให้ว่าน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยไลเปส D ที่ระดับพีเอชต่าง ๆ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการสกัดแบบปกติประมาณ 2 เท่า

ตารางที่ 4.14 สมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระของน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลโดยเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับพีเอชต่าง ๆ

หน่วย : %DPPH free radical scavenging activity

ระดับค่าพีเอชของปฏิกิริยา	ระดับความเข้มของน้ำมันมะพร้าว (mg/ml)			R^2	IC_{50} (mg/ml)
	20	100	200		
แบบปกติ ไม่เติมไลเปส	34.92	46.97	66.24	0.9953	110.21
pH 5.0	46.11	61.76	92.82	0.9847	43.06
pH 5.5	47.14	61.13	97.61	0.9652	43.33
pH 6.0	47.55	60.11	90.32	0.9714	42.00
pH 6.5	47.29	60.54	95.99	0.9631	43.61
pH 7.0	47.14	61.35	99.01	0.9639	43.35
Ascorbic acid	-	-	-	0.9997	6.32
BHA	-	-	-	0.9995	11.41

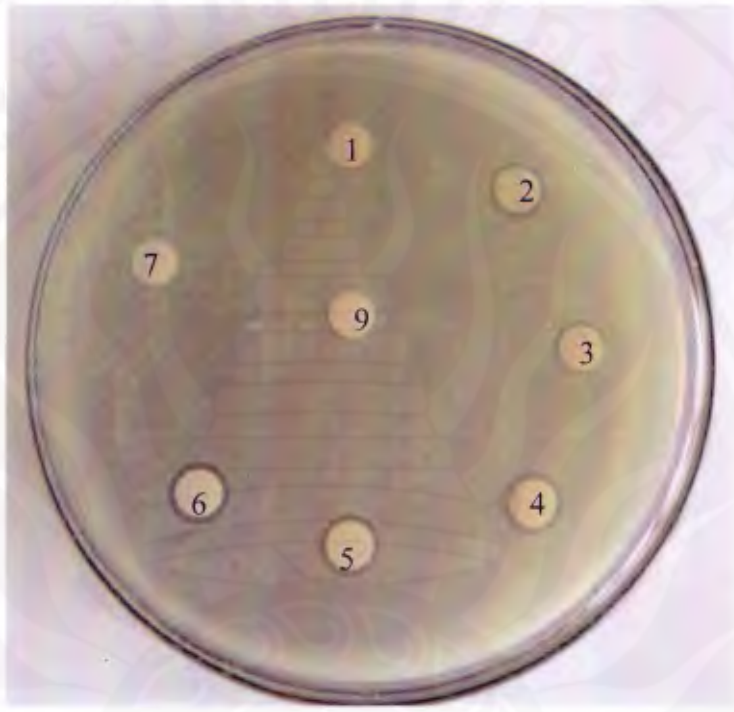
4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก พบว่า น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยการเติมกลีเซอรอล 25 มก./1000 ก. และเร่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปส D ที่พีเอช 5.0-7.0 มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ดี ในขณะที่ผลการทดสอบกับน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ น้ำมันดอกทานตะวัน และ DMSO 100% ไม่แสดงผลการยับยั้ง (ภาพที่ 4.14) น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยการเติมกลีเซอรอล 25 มก./ ก.ก. เร่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปส D ที่พีเอช 5.5-6.5 มีฤทธิ์การยับยั้งสูงสุด โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้เทียบเท่ากับผลการทดสอบกับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15% เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 12.5% เช่นเดียวกับการทดลองในตอนที่ผ่านมา ดังตารางที่ 4.15

ภาพที่ 4.14 วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่พีเอชต่าง ๆ

หมายเหตุ : 1=หมักแบบปกติ, 2= pH 5.0, 3= pH 5.5, 4= pH 6.0, 5= pH 6.5, 6= pH 7.0, 7=น้ำมันดอกทานตะวัน และ 8= DMSO

เมื่อทดสอบการยับยั้งกับเชื้อ *E. coli* พบว่า ให้ผลการทดสอบไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบที่ที่ผ่านมา คือ น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส D มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* ได้ ในขณะที่ผลการทดสอบกับน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ น้ำมันดอกทานตะวัน และ DMSO 100% ไม่แสดงผลการยับยั้ง (ภาพที่ 4.15) ผลการเติมกลีเซอรอล 25 มก./1000 ก. ในน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส D พีเอช 5.0-7.0 มีฤทธิ์การยับยั้ง *E. coli* ที่แตกต่างกัน โดยการปรับค่าพีเอชของเอนไซม์ไลเปส D เป็น 6.0-6.5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้สูงสุด คือเมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 12.5% จะมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *E. coli* เทียบเท่ากับผลการทดสอบกับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15% แต่หากเพิ่มค่าพีเอชสูงเป็น 7.0 หรือลดต่ำลงเหลือ 5.5 หรือต่ำกว่า จะมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *E. coli* เทียบเท่ากับผลการทดสอบกับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้นเพียง 10% (ตารางที่ 4.12)



ภาพที่ 4.15 วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่พีเอชต่าง ๆ

หมายเหตุ : 1=หมักแบบปกติ, 2= pH 5.0, 3= pH 5.5, 4= pH 6.0, 5= pH 6.5, 6= pH 7.0, 7=น้ำมันดอกทานตะวัน และ 8= DMSO

ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้นทั้งด้านปริมาณผลผลิตน้ำมันดัดแปลง คุณสมบัติด้านความกรด และสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทั้งด้านฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ผู้วิจัยจึงตัดสินใจคัดเลือกใช้เอนไซม์ไลเปส D ที่เตรียมในสารละลาย 1.0 M phosphate buffer พีเอช 6.0 เนื่องจากเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับครีม (ครีมมีพีเอช 6.3) ควบคู่กับการเติมกลีเซอรอลในปริมาณ 25 มก./ ก ก. เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4.15 ประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลด้วยการเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับพีเอชต่าง ๆ

หน่วย : phenol equivalent (%)

ระดับค่าพีเอชของปฏิกิริยา	ระดับความเข้มข้นของน้ำมันตัวอย่างที่ทดสอบ (%)			
	1.56	3.12	6.25	12.50
แบบปกติ ไม่เติมไลเปส	0	0	0	0
pH 5.0	5	5	10	10
pH 5 5	5	5	10	15
pH 6 0	5	5	15	15
pH 6 5	5	5	10	15
pH 7 0	5	5	10	10
DMSO 100%	0			
น้ำมันดอกทานตะวัน 100%	0			

หมายเหตุ : ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเมื่อเทียบกับผลการใช้สารละลายฟีนอล (phenol equivalent) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 15 และ 20%

ตารางที่ 4.16 ประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลด้วยการเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับพีเอชต่าง ๆ

หน่วย : phenol equivalent (%)

ระดับค่าพีเอชของปฏิกิริยา	ระดับความเข้มข้นของน้ำมันตัวอย่างที่ทดสอบ (%)			
	1.56	3.12	6.25	12.50
แบบปกติ ไม่เติมไลเปส	0	0	0	0
pH 5.0	5	5	10	10
pH 5.5	5	5	10	10
pH 6.0	5	5	15	15
pH 6.5	5	5	10	15
pH 7.0	5	5	10	10
DMSO 100%	0			
น้ำมันดอกทานตะวัน 100%	0			

หมายเหตุ : ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเมื่อเทียบกับผลการใช้สารละลายฟีนอล (phenol equivalent) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 15 และ 20%

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส D

ผลจากศึกษาโดยการเตรียมครีมด้วยการเติมกลีเซอรอลจำนวน 25 กรัมต่อกิโลกรัม เติมเอนไซม์ไลเปส D ที่เตรียมในสารละลายละลาย 1.0 M phosphate buffer พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรลงไป 10 มิลลิลิตร ชุดควบคุมไม่เติมเอนไซม์ กวนผสมเพื่อให้เอนไซม์เร่งการทำปฏิกิริยาในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปหมักแยกน้ำมันในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าปริมาณผลผลิตน้ำมันเทียบกับครีม ตักน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นออกและกรองแยกด้วยกระดาษทิชชู บรรจุในขวดพลาสติกใส ไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน ปิดฝา แล้ววัดค่า %FFA และค่ากรด ทดสอบคุณสมบัติฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ ได้ผลการทดลองดังนี้

1. ปริมาณผลผลิต

ผลการทดลอง พบว่า ผลการแปรอุณหภูมิการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส D พีเอช 6.0 ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดการแยกชั้นของน้ำมันหลังผ่านกระบวนการหมักแยกในทุกระดับอุณหภูมิที่ศึกษา ปริมาณผลผลิตของน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นและน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างที่แยกได้มีปริมาณที่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ผลการเติมกลีเซอรอล 25 มก./1000 ก.ของครีมและปรับค่าพีเอชของเอนไซม์เป็น 6.0 แล้วกวนทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30- 40 องศาเซลเซียส เพื่อเร่งปฏิกิริยาการดัดแปลงโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันก่อนหมักแยกให้ปริมาณผลผลิตของน้ำมันดัดแปลงสูงสุด (29.17-29.67 เปอร์เซ็นต์) เมื่ออุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเป็น 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณผลผลิตของน้ำมันจะลดลงอย่างแตกต่างกันทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4 17 ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fu, *et al.* (1995) ทดลองย่อยสลายน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันชนิดอื่น ๆ ด้วยเอนไซม์ไลเปสจาก *Aspergillus* sp. พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 37 °C

ตารางที่ 4.17 ปริมาณผลผลิต เปอร์เซ็นต์กรด และค่ากรดของน้ำมันมะพร้าวที่ปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลโดยเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิของปฏิกิริยาไลเปส	%FFA	Acid value	%Yıeld
แบบปกติ ไม่เติมไลเปส	1.55±0.07^{e}	4.35±0.20^{c}	31.67±1.21^{a}
30 °C	42 37±0.74^{d}	118.62±2.07^{d}	29.17±2.56^{b}
40 °C	44.17±0.72^{c}	123.66±2.03^{c}	29.67±2.58^{b}
50 °C	45 61±0.56^{b}	127.43±0 92^{b}	15.50±2.07^{c}
60 °C	49.21±0.48^{a}	137.88±1 20^{a}	4.67±0 52^{d}

หมายเหตุ : เครื่องหมาย a, b และ c ในแต่ละสดมภ์ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT
ค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ

2. ค่ากรด และ %FFA

ผลของการควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยาดัดแปลงโครงสร้างของน้ำมัน เมื่อนำน้ำมันที่สกัดได้ไปทดสอบวัดค่า %FFA และค่ากรดด้วยการไทเตรท พบว่า ค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรดมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเทียบน้ำมันมะพร้าวแบบปกติ ผลการเพิ่มอุณหภูมิของปฏิกิริยาเป็น 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่า มีผลแปรผันโดยตรงต่อการเพิ่ม %FFA จาก 42.37%, 44.17%, 45.61% และ 49.21% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.17

ตารางที่ 4.18 สมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระของน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลโดยเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ

หน่วย : %DPPH free radical scavenging activity

อุณหภูมิของปฏิกิริยาไลเปส	ระดับความเข้มของน้ำมันมะพร้าว (mg/ml)			r^2	IC_{50} (mg/ml)
	20	100	200		
แบบปกติ ไม่เติมไลเปส	34.92	46.97	66.24	0.9953	110.21
30 °C	37.55	60.11	100.32	0.9906	61.51
40 °C	38.20	59.98	101.48	0.9871	60.53
50 °C	39.54	60.43	102.65	0.9835	57.87
60 °C	41.45	62.11	103.26	0.9844	52.76
Ascorbic acid	-	-	-	0.9997	6.32
BHA	-	-	-	0.9995	11.41

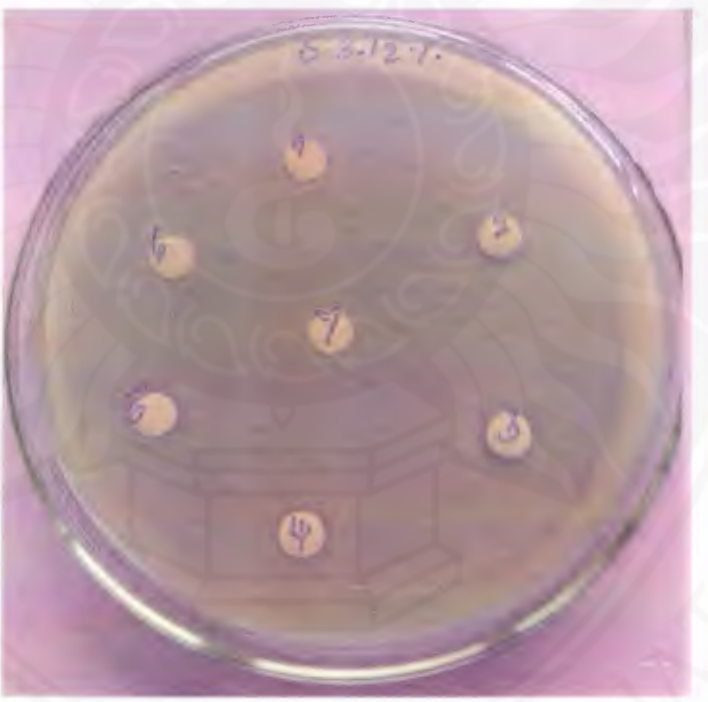
3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการนำผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้เอนไซม์ไลเปส D ที่พีเอช 6.0 เร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส มาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ 1,1-diphenyl-2-picrydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity assay พบว่า น้ำมันดัดแปลงทุกทรีทเมนต์มีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกัน คือ 52-62 mg/ml เมื่อเทียบกับน้ำมันมะพร้าวที่สกัดแบบปกติมีค่า IC_{50} เท่ากับ 110.21mg/ml ดังแสดงในตารางที่ 4.18 ซึ่งแสดงให้ว่าน้ำมันมะพร้าวที่

ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยไลเปส D ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการสกัดแบบปกติประมาณ 2 เท่า เช่นเดียวกับการทดลองที่ผ่าน ๆ มา

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก พบว่า น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ดี ในขณะที่ผลการทดสอบกับน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ น้ำมันดอกทานตะวัน และ DMSO 100% ไม่แสดงผลการยับยั้ง (ภาพที่ 4.16) น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยการเติมกลีเซอรอล 25 มก./ ก ก. เร่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปส D พีเอช 6.0 เร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์การยับยั้งสูงสุด โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้เทียบเท่ากับผลการทดสอบกับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15% เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 6.25-12.5% เช่นเดียวกับการทดลองในตอนที่ผ่านมา ดังแสดงในตารางที่ 4.19



ภาพที่ 4.16 วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

หมายเหตุ : 1=หมักแบบปกติ, 2= 30 °C, 3= 40 °C, 4= 50 °C, 5= 60 °C, 6=น้ำมันดอกทานตะวัน และ 7= DMSO

ตารางที่ 4.19 ประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลด้วยการเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ

หน่วย : phenol equivalent (%)

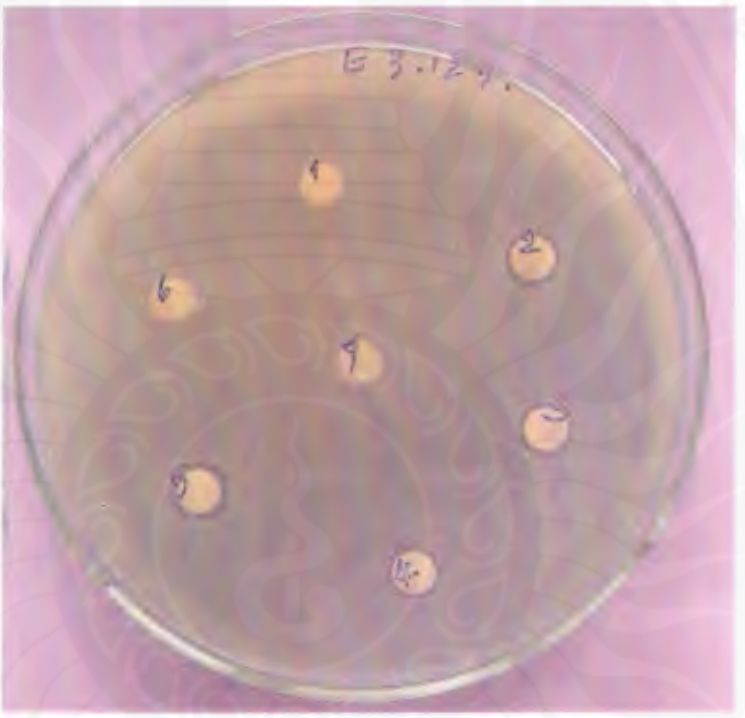
อุณหภูมิของปฏิกิริยาไลเปส	ระดับความเข้มข้นของน้ำมันตัวอย่างที่ทดสอบ (%)			
	1.56	3.12	6.25	12.50
แบบปกติ ไม่เติมไลเปส	0	0	0	0
30°C	5	5	10	10
40°C	10	10	15	15
50°C	10	10	15	15
60°C	5	5	10	10
DMSO 100%	0	0	0	0
น้ำมันดอกทานตะวัน	0	0	0	0

หมายเหตุ : ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเมื่อเทียบกับผลการใช้สารละลายฟีนอล (phenol equivalent) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 15 และ 20%

ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งกับเชื้อ *E. coli* พบว่า ให้ผลการทดสอบไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบที่ที่ผ่านมา คือ น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส D มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* ได้ ในขณะที่ผลการทดสอบกับน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ น้ำมันดอกทานตะวัน และ DMSO 100% ไม่แสดงผลการยับยั้ง (ภาพที่ 4.17) ผลการเติมกลีเซอรอล 25 มก./1000 ก. ในน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส D พีเอช 6.0 ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 4 ระดับ มีฤทธิ์การยับยั้ง *E. coli* ที่แตกต่างกัน โดยการเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้สูงสุด เช่นเดียวกับการทดสอบกับ เชื้อ *S. aureus* คือ เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 6.25-12.5% จะมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *E. coli* เทียบเท่ากับผลการทดสอบกับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15% แต่หากเพิ่มค่าอุณหภูมิสูงเป็น 60 องศาเซลเซียส หรือลดต่ำลงเหลือ 30 องศาเซลเซียส จะมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *E. coli* ลดลงเทียบเท่ากับผลการทดสอบกับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้นเพียง 10% (ตารางที่ 4.20)

ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้นเมื่อพิจารณาทั้งด้านปริมาณผลผลิตของน้ำมันดัดแปลง คุณสมบัติด้านความกรด และสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทั้งด้านฤทธิ์การต้านอนุมูล

อิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ผู้วิจัยจึงตัดสินใจคัดเลือกใช้เอนไซม์ไลเปส D ที่เตรียมในสารละลาย 1.0 M phosphate buffer พีเอช 6.0 เนื่องจากเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับครีม (ครีมมีพีเอช 6.3) ควบคู่กับการเติมกลีเซอรอลในปริมาณ 25 มก./ ก.ก. และคนเร่งปฏิกิริยาในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส หรือเลือกใช้อุณหภูมิห้องเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากเป็นสภาวะที่ควบคุมง่าย ต้นทุนต่ำ และได้ปริมาณผลผลิตสูง โดยที่สมบัติการออกฤทธิ์ต่าง ๆ ไม่แตกต่างกันมากนัก



ภาพที่ 4.17 วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

หมายเหตุ : 1=หมักแบบปกติ, 2= 30 °C, 3= 40 °C, 4= 50 °C, 5= 60 °C, 6=น้ำมันดอกทานตะวัน และ 7= DMSO

ตารางที่ 4.20 ประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลด้วยการเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ

หน่วย : phenol equivalent (%)

อุณหภูมิของปฏิกิริยาไลเปส	ระดับความเข้มข้นของน้ำมันตัวอย่างที่ทดสอบ (%)			
	1.56	3.12	6.25	12.50
แบบปกติ ไม่เติมไลเปส	0	0	0	0
30°C	5	10	10	10
40°C	10	10	15	15
50°C	10	10	15	15
60°C	5	10	10	10
DMSO 100%	0	0	0	0
น้ำมันดอกทานตะวัน	0	0	0	0

หมายเหตุ : ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเมื่อเทียบกับผลการใช้สารละลายฟีนอล (phenol equivalent) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 15 และ 20%

ความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส D ที่เหมาะสม

ผลจากศึกษาโดยการเตรียมครีมด้วยการเติมกลีเซอรอลจำนวน 25 กรัมต่อกิโลกรัม เติมเอนไซม์ไลเปส D ที่เตรียมในสารละลายละลาย 1.0 M phosphate buffer พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 กรัมต่อลิตรลงไป 10 มิลลิลิตร โดยชุดควบคุมไม่เติมเอนไซม์ กวนผสมเพื่อให้เอนไซม์เร่งการทำปฏิกิริยาในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียสความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปหมักแยกน้ำมันในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าปริมาณผลผลิตน้ำมันเทียบกับครีม ตักน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นออกและกรองแยกด้วยกระดาษทิชชู บรรจุในขวดพลาสติกใส ไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน ปิดฝาแล้ววัดค่า %FFA และค่ากรด ทดสอบคุณสมบัติฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ ได้ผลการทดลองดังนี้

1. ปริมาณผลผลิต

ผลการทดลอง พบว่า ผลการแปรระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส D 0.5-2.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เร่งปฏิกิริยาที่พีเอช 6.0 ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดการแยกชั้นของน้ำมันหลังผ่านกระบวนการหมักแยกในทุกระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ศึกษา ปริมาณผลผลิตของน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างที่แยกได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) คือมีค่าเท่ากับ 26.7-28.8 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณผลผลิตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ ดังแสดงในตารางที่ 4.21 แต่อย่างไรก็ตามผลผลิตจะต่ำกว่าและแตกต่างกันทางสถิติกับการหมักแบบปกติ เหมือนกับการทดลองที่ผ่าน ๆ มา

2. ค่ากรด และ %FFA

ผลของการแปรระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ทำปฏิกิริยาดัดแปลงโครงสร้างของน้ำมัน เมื่อนำน้ำมันที่สกัดได้ไปทดสอบวัดค่า %FFA และค่ากรดด้วยการไทเตรท พบว่า ค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรดมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P\leq0.05$) การใช้เอนไซม์ไลเปสที่ระดับความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จะให้ค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรดต่ำสุด ซึ่งสามารถสังเกตได้จากความแตกต่างของสีและความขุ่นของผลิตภัณฑ์ ดังภาพที่ 4.18 แต่เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสในช่วง 1.0-2.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร พบว่า ค่า %FFA และค่ากรดจะสูงขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติดังแสดงในตารางที่ 4.21

ภาพที่ 4.18 ลักษณะของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยเติมกลีเซอรอล และเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 4.21 ปริมาณผลผลิต เปอร์เซ็นต์กรด และค่ากรดของน้ำมันมะพร้าวที่ปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลโดยเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของเอนไซม์ (กรัม/100 มล.)	%FFA	Acid value	%Yield
แบบปกติ ไม่เติมไลเปส	0.44 ± 0.21^{c}	1.24 ± 0.58^{c}	35.5 ± 0.5^{a}
0.5	37.82 ± 0.17^{b}	105.89 ± 0.47^{b}	26.7 ± 0.8^{b}
1.0	43.20 ± 1.24^{a}	120.96 ± 3.48^{a}	27.7 ± 2.3^{b}
1.5	43.28 ± 1.70^{a}	121.18 ± 4.75^{a}	28.8 ± 2.4^{b}
2.0	43.30 ± 1.27^{a}	121.24 ± 3.56^{a}	28.2 ± 2.6^{b}
2.5	43.65 ± 1.60^{a}	$122.21\pm4\ 49^{a}$	28.8 ± 1.3^{b}

หมายเหตุ : เครื่องหมาย a, b และ c ในแต่ละสดมภ์ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$) โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT
ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการนำผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้เอนไซม์ไลเปส D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พีเอช 6.0 เร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส มาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ 1,1-diphenyl-2-picrydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity assay พบว่าน้ำมันดัดแปลงทุกทรีทเมนต์มีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกัน คือ 50-60 mg/ml เมื่อเทียบกับน้ำมันมะพร้าวที่สกัดแบบปกติมีค่า IC_{50} เท่ากับ 114.05 mg/ml ดังแสดงในตารางที่ 4.18 ซึ่งแสดงให้ว่าน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยไลเปส D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการสกัดแบบปกติประมาณ 2 เท่า เช่นเดียวกับการทดลองที่ผ่าน ๆ มา

ตารางที่ 4.22 สมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระของน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลโดยเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

หน่วย : %DPPH free radical scavenging activity

ความเข้มข้นของเอนไซม์ (กรัม/100 มล.)	ระดับความเข้มของน้ำมันมะพร้าว (mg/ml)			r^2	IC_{50} (mg/ml)
	20	100	200		
แบบปกติ ไม่เติมไลเปส	32.92	45.67	67.15	0.9933	114.05
0.5	39.92	63.32	109.74	0.9847	53.80
1.0	37.55	60.11	110.32	0.9771	60.41
1.5	41.10	59.12	111.48	0.9563	57.05
2.0	41.54	63.35	104.98	0.9870	51.19
2.5	42.05	63.48	107.31	0.9828	50.36
Ascorbic acid	-	-	-	0.9997	6.32
BHA	-	-	-	0.9995	11.41

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

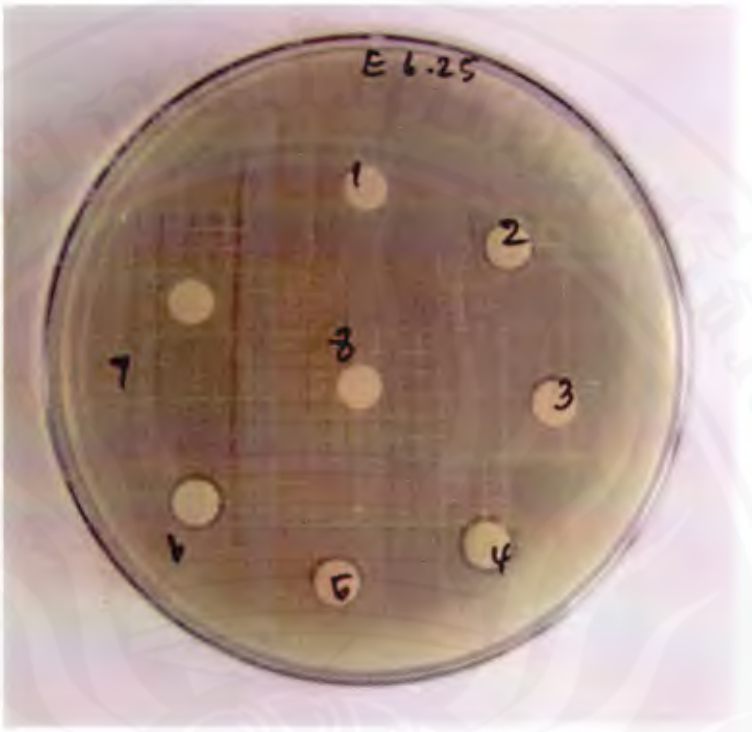
ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก พบว่า น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ดี ในขณะที่ผลการทดสอบกับน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ น้ำมันดอกทานตะวัน และ DMSO 100% ไม่แสดงผลการยับยั้ง (ภาพที่ 4.19) น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยการเติมกลีเซอรอล 25 มก./ ก.ก. เร่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปส D ความเข้นข้น 1.0-2.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร พีเอช 6.0 เร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์การยับยั้งสูงสุด โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้เทียบเท่ากับผลการทดสอบกับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15% เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 6.25-12.5% เช่นเดียวกับการทดลองในตอนที่ผ่านมา ดังแสดงในตารางที่ 4.23

ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งกับเชื้อ *E. coli* พบว่า ให้ผลการทดสอบไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบที่ที่ผ่านมา (ภาพที่ 4.20) ผลการเติมกลีเซอรอล 25 มก./1000 ก. ในน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส D ความเข้มข้น 0.5-2.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ระดับพีเอช 6.0 อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์การยับยั้ง *E. coli* ที่แตกต่างกัน โดยผลการใช้ปริมาณเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาที่ระดับความเข้มข้น 1.0-2.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้สูงสุด และไม่แตกต่างกันทางสถิติเช่นเดียวกับการทดสอบกับ เชื้อ *S. aureus* กล่าวคือ เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 6.25-12.5% จะมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *E. coli* เทียบเท่ากับผลการทดสอบกับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15% แต่หากลดปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ลงเหลือ 0.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *E. coli* ลดลงเทียบเท่ากับผลการทดสอบกับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้นเพียง 10% (ตารางที่ 4.24)

ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้นเมื่อพิจารณาทั้งด้านปริมาณผลผลิตของน้ำมันดัดแปลง คุณสมบัติด้านความกรด และสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทั้งด้านฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ผู้วิจัยจึงตัดสินใจคัดเลือกใช้เอนไซม์ไลเปส D ที่เตรียมในสารละลาย 1.0 M phosphate buffer ระดับความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร พีเอช 6.0 ควบคู่กับการเติมกลีเซอรอลในปริมาณ 25 มก./ ก.ก. และคนเร่งปฏิกิริยาในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส หรือเลือกใช้อุณหภูมิห้องเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากเป็นสภาวะที่ควบคุมง่าย ต้นทุนต่ำ และได้ปริมาณผลผลิตสูง โดยที่สมบัติการออกฤทธิ์ต่าง ๆ ไม่แตกต่างกันมากนัก

ภาพที่ 4.19 วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ : 1=หมักแบบปกติ, 2=0.5, 3=1 0, 4=1.5, 5=2.0, 6=2.5 กรัม/100 มล
7=น้ำมันดอกทานตะวัน และ 8= DMSO



ภาพที่ 4.20 วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ : 1=หมักแบบปกติ, 2=0.5, 3=1.0, 4=1.5, 5=2.0, 6=2.5 กรัม/100 มล.
7=น้ำมันดอกทานตะวัน และ 8= DMSO

ตารางที่ 4.23 ประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลด้วยการเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

หน่วย : phenol equivalent (%)

ความเข้มข้นของเอนไซม์ (กรัม/100 มล.)	ระดับความเข้มข้นของน้ำมันตัวอย่างที่ทดสอบ (%)			
	1.56	3.12	6.25	12.50
แบบปกติ ไม่เติมไลเปส	0	0	0	0
0.5	5	5	10	10
1.0	5	5	15	15
1.5	5	15	15	15
2.0	5	15	15	15
2.5	10	15	15	15
DMSO 100%	0	0	0	0
น้ำมันดอกทานตะวัน	0	0	0	0

หมายเหตุ : ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเมื่อเทียบกับผลการใช้สารละลายฟีนอล (phenol equivalent) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 15 และ 20%

ตารางที่ 4.24 ประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลด้วยการเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

หน่วย : phenol equivalent (%)

ความเข้มข้นของเอนไซม์ (กรัม/100 มล.)	ระดับความเข้มข้นของน้ำมันตัวอย่างที่ทดสอบ (%)			
	1.56	3.12	6.25	12.50
แบบปกติ ไม่เติมไลเปส	0	0	0	0
0.5	5	5	10	10
1.0	5	10	15	15
1.5	5	15	15	15
2.0	5	15	15	15
2.5	5	15	15	15
DMSO 100%	0	0	0	0
น้ำมันดอกทานตะวัน	0	0	0	0

หมายเหตุ : ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเมื่อเทียบกับผลการใช้สารละลายฟีนอล (phenol equivalent) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 15 และ 20%

ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส D

ผลจากศึกษาโดยการเตรียมครีมด้วยการเติมกลีเซอรอลจำนวน 25 กรัมต่อกิโลกรัม เติมเอนไซม์ไลเปส D ที่เตรียมในสารละลายละลาย 1.0 M phosphate buffer พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรลงไป 10 มิลลิลิตร โดยชุดควบคุมไม่เติมเอนไซม์ กวนผสมเพื่อให้เอนไซม์เร่งการทำปฏิกิริยาในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียสความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที ด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกัน คือ 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที จากนั้นนำไปหมักแยกน้ำมันในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าปริมาณผลผลิตน้ำมันเทียบกับครีม ตักน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นออกและกรองแยกด้วยกระดาษทิชชู บรรจุในขวดพลาสติกใส ไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน ปิดฝา แล้ววัดค่า %FFA และค่ากรด ทดสอบคุณสมบัติฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ ได้ผลการทดลองดังนี้

1. ปริมาณผลผลิต

ผลการทดลอง พบว่า ผลการแปรระยะเวลาในการเร่งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส D เข้มข้น 1.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร พีเอช 6.0 ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดการแยกชั้นของน้ำมันหลังผ่านกระบวนการหมักแยกในทุกระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ศึกษา ดังภาพที่ 4.21 ปริมาณผลผลิตของน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างที่แยกได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) คือมีค่าเท่ากับ 30.50-33.33 เปอร์เซ็นต์ กล่าวคือ เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเร่งปฏิกิริยาปริมาณผลผลิตก็ไม่ได้เพิ่มสูงขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.25 และผลผลิตจะต่ำกว่าและแตกต่างกันทางสถิติกับการหมักแบบปกติ เหมือนกับการทดลองที่ผ่าน ๆ มา

2. ค่ากรด และ %FFA

ผลการแปรระยะเวลาในการเร่งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส D เพื่อดัดแปลงโครงสร้างของน้ำมัน เมื่อนำน้ำมันที่สกัดได้ไปทดสอบวัดค่า %FFA และค่ากรดด้วยการไทเตรท พบว่า ค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรดมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P\leq0.05$) การใช้ระยะเวลาในการเร่งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ระดับความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที จะให้ค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรดต่ำสุด แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาเป็น 30, 40, 50 และ 60 นาที พบว่า ค่า %FFA และค่ากรดจะสูงขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าประมาณ 43% และ 121 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.25

ภาพที่ 4.21 ลักษณะของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยเติมกลีเซอรอล และเอนไซม์ไลเปส D ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

ตารางที่ 4.25 ปริมาณผลผลิต เปอร์เซ็นต์กรด และค่ากรดของน้ำมันมะพร้าวที่ปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลโดยเอนไซม์ไลเปส D ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ (นาที)	%FFA	Acid value	%Yield
แบบปกติ ไม่เติมไลเปส	1.64 ± 0.49^{c}	4.60 ± 1.39^{c}	37.50 ± 2.74^{a}
20	36.68 ± 1.10^{b}	102.69 ± 3.07^{b}	31.50 ± 3.39^{b}
30	43.57 ± 0.93^{a}	122.00 ± 2.60^{a}	33.33 ± 1.86^{b}
40	43.28 ± 1.70^{a}	121.18 ± 4.75^{a}	32.00 ± 2.10^{b}
50	43.30 ± 1.27^{a}	121.24 ± 3.56^{a}	30.50 ± 2.88^{b}
60	43.09 ± 1.27^{a}	120.64 ± 3.55^{a}	31.17 ± 2.04^{b}

หมายเหตุ : เครื่องหมาย a, b และ c ในแต่ละสดมภ์ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$) โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT
ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการนำผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้เอนไซม์ไลเปส D ที่ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร พีเอช 6.0 เร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่าง ๆ มาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ 1,1-diphenyl-2-picrydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity assay พบว่า น้ำมันดัดแปลงทุกทรีทเมนต์มีค่า IC_{50} ที่ไม่แตกต่างกันมากนัก คือ 47-67 mg/ml เมื่อเทียบกับน้ำมันมะพร้าวปกติมีค่า IC_{50} เท่ากับ 106.31 mg/ml ดังแสดงในตารางที่ 4.26 ซึ่งแสดงให้ว่าน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยไลเปส D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการสกัดแบบปกติประมาณ 2 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่มระยะเวลาในการเร่งปฏิกิริยามีผลต่อการเพิ่มค่า IC_{50} ได้เล็กน้อย

ตารางที่ 4.26 สมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระของน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลโดยเอนไซม์ไลเปส D ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

หน่วย : %DPPH free radical scavenging activity

ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ (นาที)	ระดับความเข้มของน้ำมันมะพร้าว (mg/ml)			r^2	IC_{50} (mg/ml)
	20	100	200		
แบบปกติ ไม่เติมไลเปส	37.62	45.90	66.66	0.9682	106.31
20	38.64	59.13	96.37	0.9896	61.56
30	38.70	55.77	92.13	0.9801	66.75
40	39.78	59.20	99.73	0.9815	59.23
50	40.48	62.88	104.43	0.9886	53.43
60	41.30	68.27	113.91	0.9931	46.68
Ascorbic acid	-	-	-	0.9997	6.32
BHA	-	-	-	0.9995	11.41

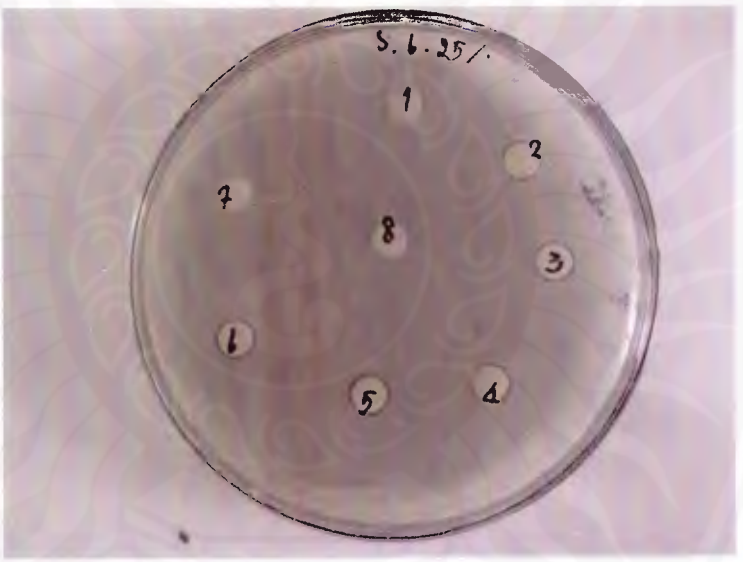
4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก พบว่า น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ดีมาก ในขณะที่ผลการทดสอบกับน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ น้ำมันดอกทานตะวัน และ DMSO 100% ไม่แสดงผลการยับยั้ง (ภาพที่ 4.22) น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยการเติมกลีเซอรอล 25 มก./ ก.ก. เร่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปส D ความเข้นข้น 1.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร พีเอช 6.0 เร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ไม่แตกต่างกัน โดยเมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 6.25% มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15% แสดงในตารางที่ 4.27

ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งกับเชื้อ *E. coli* พบว่า ให้ผลการทดสอบไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบที่ที่ผ่านมา (ภาพที่ 4.23) ผลการเติมกลีเซอรอล 25 มก./1000 ก. ในน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส D ความเข้นข้น 1.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ระดับพีเอช 6.0 อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลานานต่างกัน 20-60 นาที มีฤทธิ์การยับยั้ง *E. coli* ที่ไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับการทดสอบกับ เชื้อ *S. aureus* กล่าวคือ เมื่อเจือจางด้วย

DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 6.25% จะมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *E. coli* เทียบเท่ากับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15% ดังแสดงในตารางที่ 4.28

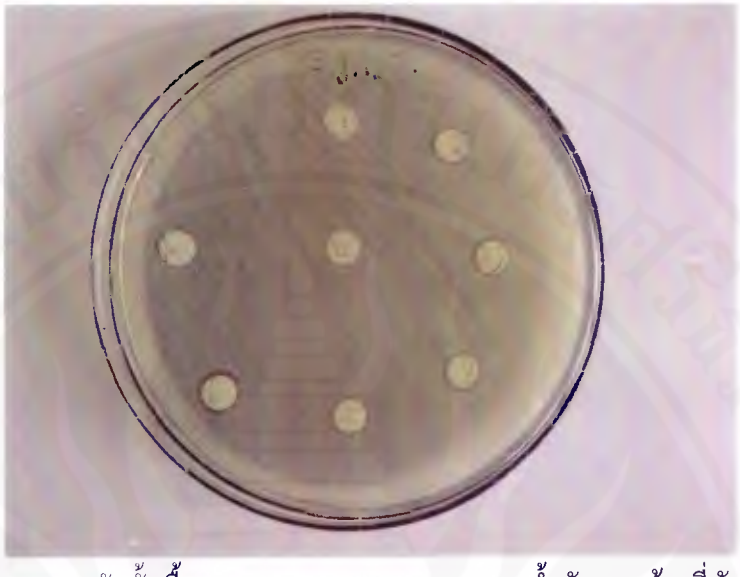
ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้นเมื่อพิจารณาทั้งด้านปริมาณผลผลิตของน้ำมันดัดแปลง คุณสมบัติด้านความกรด และสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทั้งด้านฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ผู้วิจัยจึงตัดสินใจคัดเลือกใช้เอนไซม์ไลเปส D ที่เตรียมในสารละลาย 1.0 M phosphate buffer ระดับความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร พีเอช 6.0 ควบคู่กับการเติมกลีเซอรอลในปริมาณ 25 มก./ ก.ก. และคนเร่งปฏิกิริยาในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้าง เพื่อนำผลิตภัณฑ์ไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 4.22 วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

หมายเหตุ : 1=หมักแบบปกติ, 2=20, 3=30, 4=40, 5=50, 6=60 นาที

7=น้ำมันดอกทานตะวัน และ 8= DMSO



ภาพที่ 4.23 วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* บนอาหาร MHA ของน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปส D ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

หมายเหตุ : 1=หมักแบบปกติ, 2=20, 3=30, 4=40, 5=50, 6=60 นาที
7=น้ำมันดอกทานตะวัน และ 8= DMSO

ตารางที่ 4.27 ประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลโดยเอนไซม์ไลเปส D ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

หน่วย : phenol equivalent (%)

ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ (นาที)	ระดับความเข้มข้นของน้ำมันตัวอย่างที่ทดสอบ (%)			
	1.56	3.12	6.25	12 50
แบบปกติ ไม่เติมไลเปส	0	0	0	0
20	5	10	15	15
30	5	10	15	15
40	5	10	15	15
50	5	10	15	15
60	10	15	15	15
DMSO 100%	0	0	0	0
น้ำมันดอกทานตะวัน	0	0	0	0

หมายเหตุ : ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเมื่อเทียบกับผลการใช้สารละลายฟีนอล (phenol equivalent) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 15 และ 20%

ตารางที่ 4.28 ประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของน้ำมันมะพร้าวที่แยกได้หลังปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลโดยเอนไซม์ไลเปส D ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

หน่วย : phenol equivalent (%)

ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ (นาที)	ระดับความเข้มข้นของน้ำมันตัวอย่างที่ทดสอบ (%)			
	1.56	3.12	6.25	12.50
แบบปกติ ไม่เติมไลเปส	0	0	0	0
20	5	10	15	15
30	5	10	15	15
40	5	10	15	15
50	5	10	15	15
60	5	10	15	15
DMSO 100%	0	0	0	0
น้ำมันดอกทานตะวัน	0	0	0	0

หมายเหตุ : ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเมื่อเทียบกับผลการใช้สารละลายฟีนอล (phenol equivalent) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 15 และ 20%

ผลศึกษาการเปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษา

ผลการศึกษาการกำจัดความชื้นด้วยวิธีการอังน้ำมันตัวอย่างในอ่างน้ำร้อน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อคุณภาพในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงที่บรรจุในขวดแก้วสีเขียวไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วปิดด้วยฝาเกลียว เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 เดือน แล้วทดสอบค่าคุณภาพต่าง ๆ ของน้ำมันตัวอย่าง ดังแสดงผลในตารางที่ 4.29 พบว่า การกำจัดความชื้นด้วยวิธีการอังน้ำมันตัวอย่างในอ่างน้ำร้อน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สามารถขจัดความชื้นได้ดีจึงทำให้ผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์สกัดเย็นและน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงมีปริมาณความชื้นลดต่ำลงตามเกณฑ์มาตรฐานคือมีค่าในช่วง 0.11-0.15% (มาตรฐาน มผช. 670/2547 กำหนดให้ไม่เกิน 0.2%) และมีค่าซาพอนิฟิเคชัน (SN) ที่ไม่แตกต่างกันคือมีค่าอยู่ในช่วง 248-258 มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซต่อน้ำมัน 1 กรัม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Marina, *et al.*, (2009, 301-307) พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 250-261 ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดมาตรฐาน อย. ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 57 (พ.ศ.2524) ที่กำหนดให้ SN มีค่าอยู่ในช่วง 248-265

ผลการวัดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของน้ำมันอันเนื่องมาจากการย่อยสลายกรดไขมันในระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า น้ำมันตัวอย่างมีแนวโน้มเกิดการย่อยสลายกรดไขมันเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระ (%FFA) วัดในรูปกรดลอริกเพิ่มขึ้นในน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงจากปริมาณเริ่มต้น 43 57±0 93% เพิ่มเป็น 44 14±0.85% ซึ่งจากรายงานวิจัยของ Marina, *et al*., (2009, 301-307) พบว่า น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มีค่าในช่วง 0.13-0.25% แต่สำหรับน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงมีค่าเพิ่มขึ้นสูงมาก ซึ่งเกินมาตรฐาน มผช. 670/2547 ที่กำหนดให้เท่ากับ 0.5-1.5% ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงมีโอกาสหืนได้สูงกว่า

ผลการวัดกลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยค่าเพอร์ออกไซด์ (PV) Anisidine value (AnV) และ Totox ในระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงมีแนวโน้มในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงมีค่าเพอร์ออกไซด์เริ่มต้นจาก 3 74±0 96 เพิ่มขึ้นเป็น 4.43±0.54 มิลลิกรัมสมมูลเพอร์ออกไซด์ออกซิเจนต่อกิโลกรัมน้ำมัน (มาตรฐาน อย. กำหนดให้ไม่เกิน 10) จากนั้นค่อย ๆ เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบลูกโซ่ต่อเนื่อง ดังนั้นเมื่อวัดค่า Anisidine value พบว่า มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 0.22±0 16 เป็น 0.25±0.05 เมื่อคำนวณในรูปของค่า Totox พบว่า น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงมีค่า Totox สูงเท่ากับ 9.11±1 02 ในขณะที่น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มีค่าเท่ากับ 3.71±0 80 จากรายงานวิจัย Marina, *et al*., (2009, 301-307) พบว่า ค่า Anisidine value ของน้ำมันมะพร้าวในช่วงค่าไม่เกิน 0.50 จัดอยู่ในกลุ่มน้ำมันที่มีคุณภาพดี ดังนั้นน้ำมันดัดแปลงจึงมีแนวโน้มที่จะเกิดกลิ่นหืนได้ ดังนั้นควรเก็บรักษาน้ำมันไม่ให้สัมผัสกับปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ ได้แก่ ความชื้น แสง และโลหะบางชนิด

ตารางที่ 4.29 สมบัติของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์และน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้าง หลังเก็บรักษานาน 2 เดือน

ตัวอย่าง	%MC	SN	AV	%FFA	PV	AnV	Totox
น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์	0.12	258	0.66	0.19	0.25	0.07	1.16
ก่อนเก็บรักษา	±0.01	±1.5	±0.04	±0.06	±0.11	±0.04	±0.25
น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์	0.11	258	0.76	0.22	1.48	0.22	3.71
หลังเก็บ 2 เดือน	±0.00	±1.5	±0.09	±0.06	±0.37	±0.08	±0.80
น้ำมันดัดแปลง	0.15	249	122.00	43.57	3.74	0.22	7.70
ก่อนเก็บรักษา	±0.02	±2.4	±2.60	±0.93	±0.96	±0.16	±1.90
น้ำมันดัดแปลง	0.16	248	123.60	44.14	4.43	0.25	9.11
หลังเก็บ 2 เดือน	±0.01	±1.2	±2.37	±0.85	±0.54	±0.05	±1.02
ค่ามาตรฐานอ้างอิง	<0.2	248-265	<4	0.5-1.5%	<10	-	-

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

%MC = น้ำและสิ่งที่ระเหยได้ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส (%) ตามมาตรฐาน มผช. 670/2547

PV = ค่าเพอร์ออกไซด์ (มิลลิกรัมสมมูลเพอร์ออกไซด์ออกซิเจนต่อกิโลกรัม) ตามมาตรฐาน อย. ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 57 (พ.ศ. 2524)

AV = ค่ากรด (มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัม) ตามมาตรฐาน มผช. 670/2547

%FFA = เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระในรูปกรดลอริก (%) ตามมาตรฐาน มผช. 670/2547

SN = ค่าซาพอนิฟิเคชัน (มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซต่อน้ำมัน 1 กรัม) ตามมาตรฐาน อย. ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 57 (พ.ศ. 2524)

AnV = Anisidine value

การผลิตเจลโลชั่นแต้มสิว

ผลการนำน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างข้างต้นมาทดลองผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิว จำนวน 4 สูตร คือ สูตรน้ำมันดัดแปลงโครงสร้าง (MO) สูตรน้ำมันดัดแปลงผสมกรดซาลิซิลิก (MOS) สูตรน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ (VCO) และ สูตรน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ผสมกรดซาลิซิลิก (VCOS) โดยมีน้ำมันเป็นส่วนผสม 25-27% จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทดสอบลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ค่าพีเอช ความใส ฟองอากาศ ความเหนอะหนะเมื่อทา ความเนียน และความข้นหนืด รวมทั้งคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อ เป็นต้น และทำการสำรวจความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์ โดยให้อาสาสมัครทั้งหมด 10 คน ได้ผลดังนี้

ภาพที่ 4.24 ผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิวสูตรต่าง ๆ

1. ลักษณะทางกายภาพ

ผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิวทั้ง 4 สูตร มีลักษณะปรากฏเป็นเนื้อเจลสีขาวนวล ดังแสดงในภาพที่ 4.24 มีค่าพีเอชแตกต่างกัน โดยสูตรที่ใช้น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างร่วมกับกรดซาลิซิลิกมีค่าพีเอชต่ำสุดเท่ากับ 3.91ขณะที่สูตรน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มีค่าพีเอชเท่ากับ 5.34 สูตรที่ใช้น้ำมันดัดแปลงโครงสร้างจะมีฟองอากาศน้อยกว่า เนื้อเจลมีความข้นหนืดที่ดี เมื่อทาที่ผิวหน้าพบว่าเนื้อเจลมีความเนียนและไม่เหนียวเหนอะ เมื่อเทียบกับสูตรที่ใช้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.30

ตารางที่ 4.30 ลักษณะทางกายภาพของเจลโลชั่นแต้มสิวที่ผลิตจากน้ำมันมะพร้าวดัดแปลง

ลักษณะทางกายภาพ	สูตรเจลโลชั่นแต้มสิว			
	MO	**MOS**	**VCO**	**VCOS**
pH	4.22	3.91	5.34	4.12
ความใส	+2	+2	+2	+2
ฟองอากาศ	+2	+2	+3	+4
ความเหนียวเหนอะเมื่อทา	+1	+1	+2	+2
ความเนียนเมื่อทา	+4	+4	+3	+3
ความข้นหนืด	+4	+4	+3	+3

หมายเหตุ:

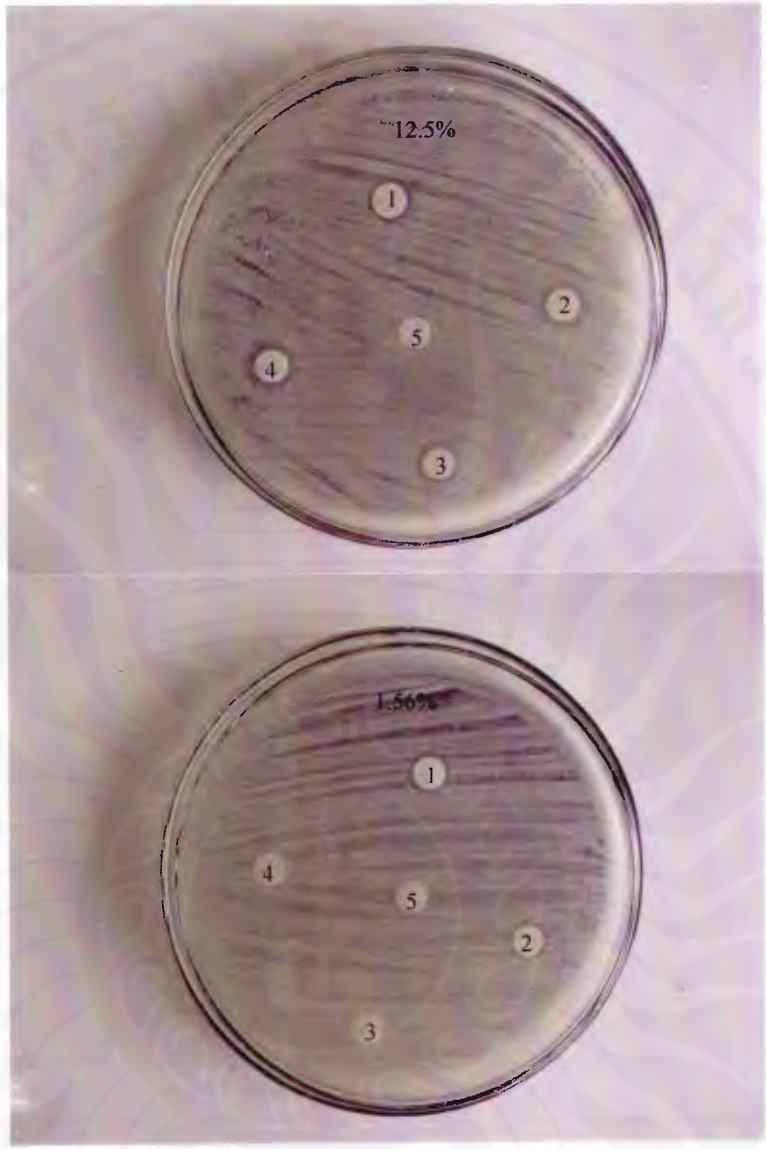
ความใส: +4= ใสมาก; +3= ใสปานกลาง; +2= ใสน้อย; +1= ขุ่นทึบ

ฟองอากาศ: +4= ฟองมาก; +3= ฟองปานกลาง; +2= ฟองน้อย; +1= ไม่มีฟองอากาศ

ความเหนอะหนะเมื่อทา: +4=เหนอะหนะมาก; +3= เหนอะหนะปานกลาง; +2= เหนอะหนะน้อย; +1= ไม่เหนอะหนะ

ความเนียนเมื่อทา: +4=เรียบเนียนมาก; +3= เรียบเนียนปานกลาง; +2= เรียบเนียนน้อย; +1= ไม่เรียบเนียน

ความข้นหนืด: +4=ข้นหนืดมาก; +3= ข้นหนืดปานกลาง; +2= ข้นหนืดน้อย; +1= เหลว



ภาพที่ 4.25 วงแหวนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* บนอาหาร MHA ของผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิว
หมายเหตุ : 1=น้ำมันดัดแปลง, 2=น้ำมันดัดแปลงผสมกรดซาลิซิลิก, 3=น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์, 4=น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ผสมกรดซาลิซิลิก และ 5= DMSO

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มที่ก่อให้เกิดสิวและหนอง พบว่า เจลโลชั่นแต้มสิวสูตรที่ใช้น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S aureus* ได้สูงกว่าเมื่อเทียบกับสูตรที่ใช้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้น 12.50% พบว่า เจลแต้มสิวทุกสูตรมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารฟีนอล

ที่ระดับความเข้มข้น 15% แต่เมื่อเจือจางให้ความเข้มข้นต่ำลงถึง 3.12% พบว่า เจลแต้มสิวสูตรน้ำมันดัดแปลงโครงสร้างมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 5% ในขณะที่สูตรที่ใช้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ไม่แสดงผลการยับยั้ง ดังแสดงในภาพที่ 4.25 และตารางที่ 4.31 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเจลโลชั่นแต้มสิวสูตรที่ใช้น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้โดยไม่ต้องใช้กรดซาลิซิลิก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Tangwatcharin & Khopaibool (2012, 969-985) ที่แสดงให้เห็นว่าการใช้กรดลอริกและโมโนลอรินทำงานร่วมกับกรดแลกติกจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้สูง ในขณะที่ผลการใช้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ไม่แสดงผลการยับยั้ง และจากงานวิจัยของ Luo, *et al.*, (2014, 448-494) ศึกษาผลของ monolaurin ที่สกัดได้จากผลของ camphor tree พบว่า สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรค ได้แก่ *S. cerevisiae, A. niger* และ *P. glaucum* ได้ดีกว่าผลการใช้ Potassium sorbate และ Sodium benzoate โดยมีค่า MIC และ MBC สูงกว่า 10-100 เท่า

ตารางที่ 4.31 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิว

หน่วย : phenol equivalent (%)

สูตรเจลโลชั่นแต้มสิว	ความเข้มข้นของน้ำมันตัวอย่างที่ทดสอบ (%)			
	1.56	3.12	6.25	12.50
น้ำมันดัดแปลงโครงสร้าง (MO)	5	5	10	15
น้ำมันดัดแปลงผสมกรดซาลิซิลิก (MOS)	5	5	10	15
น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ (VCO)	0	0	5	15
น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ผสมกรดซาลิซิลิก (VCOS)	0	0	5	15
DMSO 100%	0	0	0	0

หมายเหตุ : ค่าประสิทธิภาพวงแหวนการยับยั้งเมื่อเทียบกับผลการใช้สารละลายฟีนอล (phenol equivalent) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 15 และ 20%

3. ผลทดสอบความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิวของอาสาสมัคร

ผลการทดสอบความพึงพอใจของอาสาสมัครต่อผลิตภัณฑ์เจลแต้มสิวจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์และน้ำมันมะพร้าวดัดแปลง จำนวน 4 สูตร โดยให้อาสาสมัครทั้งหมด 10 คน

ทดสอบผลิตภัณฑ์ดังกล่าวแล้วตอบแบบสอบถาม พบว่า อาสาสมัครมีความพึงพอใจต่อลักษณะปรากฏด้านสีไม่มีแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ทั้ง 4 สูตร คือระดับปานกลางถึงมาก (7.3-7.5) ส่วนลักษณะปรากฏด้านอื่น ๆ พบว่า อาสาสมัครมีความพึงพอใจที่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P≤0 05) โดยคุณสมบัติด้านกลิ่นของผลิตภัณฑ์ พบว่า อาสาสมัครพึงพอใจต่อกลิ่นของผลิตภัณฑ์ที่ใช้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์สูงกว่า ส่วนคุณสมบัติด้านอื่น ๆ คือ ลักษณะของเนื้อเจลโลชั่น การดูดซึมผ่านผิวการแผ่กระจายตัวของเนื้อเจลขณะทาที่ผิวหน้า และความพึงพอใจโดยภาพรวม พบว่า เจลแต้มสิวที่ผลิตจากน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงทั้งสองสูตร มีค่าเฉลี่ยคะแนนความพึงพอใจสูงสุด โดยมีความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์อยู่ในระดับปานกลางถึงมาก ดังตารางที่ 4.32

ตารางที่ 4.32 ระดับความพึงพอใจของอาสาสมัครต่อผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิวที่ผลิตจากน้ำมันมะพร้าวดัดแปลง

ปัจจัยที่ประเมิน	คะแนนเฉลี่ยความพึงพอใจ			
	MO	MOS	VCO	VCOS
สี	7.5^{ns}	7.6^{ns}	7.3^{ns}	7.4^{ns}
กลิ่น	6.1^{b}	6.4^{b}	7.3^{a}	7.1^{a}
ลักษณะของเนื้อเจล	7.9^{a}	6.8^{b}	6.7^{b}	6.6^{b}
การดูดซึมผ่านผิว	7.7^{a}	7.1^{b}	6.6^{c}	6.5^{c}
การกระจายตัวขณะทา	7.6^{a}	7.5^{a}	6.4^{b}	6.4^{b}
ความพึงพอใจโดยรวม	7.4^{a}	7.5^{a}	6.4^{b}	6.4^{b}

หมายเหตุ: เครื่องหมาย a, b และ c ในแต่ละแถว แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0 05) โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

1=ไม่พึงพอใจมากที่สุด 3=ไม่พึงพอใจปานกลาง 5=เฉย ๆ 7=พึงพอใจปานกลาง และ9=พึงพอใจมากที่สุด

บทที่ 5

สรุป และข้อเสนอแนะ

ผลจากการคัดเลือกแหล่งของเอนไซม์ไลเปสทางการค้า 6 ชนิด จากบริษัท Amano ประเทศญี่ปุ่น คือ เอนไซม์ไลเปส AY, M, F-AP15, PS, D และ Pancreatic lipase ที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันมะพร้าวด้วยการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีเป็นกรดลอริกและโมโนลอริน และศึกษาเพื่อปรับสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการสกัดเพื่อจะเสริมประสิทธิภาพการสกัดและคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้าง ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ในระหว่างการยืดอายุการเก็บรักษา จากนั้นนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง ได้แก่ เจลแต้มสิว สามารถสรุปผลการวิจัยได้ดังนี้

ผลผลิตที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการสกัดน้ำมันมะพร้าว

ผลการศึกษาปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้นตลอดขั้นตอนการสกัดน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นด้วยวิธีการหมัก พบว่า การนำมะพร้าวมาปอกเปลือกออกจะทิ้งส่วนของเปลือกประมาณ 40% โดยน้ำหนัก เมื่อนำผลมะพร้าวไปผ่าเอาน้ำมะพร้าวออกจะทิ้งน้ำมะพร้าวสดประมาณ 400-500 มิลลิลิตรต่อผล เมื่อขูดเอาเฉพาะเนื้อมะพร้าวจะได้ผลผลิตเนื้อมะพร้าวประมาณ 70% โดยน้ำหนัก ที่เหลืออีกประมาณ 30% เป็นส่วนของกะลามะพร้าว และเมื่อนำเนื้อมะพร้าวขูดไปบีบคั้นเอาน้ำกะทิ พบว่า จะได้น้ำกะทิสดประมาณ 75% โดยน้ำหนักของเนื้อมะพร้าวขูด จากนั้นเมื่อนำน้ำกะทิไปแช่เย็นเพื่อแยกเอาเฉพาะครีมจะได้ครีมน้ำหนักประมาณ 75% โดยน้ำหนัก ซึ่งส่วนของครีมนี่เองที่จะนำไปใช้สำหรับการหมักเพื่อผลิตน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นจะให้ผลิตน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นหลังการหมักไม่ต่ำกว่า 30% โดยน้ำหนัก

ผลของแหล่งหรือชนิดของเอนไซม์ไลเปส

ผลการสำรวจเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ ทางการค้าที่ 6 ชนิด จากบริษัท Amano ประเทศญี่ปุ่น คือ เอนไซม์ไลเปส AY, M, F-AP15, PS, D และ Pancreatic lipase เร่งการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำไปหมักในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแยกชั้นน้ำมันที่สมบูรณ์ ได้ผลการทดลองพอสังเขปดังนี้

1. ปริมาณผลผลิต

ผลการเติมเอนไซม์ไลเปส D และ F-AP15 เป็นตัวเร่งการดัดแปลงโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันก่อนหมักแยกให้ปริมาณผลผลิตชั้นของน้ำมันสูงสุด 36.2-36.5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่า ผลิตภัณฑ์น้ำมันที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปสก่อนการหมักแยกมีลักษณะสีขาวขุ่น มีกลิ่นฉุน และมีความหนืดที่สูงกว่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุมผลิตภัณฑ์น้ำมันจะใสไม่มีสี มีกลิ่นหอมมะพร้าว และไม่หนืด

2. ค่า %FFA และค่ากรด

ผลการเร่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปส D ให้ค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรดสูงสุด เท่ากับ 35.52±1.73% และ 99.45±4 85 ตามลำดับ รองลงมาคือการเร่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปส F-AP15 มีค่าเท่ากับ 12.27±1 83% และ 34.34±5 11 ตามลำดับ สำหรับผลการเร่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปสอื่น ๆ วัดค่า %FFA ได้เพียง 1.15-5.62% เมื่อเทียบกับการหมักแบบปกติมีค่า %FFA เท่ากับ 0.44±0.21%

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ 1,1-diphenyl-2-picrydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity assay พบว่า น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้าง ที่ระดับความเข้มข้นทดสอบ 20-200 mg/ml สามารถรีดิวซ์อนุมูลอิสระของ DPPH ได้ โดยน้ำมันมะพร้าวที่เร่งด้วยไลเปส D มีค่า IC_{50} ต่ำสุดคือ 68.94 mg/ml เมื่อเทียบกับน้ำมันมะพร้าวที่สกัดแบบปกติมีค่า IC_{50} เท่ากับ 111.42 mg/ml แสดงให้ว่าน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยไลเปสก่อนการหมักสกัดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ทั่วไป

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

4.1 ผลการทดสอบวิธี disc diffusion method

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S aureus* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก พบว่า น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส M, F-AP15, PS และ D มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าวได้ ในขณะที่ผลการทดสอบกับน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ และน้ำมันที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส AY และ Pancreatic lipase ชุดควบคุมน้ำมันดอกทานตะวัน และ DMSO 100% ไม่แสดงผลการยับยั้ง โดยน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส D มีฤทธิ์การยับยั้งสูงสุด โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้เทียบเท่ากับผล

การทดสอบกับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15% เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 6.25-12.5%

สำหรับผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ พบว่า ให้ผลการทดสอบไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* คือน้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส D และ F-AP15 มีฤทธิ์การยับยั้งสูงสุด โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้เทียบเท่ากับผลการทดสอบกับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15% เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 6.25-12.5%

4.2 ผลการทดสอบวิธี broth dilution techniques

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* โดยใช้เทคนิค broth dilution techniques พบปัญหาการละลายของตัวอย่างน้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้ระดับความเข้มข้นสูงสุดคือ 12.5% และหลังจากเจือจางตัวอย่างน้ำมันลดความเข้มข้นต่ำลงจนถึง 1.65% เมื่อเติมเชื้อเสร็จเขย่าให้เกิดการผสมกันและฆ่าเชื้อเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปบ่ม พบว่า เชื้อยังคงเจริญได้ในทุกระดับความเข้มข้นของน้ำมันดัดแปลงที่ใช้ทดสอบซึ่งสังเกตได้จากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงพบว่ามีค่า Abs เกิน 0.05 จึงไม่สามารถคำนวณหาค่า MIC ได้

ผลของการเติมกลีเซอรอลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสแต่ละชนิด

ผลการนำครีม มาเติมกลีเซอรอลลงไปขวดโหลละ 50 กรัม แล้วเติมเอนไซม์ไลเปสแต่ละชนิดลงไปหมักเช่นเดิม พบว่า

1. ปริมาณผลผลิต

การเติมกลีเซอรอลและใช้เอนไซม์ไลเปสทั้ง 6 ชนิด ยังคงทำให้เกิดการแยกชั้นของน้ำมันหลังผ่านกระบวนการหมัก แต่ลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์และการแยกชั้นของน้ำมันมีความแตกต่างกัน ผลผลิตของน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นและน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างที่แยกได้มีปริมาณที่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ผลการเติมเอนไซม์ไลเปส D เป็นตัวเร่งการดัดแปลงโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันก่อนแยกให้ปริมาณผลผลิตของน้ำมัน 30.3 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างกันทางสถิติกับทรีทเมนต์อื่น ๆ

2. ค่ากรด และ %FFA

ค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรดมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับการหมักแบบปกติที่ไม่เติมไลเปส ผลการเร่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปส D ให้ค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรดสูงสุด เท่ากับ 46.21$\pm$4.52% และ 129.39$\pm$12.65 ตามลำดับ

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยไลเปส D มีค่า IC_{50} ต่ำสุดคือ 58.38 mg/ml เมื่อเทียบกับน้ำมันมะพร้าวที่สกัดแบบปกติมีค่า IC_{50} เท่ากับ 97.94 mg/ml ในขณะที่ตัวอย่างน้ำมันทรีทเมนต์อื่น ๆ มีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 100-117 mg/ml แสดงให้ว่าน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยไลเปส D ก่อนการหมักสกัดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าตัวอย่างน้ำมันมะพร้าวนทรีทเมนต์อื่น ๆ ประมาณ 2 เท่า

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยเอนไซม์ไลเปส D มีฤทธิ์การยับยั้งสูงสุด โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ได้ผลเทียบเท่ากับการทดสอบด้วยสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15% เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 12.5% เช่นเดียวกับการทดลองในตอนที่ 1

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงตัดสินใจคัดเลือกใช้เอนไซม์ไลเปส D เป็นเอนไซม์ที่เหมาะสำหรับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนต่อไป

ปริมาณกลีเซอรอลที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส D

ชั่งครีมจำนวน 900, 925, 950, 975 และ 1,000 กรัม มาใส่ในขวดโหลแก้ว แล้วเติมสารกลีเซอรอลลงไปขวดโหลละ 100, 75, 50, 25 และ 0 กรัม ตามลำดับ จากนั้นเติมเอนไซม์ไลเปส D ลงไปเร่งเช่นเดิม สรุปผลทดลองได้ดังนี้

1. ปริมาณผลผลิต

ผลการทดลอง พบว่า ผลการแปรปริมาณกลีเซอรอลตั้งแต่ 25-100 มก./1000 ก.ของครีม โดยใช้เอนไซม์ไลเปส D เป็นตัวเร่ง ได้ปริมาณผลผลิตของน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างที่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ผลการเติมกลีเซอรอล 25 มก./1000 ก.ของครีมให้

ปริมาณผลผลิตของน้ำมันดัดแปลงสูงสุด 27.67±2.34 การเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลมากกว่า 25 มก./1000 ก. ของครีม จะมีผลทำให้ปริมาณผลผลิตลดลง

2. ค่ากรด และ %FFA

ผลการเติมกลีเซอรอล 25 มก./1000 ก. และเร่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปส D ให้ค่า %FFA และค่ากรดสูงสุด เท่ากับ 41.53±0.67 % และ 116.27±1.88 ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มกลีเซอรอล ค่ากรดจะลดลง

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่า น้ำมันมะพร้าวที่เร่งด้วยไลเปส D และเติมกลีเซอรอลทุกระดับความเข้มข้นมีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกัน คือ 41-50 mg/ml เมื่อเทียบกับน้ำมันมะพร้าวที่สกัดแบบปกติมีค่า IC_{50} เท่ากับ 79 mg/ml ซึ่งแสดงให้ว่าน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยไลเปส D มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าน้ำมันที่สกัดแบบปกติ

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* พบว่า น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วย เอนไซม์ไลเปส D ควบคู่กับการแปรระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าวได้ ในขณะที่ผลการทดสอบกับน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ น้ำมันดอกทานตะวัน และ DMSO 100% ไม่แสดงผลการยับยั้ง น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยการเติมกลีเซอรอล 25 มก./ ก.ก. มีฤทธิ์การยับยั้งสูงสุด โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ได้เทียบเท่ากับผลการทดสอบกับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15% เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงตัดสินใจคัดเลือกใช้เอนไซม์ไลเปส D ควบคู่กับการเติมกลีเซอรอลในปริมาณ 25 มก./ ก.ก. เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส D

จากการเตรียมครีมจำนวน 975 กรัม เติมกลีเซอรอล 25 กรัม เติมเอนไซม์ไลเปส D ที่เตรียมในสารละลายละลาย 1.0 M phosphate buffer พีเอชแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ พีเอช 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรลงไป 10 มิลลิลิตร กวนผสมเพื่อให้เอนไซม์เร่งการ

ทำปฏิกิริยาความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศ เป็นเวลา 30 นาที หมักแยกน้ำมันในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สรุปผลการทดลองดังนี้

1. ปริมาณผลผลิต

ผลการทดลอง พบว่า ผลการเติมกลีเซอรอล 25 มก./1000 ก.ของครีมและปรับค่าพีเอชของเอนไซม์เป็น 6.0 เพื่อใช้ในปฏิกิริยาการดัดแปลงโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันก่อนหมักแยกให้ปริมาณผลผลิตของน้ำมันดัดแปลงสูงสุด 28.7±2.3 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการปรับค่าพีเอชของเอนไซม์เป็น 5.5 และ 6.5 และให้ปริมาณผลผลิตที่ต่ำกว่าการหมักแบบไม่ใช้เอนไซม์

2. ค่ากรด และ %FFA

ค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรดมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับการหมักแบบปกติที่ไม่เติมไลเปส ผลจากการเติมกลีเซอรอล 25 มก./1000 ก. และเร่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปส D ที่พีเอช 5.5-7.0 ให้ค่า %FFA และค่ากรดสูงสุด เท่ากับ 42.88±1.30 % และ 120.06±3.63 ตามลำดับ

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

น้ำมันดัดแปลงมีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกัน คือ 42-44 mg/ml เมื่อเทียบกับน้ำมันมะพร้าวที่สกัดแบบปกติมีค่า IC_{50} เท่ากับ 110.21 mg/ml ซึ่งแสดงให้ว่าน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยไลเปส D ที่ระดับพีเอชต่าง ๆ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการสกัดแบบปกติประมาณ 2 เท่า

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* พบว่า น้ำมันมะพร้าวที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยการเติมกลีเซอรอล 25 มก./ ก.ก. เร่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปส D ที่พีเอช 5.5-6.5 มีฤทธิ์การยับยั้งสูงสุด โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ ได้เทียบเท่ากับผลการทดสอบกับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15% เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 12.5% เช่นเดียวกับการทดลองในตอนที่ผ่านมา

ผู้วิจัยจึงคัดเลือกใช้เอนไซม์ไลเปส D ที่เตรียมในสารละลาย 1.0 M phosphate buffer พีเอช 6.0 เนื่องจากเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับครีม (ครีมมีพีเอช 6.3) ควบคู่กับการเติมกลีเซอรอลในปริมาณ 25 มก./ ก.ก. เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส D

ผลจากศึกษาใช้เอนไซม์เร่งการทำปฏิกิริยาในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส สรุปได้ผลการทดลองดังนี้

1. ปริมาณผลผลิต

ผลการทดลอง พบว่า ปริมาณผลผลิตของน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นและน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างที่แยกได้มีปริมาณที่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ผลการกวนทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30- 40 องศาเซลเซียส เพื่อเร่งปฏิกิริยาการดัดแปลงโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันก่อนหมักแยกให้ปริมาณผลผลิตของน้ำมันดัดแปลงสูงสุด 29.17-29.67 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเป็น 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่า ปริมาณผลผลิตของน้ำมันจะลดลง

2. ค่ากรด และ %FFA

ค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรดมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ผลการเพิ่มอุณหภูมิของปฏิกิริยาเป็น 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่า มีผลแปรผันโดยตรงต่อการเพิ่ม %FFA จาก 42.37%, 44.17%, 45.61% และ 49.21% ตามลำดับ

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่า น้ำมันดัดแปลงทุกทรีทเมนต์มีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกัน คือ 52-62 mg/ml เมื่อเทียบกับน้ำมันมะพร้าวที่สกัดแบบปกติมีค่า IC_{50} เท่ากับ 110.21mg/ml ซึ่งแสดงให้ว่าน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยไลเปส D ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการสกัดแบบปกติประมาณ 2 เท่า

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* พบว่า ให้ผลการทดสอบไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบที่ที่ผ่านมา คือมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้เทียบเท่ากับผลการ

ทดสอบกับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15% เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 6.25-12.5%

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงใช้อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส หรือเลือกใช้อุณหภูมิห้องเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากเป็นสภาวะที่ควบคุมง่าย ต้นทุนต่ำ และได้ปริมาณผลผลิตสูง โดยที่สมบัติการออกฤทธิ์ต่าง ๆ ไม่แตกต่างกันมากนัก

ความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส D ที่เหมาะสม

ผลจากศึกษาโดยการเตรียมเอนไซม์ไลเปส D ในสารละลายละลาย 1.0 M phosphate buffer พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 กรัมต่อลิตร สรุปได้ผลการทดลองดังนี้

1. ปริมาณผลผลิต

ปริมาณผลผลิตของน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างที่แยกได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) คือมีค่าเท่ากับ 26.7-28.8 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณผลผลิตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์

2. ค่ากรด และ %FFA

การใช้เอนไซม์ไลเปสที่ระดับความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จะให้ค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรดต่ำสุด ซึ่งสามารถสังเกตได้จากความแตกต่างของสีและความขุ่นของผลิตภัณฑ์ แต่เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสในช่วง 1.0-2.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร พบว่า ค่า %FFA และค่ากรดจะสูงขึ้น แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

น้ำมันดัดแปลงทุกทรีทเมนต์มีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกัน คือ 50-60 mg/ml เมื่อเทียบกับน้ำมันมะพร้าวที่สกัดแบบปกติมีค่า IC_{50} เท่ากับ 114.05 mg/ml ซึ่งแสดงให้ว่าน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยไลเปส D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการสกัดแบบปกติประมาณ 2 เท่า

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* พบว่า มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทั้งสองแกรมได้เทียบเท่ากับผลการทดสอบกับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15% เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 6.25-12.5% เช่นเดียวกับการทดลองในตอนที่ผ่านมา

ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส D

ผลการศึกษาระยะเวลาการเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน คือ 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที จากนั้นนำไปหมักแยกน้ำมันในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สรุปได้ผลการทดลองดังนี้

1. ปริมาณผลผลิต

ผลการทดลอง พบว่า ปริมาณผลผลิตของน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างที่แยกได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) คือมีค่าเท่ากับ 30.50-33.33 เปอร์เซ็นต์ กล่าวคือ เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเร่งปฏิกิริยาปริมาณผลผลิตก็ไม่ได้เพิ่มสูงขึ้น

2. ค่ากรด และ %FFA

การใช้ระยะเวลาในการเร่งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ระดับความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที จะให้ค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก และค่ากรดต่ำสุด แต่เมื่อเพิ่ม ระยะเวลาเป็น 30, 40, 50 และ 60 นาที พบว่า ค่า %FFA และค่ากรดจะสูงขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าประมาณ 43% และ 121 ตามลำดับ

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

น้ำมันดัดแปลงทุกทรีทเมนต์มีค่า IC_{50} ที่ไม่แตกต่างกันมากนัก คือ 47-67 mg/ml เมื่อเทียบกับน้ำมันมะพร้าวปกติมีค่า IC_{50} เท่ากับ 106.31 mg/ml ซึ่งแสดงให้ว่าน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยไลเปส D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการสกัดแบบปกติประมาณ 2 เท่า

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งกับเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* พบว่า ให้ผลการทดสอบไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบที่ที่ผ่านมา คือมีฤทธิ์การยับยั้งที่ไม่แตกต่างกัน เมื่อเจือจางด้วย DMSO ให้เหลือความเข้มข้น 6.25% จะมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อเทียบเท่ากับสารฟีนอลที่ระดับความเข้มข้น 15%

สรุปผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส D

การผลิตและแยกน้ำมันมะพร้าวสูตรดัดแปลงโครงสร้างให้อยู่ในรูปของกรดลอริกและโมโนลอริน เพื่อนำผลิตภัณฑ์ไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติเด่นด้านความเป็นกรด และสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทั้งด้านฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย พบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือขูดเนื้อมะพร้าวระยะสุกห้าวมาคั้นด้วยความดัน 40 ปอนด์/ตารางนิ้ว นำน้ำกะทิที่ได้ผสมกับน้ำ 1:1 ปั่นผสม 1,500 รอบต่อนาที เวลา 15 นาที แล้วแช่เย็นที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แยกเอาเฉพาะครีมมาใส่ขวดโหลเติมกลีเซอรอล 25 มก./ ก.ก.เติมเอนไซม์ไลเปส D เตรียมในสารละลาย 1.0 M phosphate buffer พีเอช 6.0 เข้มข้น 10 มก./มล. จำนวน 10 มิลลิลิตร คนผสม 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หมักในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเกิดการแยกชั้นของน้ำมันที่สมบูรณ์ ตักส่วนน้ำมันมากรองด้วยกระดาษทิชชูแล้วอังในอ่างน้ำร้อน เวลา 1 ชั่วโมง บรรจุขวดไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจนแล้วปิดฝา พบว่า ให้ปริมาณผลผลิตของน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงเท่ากับ 30-33% ของครีม มีค่า %FFA ในรูปของกรดลอริก 44% และค่ากรด 122 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH assay พบว่า น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงมีค่า IC_{50} สูงกว่าน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ 2 เท่า คือ 47-67 และ 106.31 mg/ml ตามลำดับ ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งกับเชื้อด้วยวิธี disk diffusion method พบว่า น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างความเข้มข้น 6.25% มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* เทียบเท่ากับสารฟีนอล 15% สูงกว่าประมาณ 2 เท่า

การเปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาน้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้าง

ผลการศึกษาการกำจัดความชื้นด้วยวิธีการอังน้ำมันตัวอย่างในอ่างน้ำร้อน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อคุณภาพในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นแบบดัดแปลงโครงสร้างที่บรรจุในขวดไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วปิดด้วยฝาเกลียว เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า ผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นแบบดัดแปลงโครงสร้างมีการเปลี่ยนแปลง

เล็กน้อยแต่มีค่าคุณภาพอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของ มผช. 670/2547 และมาตรฐาน อย. โดยมีความชื้น 0.15-0.16% และมีค่าซาพอนิฟิเคชันช่วง 248-249 มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อน้ำมัน 1 กรัม

ค่าเปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระในรูปกรดลอริก (%FFA) เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 43.57.19% เป็น 44.14% มีแนวโน้มเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยมีค่าเพอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นจาก 3.74 เป็น 4.43 มิลลิกรัมสมมูลเพอร์ออกไซด์ออกซิเจนต่อกิโลกรัมน้ำมัน และค่า Anisidine value เพิ่มขึ้นจาก 0.22 เป็น 0.25 ตามลำดับ

การผลิตเจลโลชั่นแต้มสิว

เมื่อนำน้ำมันมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างมาทดลองผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิว สรุปได้ผลดังนี้

1. ลักษณะทางกายภาพ

ผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิวสูตรที่ใช้น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงมีสีขาวนวล มีค่าพีเอชเป็นกรด 3.91- 4.22 มีฟองอากาศน้อย เนื้อเจลมีความข้นหนืด เมื่อทาที่ผิวหน้าพบว่าเนื้อเจลมีความเนียนและไม่เหนียวเหนอะ

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

เจลโลชั่นแต้มสิวสูตรที่ใช้น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้างมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ได้สูงกว่าเมื่อเทียบกับสูตรที่ใช้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์เจลแต้มสิวสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ได้โดยไม่ต้องใช้กรดซาลิซิลิก

3. ผลทดสอบความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิวของอาสาสมัคร

อาสาสมัครมีความพึงพอใจต่อลักษณะปรากฏและคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เจลโลชั่นแต้มสิวสูตรใช้น้ำมันมะพร้าวดัดแปลงโครงสร้าง ด้านสี ลักษณะของเนื้อเจล การดูดซึมผ่านผิว การแผ่กระจายตัวของเนื้อเจลขณะทาที่ผิวหน้า และความพึงพอใจโดยภาพรวมสูงสุดในระดับปานกลางถึงมาก ยกเว้นคุณสมบัติด้านกลิ่นของผลิตภัณฑ์ที่ต่ำกว่าใช้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษา คณะผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะที่น่าจะเป็นประโยชน์ ที่ควรนำไปปฏิบัติและพัฒนาในอนาคต ดังนี้

1. งานวิจัยนี้ยังไม่ได้วิเคราะห์เพื่อพิสูจน์หาโครงสร้างและสัดส่วนของไตรกลีเซอไรด์โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระในรูปของกรดลอริก ดังนั้นหากมีการศึกษาต่อยอดโดยการวิเคราะห์หาโครงสร้างต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเร่งปฏิกิริยาด้วยไลเปสก็จะทำให้ผลงานวิจัยมีความลุ่มลึกมากยิ่งขึ้น

2. กรรมวิธีการสกัดน้ำมันมะพร้าวด้วยวิธีการหมักเป็นวิธีที่กระทำได้ง่าย และไม่ใช้เครื่องมือราคาแพง ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับการถ่ายทอดเทคโนโลยีแก่ชุมชนเพื่อเสริมสร้างอาชีพและรายได้ต่อไปในอนาคตด้วยวิถีการดำรงชีวิตตามปรัชญาของเศรษฐกิจพอเพียง นอกจากนี้ชุมชนสามารถผลิตน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นเพื่อเก็บถนอมรักษาไว้ใช้ในยามที่ขาดแคลนโดยเฉพาะในยามที่มะพร้าวมีราคาตกต่ำ และหากมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในขั้นตอนการหมักแยกก็จะได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติเด่นที่แตกต่างจากน้ำมันมะพร้าวทั่วไป จึงสามารถนำไปสร้างสรรค์เป็นผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างได้

3. ควรสนับสนุนให้ชาวบ้านร่วมกันอนุรักษ์และถ่ายทอดภูมิปัญญาเกี่ยวกับตำรับอาหารและยาต่าง ๆ ที่ใช้น้ำมันมะพร้าวเป็นวัตถุดิบให้อยู่ควบคู่กับเยาวชนรุ่นต่อไปในอนาคต

4. การสกัดน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์โดยใช้กระบวนหมักมีวัสดุเศษเหลือจำนวนมากจากกระบวนการผลิต ได้แก่ เปลือกมะพร้าว กะลามะพร้าว น้ำมะพร้าว กากมะพร้าว ส่วนใสของน้ำกะทิหลังแยกครีม ส่วนใสของครีมหลังหมัก และส่วนบนที่เป็นฝ้าครีม ดังนั้นจึงมีข้อเสนอแนะให้ศึกษาวิจัยการใช้ประโยชน์สูงสุดจากเศษเหลือดังกล่าวอย่างคุ้มค่า จะทำให้การลงทุนประกอบธุรกิจการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ด้วยกระบวนการหมักมีมูลค่าเพิ่มมากยิ่งขึ้น

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

ฉัตรชัย สังข์ผุด. (2557). ผลของการเสริมกล้าเชื้อต่อการสกัดน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ด้วยวิธีการหมัก. **วารสารวิชชา**, 33 (1): 26-38.

ฉัตรชัย สังข์ผุด. (2551). **จุลชีววิทยาทางอาหาร (Food Microbiology)**. นครศรีธรรมราช : มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช.

ธนานันท์ ตัณฑกูล. (2549). **การศึกษากระบวนการแยกน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์โดยการเหวี่ยงแยก.** วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิศวกรรมมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

นฤมล จียโชค. (2549). **การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์**, กรมแพทย์แผนไทย.

น้ำมันมะพร้าว. (2524). **ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 57** (พ.ศ.2524).

ปิยาภัทร ไตรสนธิ. (2550). ผลของความสูงพื้นที่และสายพันธุ์ต่อกิจกรรมในการต้านอนุมูลอิสระของตะไคร้ต้น. **วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพืชสวน**. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มะพร้าว. (2553). ค้นเมื่อ 9 มิถุนายน 2553, จาก **Wikipedia**: http://th.wikipedia.org/wiki/มะพร้าว.

สำนักงานการค้าภายในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์. (2552). **สถิติราคามะพร้าวผลใหญ่.** ค้นเมื่อ 13 มิถุนายน 2554 จากเว็บไซต์ http://www.dit.go.th/prachuapkhirikhan/index.asp?deptid=70.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. (2547). **มผช. 670/2547. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน : น้ำมันมะพร้าว**.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2556). **ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร.** ค้นเมื่อ 13 ธันวาคม 2556 จากเว็บไซต์ http://www.oae.go.th/main.php?filename=agri_production.

ศิริวรรณ เนติวรานนท์. (2531). **ชนิดของการหืนน้ำมันมะพร้าวและวิธีการป้องกัน**, เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิทยาศาสตร์การอาหาร บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

AOCS. (1999). **Official Methods and Recommended Practices of the American Oils Chemists Society**, 5th Ed., AOCS Press, Champaign.

AOAC. (2000). Official **Methods of Analysis Association of Official** Analytical Chemists. 17th Volume l. MD, USA : Gaithersburg.

Agbor, G.A., Vinson, J. A., Oben, J. E. & Ngogang, J. Y. (2006). Comparative analysis of the vitro antioxidant activity of white and black pepper. **Nutrition Reseaarch**, 26, 659-663.

Bannasan, N., Thathaisong, U., Yuenyongputtakal, W. & Chinnasarn, S. (2011). Antibacterial effect of fatty acid extracted from coconut oil against food-borne bacterial pathogens. **Agricultural Sci. J.**, 42(2)(Suppl.), 373-376.

Bartolotta, S., García, C.C., Candurra N.A. & Damonte, E.B. (2001). Effect of fatty acids on arenavirus replication: inhibition of virus production by lauric acid. **Arch. Virol.** 146, 777–790.

Batovska, D.I., Todorova, I.T., Tsvetkova, I.V. & Najdenski, H.M. (2009). Antibacterial study of the medium chain fatty acids and their 1-monoglycerides: individual effects and synergistic relationships. **Pol J Microbiol**, 58(1), 43-47.

Chang, S. T. Wu, J.H. Wang, S.Y. King, P.L. Yang, N.S. & Shyur, L.F. (2001). Antioxidant activity of extracts from *Acacia confuse* bark and heartwood. **J. Agric Food Chem,** 49, 3420-3424.

Che Man, Y.B., Abdul Karim, M.I.B. & Teng, C.T. (1997). Extraction of Coconut oil with *Lactobacillus plantarum* 1041 IAM. Journal of the American Oil Chemists Society, 74(9), 1115-1119.

Che Man, Y.B., Suhardiyono, A.B. Asbi, Azudin, M.N. & Wei, L.S. (1996). Aqueous enzymatic extraction of coconut oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 73, 683-686.

Che Man, Y.B., Suhardiyono, A.B. Asbi. & Azudin, M.N. (1992). Acetic acid treatment of coconut cream in coconut oil extraction. **ASEAN Food J,** 7, 38-42.

Cohen, L.A. & Thomson, D.O. (1987). The influence of dietary medium-chain triglycerides on rat mammary tumor development. **Lipids**, 6, 455-461.

Cotton, L. N. & Marshall, D.L. (1997). Monolaurin Preparation Method Affects Activity Against Vegetative Cells of *Bacillus cereus*. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, 30, 830–833.

Enig, M.G. (1996). Health and nutritional benefits from coconut oil: an important functional food for the 21st century. **AVOC Lauric Oils Symposium, Ho Chi Min City, Vietnam**, 25 April 1996.

FAO. (2011). **FAOSTAT.** Retrieved June 28, 2011, from http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx.

Ferreira-Dias, S. & Fonseca, M. M. R. (1995). Production of monoglycerides by glycerolysis of olive oil with immobilized lipases: effect of the water activity. Bioprocess Engineering, 12(6), 327-337.

Freitas, L., Paulaa, A.V., Santosa, J.C., Zaninb, G.M. & Castroa, H.F. (2010). Enzymatic synthesis of monoglycerides by esterification reaction using *Penicillium camembertii* lipase immobilized on epoxy SiO_2-PVA composite. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 65, 87–90.

Fu, X., Zhu, X., Gao, K. & Duan, J. (1995). Oil and fat hydrolysis with lipase from *Aspergillus* sp. Journal of the American Oil Chemists Society, 72(5), 527-531.

Fuangworawong, P., Tripetchkul, S., Koonsrisuk, S. & Akeprathumchai, S. (2008). Study on availability and utilization of wastes from coconut processing in Prachuapkhirikhan province. **Silapakhon University Journal**, 28(3), 13-31.

Handayani, R., Sulistyo, J. & Rahayu, R.D. (2009). Extraction of coconut oil (*Cocos nucifera* L.) through fermentation system. **Biodiversitas**, 10(3), 151-157.

Hauerlandova, I., Lorencova, E., Bunka, F., Navratil, J., Janeckova, K. & Bunkova, L. (2014). The influence of fat and monoacylglycerols on growth of spore-forming bacteria in processed cheese. International Journal of Food Microbiology, 182-183, 37-43.

Healer, D. (2552). **น้ำมะพร้าว...มีประโยชน์มากกว่าที่คิด**. ค้นเมื่อ 10 มิถุนายน 2553, จากเว็บไซต์ http://thaiherbclinic.com/node/1467.

Hornung, B., Amtmann, E. & Sauer, G. (1994). Lauric acid inhibits the maturation of vesicular stomatitis virus. **J Gen Virol February**, 75, 353-361.

Intahphuak, S., Khonsung, P. & Panthong, A. (2010). Anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic activities of virgin coconut oil. **Pharm Biol**, Feb, 48(2), 151-157.

ISO 660: (1996). **Animal and vegetable fats and oils: Determination of acid value and acidity.**

ISO 662: (1998). **Animal and vegetable fats and oils**: Determination of moisture and volatile **matter content.**

IUPAC. (1979). **Standard method for the analysis of oils, fats and derivatives.** 1th supplement to the 7th edition. Retrieved June 22, 2011, from http://www.iupac.org/publications/pac/1979/pdf/5112x2503.pdf.

Jay, J.M. (1992). **Modern Food Microbiology** (4th edition). New York : Chapman Hall.

Kabara, J.J. (1984). Medium-chain fatty acids and esters as antimicrobial agents. In: Kabara, J.J. (ed.). **Cosmetic and Drug Presentation: Principles and Practice**. New York: Marcel Dekker, Inc.

Kristmundsdóttir, T., Arnadóttir, S.G., Bergsson, G. & Thormar, H. (1999). Development and evaluation of microbicidal hydrogels containing monoglyceride as the active ingredient. **J Pharm Sci**, 88, 1011-1115.

Kumar, N., Rungseevijitprapa, W., Narkkhong, NA., Suttajit, M & Chaiyasut, C. (2012). 5?-reductase inhibition and hair growth promotion of some Thai plants traditionally used for hair treatment. **J. Ethnopharmacol**, 139(3), 765-771.

Lim-Sylianco, C.Y., Guevara, A.P. & Sylianco-Wu, L. (1991). Antigenotoxicity of dietary coconut oil. **Science Diliman**, 4(1).

Loo, T.G. (1982). Small scale and home processing of fresh coconut (oil manufacture) and utilization of by-products, **Royal Tropical Institute**, Amsterdam.

Luo, C., Zeng, Z., Gong, D., Zhao, C., Liang, Q. & Zeng, C. (2014). Evaluation of monolaurin from camphor tree seeds for controlling food spoilage fungi. **Food Control** 46, 488-494.

Mansour, M. & Milliere, J.B. (2001). An inhibitory synergistic effect of a nisin^monolaurin combination on *Bacillus* sp. vegetative cells in milk. **FoodMicrobiology,** 18, 87-94.

Marasabessy, A., Moeis, M.R., Sanders, J.P.M. & Weusthuis, R.A. (2010). Coconut oil extraction by the traditional java method: An investigation of its potential application in aqueous jatropha oil extraction. **Biomass & Bioenergy**, 34, 1141-1148.

Marina, A.M., Che Man, Y.B. & Amin, I. (2009). Virgin coconut oil: emerging functional food oil. **Trends in Food Science & Technology**, 20, 481-487.

Marina, A.M., Che Man, Y.B., Nazimah, S.A. & Amin, I. (2009). Antioxidant capacity and phenolic acids of virgin coconut oil. **Int J Food Sci Nutr**, 60(2), 114-123.

Marina A.M., Che Man Y.B., Nazimah A.H. & Amin I. (2009). Chemical properties of virgin coconut oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 86, 301-307.

Mbandi, E., Brywig, M. & Sheelef, L.A. (2004). Antilisterial effects of free fatty acids and monolaurin in beef emulsions and hot dogs. **Food Microbiology,** 21, 815-818.

McGlone, O.C., Canales, A.L.M. & Carter, J.V. (1986). Coconut oil extraction by a new enzymatic process. **J. Food Sci**, 51, 695-697.

McNeill, G.P., Shimizu, S. & Yamane., T. (1991). High-yield enzymatic glycerolysis of fats and oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 68(1), 1-5.

Nevin, K.G. & Rajamohan, T. (2009). Wet and dry extraction of coconut oil: impact on lipid metabolic and antioxidant status in cholesterol coadministered rats. **Can J Physiol Pharmcol**, Aug, 87(8), 610-616.

Nevin, K.G. & Rajamohan, T. (2006). Virgin coconut oil supplemented diet increases the antioxidant status in rats. **Food Chemistry**, 99, 260-266.

Rahayu, R.D., Sulistyo, J. & Dinoto, A. (2008). Enzymatic properties of microbial solid starters on coconut oil recovery. **Proceeding of the International Seminar on Chemistry,** 679-686.

Rudkowska, C.E., Roynette, D.K., Nakhasi, J. & Jones, P.J.H. (2006). Phytosterol mixed with medium-chain triglycerides and high-oleic canola oil decrease plasma lipid in overweight men. **Metabolism Clinical and Experimental**, 55, 391-395.

Soeka, Y.S., Sulistyo, J. & Naiola, dan E. (2008). Analisis biokimia minyak kelapa hasil ekstraksi secara fermentasi. **Biodiversitas**, 9(2), 91-95.

Steinkraus, K.H., Cullen, R.E., Pederson, C.S. & Nellis, L.F. (1983). **Handbook of Indigenous Fermented Foods**. New York: Marcel Dekker Inc.

Suhardiyono. (1992). Effect of extraction methods on recovery quality, storage stability and frying characteristic of coconut oil. **M.Sc. Thesis, Faculty of Food Sci. and** Biotechnology, **Universiti Pertanian Malaysia**, 51-68.

Tangwatcharin, P. & Khopaibool, P. (2012). Activity of virgin coconut oil, lauric acid or monolaurin in combination with lactic acid against *Staphylococcus aureus*. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, 3(4), 969-985.

USFDA-BAM. (2001). **Bacteriological Analytical Manual Online**. Retrieved June 22, 2007, from http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/.

Villarino, B.J., Marsha Dy, L., Concepcion, Ma. & Lizada, C. (2007). Descriptive sensory evaluation of virgin coconut oil and refined, bleached and deorderized coconut oil. **LWT**, 40, 193-199.

Winarno, F.G. (1982). The nutritional potential of fermented food in indonesia. In **Technical Seminar on Traditional Food Fermentation as Industrial Resources in ASCA Countries**, 9-11 February, Jakata Indonesia.

Yarrow, D. (1998). Method for isolation, maintenance and identification of yeast.. In Kurtzman, C.P. and Fell, J. W. (eds), **The Yeast: A Toxonomic Stady**. (4th edition, pp. 77-100). New York: Amsterdam.

Zingare, ML., Zingare, PL., Dubey, AK. & Ansari, A. (2013). *Clitoria ternatea* (aparajita): a review of the antioxidant, antidiabetic and hepatoprotective potentials. **Int J Pharm Bio Sci**, 3(1), 203-213.

ภาคผนวก

วิธีการวิเคราะห์ Anisidine value (AOCS methods, Cd 18-90)

วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้

1. *p*-anisidine reagent เข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร เตรียมจากการชั่งสาร *p*-anisidine 0.2500 กรัม มาละลายในสาร glacial acetic acid ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร แล้วเก็บไว้ไม่ให้สัมผัสแสง

2. Test solution (a) ชั่งตัวอย่างน้ำมัน 0.500 กรัม ละลายใน trimethylpentane แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

3. Test solution (b) ดูดสารละลาย Test solution (a) มา 5.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติม *p*-anisidine reagent 1.0 มิลลิลิตร ปั่นผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไม่ให้โดนแสง

4. Reference solution. ดูดสาร trimethylpentane มา 5.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติม *p*-anisidine reagent 1.0 มิลลิลิตร ปั่นผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไม่ให้โดนแสง

วิธีการวัด

วัดค่าการดูดกลืนแสง (Abs) ของ Test solution (a) ที่ 350 nm. โดยใช้ trimethylpentane เป็น blank ได้ค่าเป็น A2

วัดค่า Abs ของ Test solution (b) ที่ 350 nm. โดยใช้ Reference solution เป็น blank ได้ค่าเป็น A1

วิธีการคำนวณค่า

จากสูตร anisidine value = $\frac{25 \times (1.2A1-A2)}{m}$

A1 = absorbance of test solution (b) at 350 nm,

A2 = absorbance of test solution (a) at 350 nm,

m = น้ำหนักของตัวอย่างใน test solution (a), หน่วยเป็น grams.

แบบทดสอบความพึงพอใจผลิตภัณฑ์เจลแต้มสิว

HEDONIC SCALING TEST

ชื่อผู้ทดสอบ .....วันที่ .....

ชื่อผลิตภัณฑ์ .....เจลแต้มสิว ชุดที่ /รหัส.....

คำชี้แจง: โปรดทำการทดสอบผลิตภัณฑ์ตัวอย่างตามลำดับที่เสนอต่อไปนี้ 181 647 194 และ390 แล้วให้คะแนนความพึงพอใจเบื้องต้นต่อคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ดังกล่าว

โดยกำหนดให้ความพึงพอใจมี 9 ระดับคะแนน ดังนี้

1=ไม่พึงพอใจมากที่สุด 2=ไม่พึงพอใจมาก 3=ไม่พึงพอใจปานกลาง 4=ไม่พึงพอใจเล็กน้อย 5=เฉย ๆ 6=พึงพอใจเล็กน้อย 7=พึงพอใจปานกลาง 8=พึงพอใจมาก 9=พึงพอใจมากที่สุด

คุณลักษณะ	**รหัสผลิตภัณฑ์**			
	181	647	194	390
สี				
กลิ่น				
ลักษณะของเนื้อเจล				
การซึมผ่านผิว				
การกระจายตัวขณะทา				
ความพึงพอใจโดยรวม				

ข้อเสนอแนะ:

.....

.....

ขอบคุณ

ภาพภาคผนวกที่ 1 แบบสอบถามทดสอบความพึงพอใจต่อลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์ของอาสาสมัคร

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณผลผลิตและค่ากรดของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ปรับปรุงโครงสร้างโดยเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ค่ากรด	Between Groups	45957.864	6	7659.644	946.937	.000
	Within Groups	283.110	35	8.089		
	Total	46240.974	41			
%Yield	Between Groups	173.238	6	28.873	89.167	.000
	Within Groups	11.333	35	.324		
	Total	184.571	41			

Duncan[a] ค่ากรด

Source of lipase	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
control	6	1.2367			
lipase AY	6	3.2283			
Pancreatic lipase	6	3.2900			
lipase M	6	3.4717			
lipase PS	6		15.7350		
lipase F-AP15	6			34.3417	
lipase D	6				99.4450
Sig.		.223	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Duncan[a] %Yield

Source of lipase	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
lipase AY	6	31.5000				
lipase M	6	31.6667	31.6667			
lipase PS	6		32 3333	32.3333		
Pancreatic lipase	6			32.5000		
control	6				35.3333	
lipase D	6					36.1667
lipase F-AP15	6					36.5000
Sig.		.615	.050	.615	1.000	.317

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

ตารางภาคผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณผลผลิตและค่ากรดของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ปรับปรุงโครงสร้างโดยเติมกลีเซอรอลและเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ค่ากรด	Between Groups	80680.354	6	13446.726	206.068	.000
	Within Groups	2283.887	35	65.254		
	Total	82964.241	41			
%Yield	Between Groups	154.238	6	25.706	6.148	.000
	Within Groups	146.333	35	4.181		
	Total	300.571	41			

Duncan[a] ค่ากรด

Source of lipase	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
control	6	2.0150				
Pancreatic lipase	6	8.1300				
lipase M	6		26.5667			
lipase AY	6		31.5867			
lipase PS	6			63.3533		
lipase F-AP15	6				95.0200	
lipase D	6					129.3917
Sig.		.198	.289	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Duncan[a] %Yield

Source of lipase	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
lipase D	6	30.3333		
Pancreatic lipase	6	31.6667	31.6667	
lipase M	6		33.3333	33.3333
lipase AY	6		34.1667	34.1667
control	6			35.1667
lipase PS	6			35.6667
lipase F-AP15	6			35.6667
Sig.		.266	.052	.085

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

ตารางภาคผนวกที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณผลผลิตและค่ากรดของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ปรับปรุงโครงสร้างโดยเอนไซม์ไลเปส D ที่เติมกลีเซอรอลระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ffa5	Between Groups	7953.595	5	1590.719	2052.997	.000
	Within Groups	23.245	30	.775		
	Total	7976.840	35			
acid5	Between Groups	62356.728	5	12471.346	2051.922	.000
	Within Groups	182.337	30	6.078		
	Total	62539.065	35			
yield5	Between Groups	1928.472	5	385.694	85.184	.000
	Within Groups	135.833	30	4.528		
	Total	2064.306	35			

Duncan **ffa5**

glycerol	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
control	6	.5800				
100 g/l	6		38.8550			
75 g/l	6			40.0200		
50 g/l	6			40.4000	40.4000	
0 g/l	6				41.1867	41.1867
25 g/l	6					41.5250
Sig.		1.000	1.000	.460	.132	.511

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Duncan **acid5**

glycerol	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
control	6	1.6233				
100 g/l	6		108.7933			
75 g/l	6			112.0550		
50 g/l	6			113.1217	113.1217	
0 g/l	6				115.3217	115.3217
25 g/l	6					116.2700
Sig.		1.000	1.000	.459	.133	.510

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Duncan **yield5**

glycerol	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
100 g/l	6	10.8333				
75 g/l	6		13.5000			
50 g/l	6			21.8333		
0 g/l	6				27.3333	
25 g/l	6				27.6667	27.6667
control	6					30.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000	.788	.067

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณผลผลิตและค่ากรดของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ปรับปรุงโครงสร้างโดยเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับพีเอชต่าง ๆ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
FFA2	Between Groups	8051.165	5	1610.233	1077.292	.000
	Within Groups	44.841	30	1.495		
	Total	8096.006	35			
Acid2	Between Groups	63122.085	5	12624 417	1077.245	.000
	Within Groups	351.575	30	11.719		
	Total	63473 660	35			
Yield2	Between Groups	125.806	5	25.161	9.455	.000
	Within Groups	79.833	30	2.661		
	Total	205.639	35			

Duncan **FFA2**

พีเอช	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
control	6	1.4617		
pH 5.0	6		38.9917	
pH 7.0	6			41 4183
pH 5.5	6			41 8367
pH 6.0	6			42.1650
pH 6.5	6			42 8800
Sig.		1.000	1.000	.066

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000

Duncan **Acid2**

พีเอช	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
control	6	4.0917		
pH 5.0	6		109.1783	
pH 7.0	6			115.9700
pH 5.5	6			117.1433
pH 6.0	6			118.0617
pH 6.5	6			120.0633
Sig.		1.000	1.000	.066

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Duncan **Yield2**

พีเอช	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
pH 7.0	6	26.5000		
pH 5.5	6	26.6667	26.6667	
pH 5.0	6	27.1667	27.1667	
pH 6.5	6	28.1667	28.1667	
pH 6.0	6		28.6667	
control	6			32.0000
Sig.		.115	.060	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณผลผลิตและค่ากรดของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ปรับปรุงโครงสร้างโดยเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
FFA3	Between Groups	8886.346	5	1777.269	1228.820	.000
	Within Groups	43.390	30	1.446		
	Total	8929.736	35			
Acid3	Between Groups	69668.585	5	13933.717	1228.445	.000
	Within Groups	340.277	30	11.343		
	Total	70008.862	35			
Yield3	Between Groups	298.556	5	59.711	17.448	.000
	Within Groups	102.667	30	3.422		
	Total	401.222	35			

Duncan **FFA3**

Concentrate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
control	6	.4417		
0.5 g/100 ml	6		37.8167	
1.0 g/100 ml	6			43.1983
1.5 g/100 ml	6			43.2767
2.0 g/100 ml	6			43.2983
2.5 g/100 ml	6			43.6450
Sig.		1.000	1.000	.564

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Duncan **Acid3**

Concentrate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
control	6	1.2367		
0.5 g/100 ml	6		105 8867	
1.0 g/100 ml	6			120.9550
1.5 g/100 ml	6			121.1750
2.0 g/100 ml	6			121.2350
2.5 g/100 ml	6			122.2050
Sig.		1.000	1.000	.564

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Duncan **Yield3**

Concentrate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
0.5 g/100 ml	6	26.6667	
1.0 g/100 ml	6	27.6667	
2.0 g/100 ml	6	28.1667	
1.5 g/100 ml	6	28.8333	
2.5 g/100 ml	6	28.8333	
control	6		35 5000
Sig.		.078	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

ตารางภาคผนวกที่ 6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณผลผลิตและค่ากรดของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ปรับปรุงโครงสร้างโดยเอนไซม์ไลเปส D ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
FFA4	Between Groups	9353.513	4	2338.378	7238.754	.000
	Within Groups	8.076	25	.323		
	Total	9361.589	29			
Acid4	Between Groups	73284.368	4	18321.092	8534.482	.000
	Within Groups	53.668	25	2.147		
	Total	73338.036	29			
Yield4	Between Groups	4901.133	4	1225.283	317.980	.000
	Within Groups	96.333	25	3.853		
	Total	4997.467	29			

Duncan **FFA4**

Temperature	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
control	6	1.5533				
30 C	6		42.3650			
40 C	6			44.1667		
50 C	6				45.6083	
60 C	6					49.2100
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Duncan **Acid4**

Temperature	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
control	6	4.3500				
30 C	6		118.6217			
40 C	6			123.6600		
50 C	6				127.4283	
60 C	6					137.8783
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Yield4

Duncan

Temperature	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
60 C	6	4.6667			
50 C	6		15.5000		
30 C	6			29.1667	
40 C	6			29.6667	
control	6				41.6667
Sig.		1.000	1.000	.663	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

ตารางภาคผนวกที่ 7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณผลผลิตและค่ากรดของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ปรับปรุงโครงสร้างโดยเอนไซม์ไลเปส D ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ffa6	Between Groups	8348.344	5	1669.669	1189.379	.000
	Within Groups	42.114	30	1.404		
	Total	8390.459	35			
acid6	Between Groups	65450.948	5	13090.190	1189.347	.000
	Within Groups	330.186	30	11.006		
	Total	65781.133	35			
yield6	Between Groups	195.333	5	39.067	5.959	.001
	Within Groups	196.667	30	6.556		
	Total	392.000	35			

Duncan **ffa6**

time	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
control	6	1.6417		
20 min	6		36.6750	
60 min	6			43.0850
40 min	6			43.2767
50 min	6			43.2983
30 min	6			43.5717
Sig.		1.000	1.000	.523

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Duncan **acid6**

time	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
control	6	4.5967		
20 min	6		102.6900	
60 min	6			120.6367
40 min	6			121.1750
50 min	6			121.2350
30 min	6			122.0017
Sig.		1.000	1.000	.523

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Duncan **yield6**

time	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
50 min	6	30.5000	
60 min	6	31.1667	
20 min	6	31.5000	
40 min	6	32.0000	
30 min	6	33.3333	
control	6		37.5000
Sig.		.096	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

ตารางภาคผนวกที่ 8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยคะแนนความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์ดลชั่นเจลแต้มสิว

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
colour	Between Groups	.500	3	.167	.638	.595
	Within Groups	9.400	36	.261		
	Total	9.900	39			
order	Between Groups	9.675	3	3.225	13.988	.000
	Within Groups	8.300	36	.231		
	Total	17.975	39			
texture	Between Groups	11.000	3	3.667	10.154	.000
	Within Groups	13.000	36	.361		
	Total	24.000	39			
absorbtion	Between Groups	9.075	3	3.025	11.000	.000
	Within Groups	9.900	36	.275		
	Total	18.975	39			
spread	Between Groups	13.275	3	4.425	11.628	.000
	Within Groups	13.700	36	.381		
	Total	26.975	39			
Overall	Between Groups	11.075	3	3.692	9.701	.000
	Within Groups	13.700	36	.381		
	Total	24.775	39			

Duncan **colour**

Formular	N	Subset for alpha = 0.05
		1
3.00	10	7.3000
4.00	10	7.4000
1.00	10	7.5000
2.00	10	7.6000
Sig.		.240

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

Duncan **order**

Formular	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1.00	10	6.1000	
2.00	10	6.4000	
4.00	10		7.1000
3.00	10		7.3000
Sig.		.171	.358

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

Duncan **texture**

Formular	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4.00	10	6.6000	
3.00	10	6.7000	
2.00	10	6.8000	
1.00	10		7.9000
Sig.		.489	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

Duncan **absorbtion**

Formular	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
4.00	10	6.5000		
3.00	10	6.6000		
2.00	10		7.1000	
1.00	10			7.7000
Sig.		.672	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10 000.

Duncan ***spread***

Formular	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3.00	10	6.4000	
4.00	10	6.4000	
2.00	10		7.5000
1.00	10		7.6000
Sig.		1.000	.719

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

Duncan **Overall**

Formular	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3.00	10	6.4000	
4.00	10	6.4000	
1.00	10		7.4000
2.00	10		7.5000
Sig.		1.000	.719

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ – นามสกุล นายฉัตรชัย สังข์ผุด (Mr. Chatchai Sungpud)

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3930500239726

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
สังกัดคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

4. สถานที่ทำงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช
ตำบลท่างิ้ว อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช
โทรศัพท์. 075-377443 โทรสาร 075-377443, 377440

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร เกียรตินิยมอันดับ 1 ปี พ.ศ. 2538 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล

ปริญญาโทวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ปี พ.ศ. 2541 จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

6. ประสบการณ์การวิจัย

ชื่อเรื่อง	ปีที่พิมพ์	สภานภาพในการวิจัย
1. การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอินในตัวทำละลายอินทรีย์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป	2542	วิทยานิพนธ์ปริญญาโท
2. การเสริมสารอาหารสำหรับการหมักไวน์กระเจี๊ยบแดง	2544	ฐานะหัวหน้าโครงการวิจัย (ทุนสภาวิจัยสถาบันราชภัฏนครศรีธรรมราช)
3. การเพาะเลี้ยงหนอนด้วงสาคูโดยใช้สูตรอาหารต่างชนิดกัน	2544	ฐานะผู้ร่วมผู้วิจัย (ทุนสภาวิจัยสถาบันราชภัฏนครศรีธรรมราช)
4. เทคโนโลยีกล้าเชื้อลูกแป้งยีสต์และกระบวนการหมักสำหรับผลิตสุราขาวจากน้ำตาลจาก	2547	หัวหน้าโครงการ (ทุน สกอ. ภาคใต้ตอนบน)

5. การพัฒนาประสิทธิภาพของถังกลั่นสุราชุมชน	2547	ฐานะผู้ร่วมวิจัย (ทุน สกอ. ภาคใต้ตอนบน)
6. ผลผลิต องค์ประกอบและการใช้ประโยชน์ของน้ำหวานต้นจากในเขตพื้นที่ลุ่มน้ำปากพนัง	2551	หัวหน้าโครงการ (ทุน วช. 2551)
7. ปริมาณและคุณสมบัติของเพคตินจากเปลือกผลไม้	2551	ฐานะผู้ร่วมวิจัย (ทุน วช. 2551)
8. วัฒนธรรมอาหารและข้อมูลทางโภชนาการของทรัพยากรชีวภาพภายในชุมชนประมงอ่าวนครศรีธรรมราช	2552-53	หัวหน้าโครงการ (ทุน วช. 2552-2553)

7. ประวัติการแต่งตำรา

ฉัตรชัย สังข์ผุด. (2551). **เอกสารประกอบการสอนรายวิชาหลักการวิเคราะห์อาหาร.** นครศรีธรรมราช : มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช.

ฉัตรชัย สังข์ผุด. (2551). **จุลชีววิทยาทางอาหาร (Food Microbiology).** นครศรีธรรมราช : มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช.

ฉัตรชัย สังข์ผุด. (2555). **ถอดบทเรียนการบริการวิชาการ เรื่อง ระบบนิเวศวิทยา : ความหลากหลายของพืชผักป่าและปลาน้ำตก.** นครศรีธรรมราช : มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช.

ฉัตรชัย สังข์ผุด. (2557). **การควบคุมและประกันคุณภาพอาหาร.** นครศรีธรรมราช : มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช.

8. งานวิจัยที่ตีพิมพ์

H-Kittikun A, Prasertsan P, **Sungpud C.** Continuous Production of Fatty Acid from Palm Olein by Immobilized Lipases in Two-Phase System. **J. Am. Oil Chem. Soc**. 2000; 77: 599-603.

ฉัตรชัย สังข์ผุด และจีราภรณ์ สังข์ผุด. (2547). **เทคโนโลยีกล้าเชื้อลูกแป้งยีสต์และกระบวนการหมักน้ำตาล จากสำหรับผลิตสุราขาว.** นครศรีธรรมราช: มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช.

ฉัตรชัย สังข์ผุด และจีราภรณ์ สังข์ผุด. (2548). สภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักน้ำตาลจากด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5606 เพื่อผลิตสุราขาว. **วารสารฉบับพิเศษการประชุมวิชาการว่าด้วยเศรษฐกิจชุมชนแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 1 ยุทธศาสตร์การพัฒนาเศรษฐกิจชุมชมบนรากฐานความรู้.** 8-9 ธันวาคม 2548. (pp. 234-242). เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ฉัตรชัย สังข์ผุด และจีราภรณ์ สังข์ผุด (2548). การพัฒนาลูกแป้งยีสต์บริสุทธิ์สำหรับหมักน้ำตาลจากเพื่อผลิตสุราขาว. **วารสารฉบับพิเศษ การประชุมวิชาการว่าด้วยเศรษฐกิจชุมชนแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 1 ยุทธศาสตร์การพัฒนาเศรษฐกิจชุมชมบนรากฐานความรู้.** 8-9 ธันวาคม 2548.(pp. 243-251). เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ฉัตรชัย สังข์ผุด และจีราภรณ์ สังข์ผุด. (2550). สมบัติทางเคมีและกายภาพของเพคตินผงจากส้มโอ. ใน **เอกสารการประชุมวิชาการ เครือข่ายสถาบันอุดมศึกษาทั่วประเทศ ปี 2551 "เทคโนโลยีสู่ชุมชนเพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืน"** 17-19 มกราคม 2551. (pp. 403-409) ขอนแก่น: เครือข่ายบริหารการวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชนภาคตะวันออกเฉียงเหนือร่วมกับมหาวิทยาลัยขอนแก่น.

จีราภรณ์ สังข์ผุด ฉัตรชัย สังข์ผุด พนิดา บุญช่วยแก้ว และจีระยุ ราชกิจจา. (2550). ผลของน้ำตาลจาก น้ำกากส่าจากโรงงานสุรากลั่น แมกนีเซียมซัลเฟต และค่าความเป็นกรด-ด่างต่อผลผลิตวุ้นมะพร้าว. ใน **เอกสารการประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 17 ปี 2550 "การวิจัยเพื่อพัฒนาคุณภาพชีวิตอย่างยั่งยืน"** 20-21 กันยายน 2550. (pp.31-32) พัทลุง: มหาวิทยาลัยทักษิณ.

ฉัตรชัย สังข์ผุด จีราภรณ์ สังข์ผุด และจันทิรา วงศ์วิเชียร. (2552). ผลผลิตและองค์ประกอบของน้ำหวานจากในเขตพื้นที่ลุ่มน้ำปากพนัง. ใน **เอกสารการประชุมวิชาการ เครือข่ายสถาบันอุดมศึกษาทั่วประเทศ ปี 2552 "เศรษฐกิจฐานความรู้กู้วิกฤตชาติ"** 2-4 เมษายน 2552. (pp.82-92) นครศรีธรรมราช: เครือข่ายการวิจัยและนวัตกรรมเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชนฐานราก สกอ.ภาคใต้ตอนบน (มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์: แม่ข่าย) ร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (สกอ.)

จีราภรณ์ สังข์ผุด และฉัตรชัย สังข์ผุด. (2552). ปริมาณของเพคตินผงที่สกัดจากเปลือกผลไม้. ใน **เอกสารการประชุมวิชาการ เครือข่ายสถาบันอุดมศึกษาทั่วประเทศ ปี 2552 "เศรษฐกิจฐานความรู้กู้วิกฤตชาติ"** 2-4 เมษายน 2552. (pp.240-246) นครศรีธรรมราช: เครือข่ายการวิจัยและนวัตกรรมเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชนฐานราก สกอ.ภาคใต้ตอนบน (มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์: แม่ข่าย) ร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (สกอ.)

ฉัตรชัย สังข์ผุด และจันทิรา วงศ์วิเชียร. (2553). ความปลอดภัยทางอาหารของทรัพยากรชีวภาพในชุมชนประมงอ่าวนครศรีธรรมราช. **วารสารวิชชา** 29 (2): 65-75.

ฉัตรชัย สังข์ผุด. (2557). ผลของการเสริมกล้าเชื้อต่อการสกัดน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ด้วยวิธีการหมัก. **วารสารวิชชา** 33 (1): 26-38.

ฉัตรชัย สังข์ผุด จีราภรณ์ สังข์ผุด และชุตินุช สุจริต. (2558). สภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ด้วยวิธีการหมัก. ใน **เอกสารการประชุมวิชาการ การประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัย ทักษิณ ครั้งที่ 25 "วิจัยไทยเพื่ออนาคต"** วันที่ 10-12 มิถุนายน 2558 ณ หอประชุมปาริชาต มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตสงขลา หน้าที่ 21-28.

จีราภรณ์ สังข์ผุด และฉัตรชัย สังข์ผุด. (2558). การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพและเคมีของมังคุดคัดตัดแต่งพร้อมบริโภค. ใน **การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและนานาชาติ ราชภัฏวิจัย ครั้งที่ 3 "สหวิทยาการ งานวิจัย และนวัตกรรมอุดมศึกษา เพื่อการพัฒนาท้องถิ่นไทย ก้าวไกลสู่อาเซียน"** วันที่ 20-22 พฤษภาคม 2558 ณ มหา- วิยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช หน้าที่ 48-59.