รหัสโครงการ SUT3-304-52-36-29

# รายงานการวิจัย

# การปรับโครงสร้างของคอมโปซิทระหว่างเปคตินและไบโอโพลีเมอร์ เพื่อการประยุกต์ทางอุตสาหกรรมอาหาร

# (Restructuration of Pectin / Biopolymer Composite for Application in Food Industry)

**ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก**
**มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี**

**ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว**

รหัสโครงการ SUT3-304-52-36-29

**รายงานการวิจัย**

# การปรับโครงสร้างของคอมโปซิทระหว่างเปคตินและไบโอโพลีเมอร์ เพื่อการประยุกต์ทางอุตสาหกรรมอาหาร

# (Restructuration of Pectin / Biopolymer Composite for Application in Food Industry)


**คณะผู้วิจัย**

**หัวหน้าโครงการ**

**รองศาสตราจารย์ ดร. โชคชัย วนภู**

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



**ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2553**

**ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว**

กุมภาพันธ์ 2556

# กิตติกรรมประกาศ

กระผมขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่สนับสนุนทุนวิจัย ซึ่งการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุร-นารี ปีงบประมาณ 2553 รวมถึงได้ให้การสนับสนุนด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ บุคลากรและสถานที่ในการดำเนินการวิจัย ขอขอบคุณ นางสาวณัฐวรรณ เลิศภิญโญชัยถาวร และ นายอภิวัฒน์ สัตย์ซ้ำ ที่ช่วยทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

รศ.ดร. โชคชัย วนภู

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทคัดย่อ

การปรับโครงสร้างของคอมโปซิทระหว่างเปคตินและไบโอโพลีเมอร์ เพื่อการประยุกต์ทางอุตสาหกรรมอาหาร

เปคตินเป็นสารที่มีคุณค่าทางอาหารและมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมของไทยนำเข้าเปคตินจากต่างประเทศที่มีราคาค่อนข้างแพง นอกจากนี้ยังขาดเทคโนโลยีการดัดแปลงโครงสร้างเปคตินเพื่อให้เกิดคุณสมบัติใหม่ๆ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีการสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุดและทำคอมโปซิทระหว่างเปคตินและไบโอพอลิเมอร์ โดยการสกัดได้ผลผลิต (% yield) ดีที่สุดโดยการสกัดเปลือกส้มโอใช้กรดซิตริกความเข้มข้น 1.0M จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 4.5 ผลปรากฏว่าเปคตินเกิดการจับตัวเป็นก้อนแข็งตามความเข้มข้นของกรดซิตริกที่ใช้สกัด เมื่อนำสารสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอไปวิเคราะห์ทางกายภาพและเคมี พบว่า เปคตินจากเปลือกส้มโอมีปริมาณโปรตีน (1.53%) สูงกว่าสารสกัดเปคตินทางการค้า (1.40%) เล็กน้อย เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของน้ำตาล พบว่า สารสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอมีปริมาณอะราบิโนส (0.085 กรัมต่อลิตร) กาแลคโตส (0.090 กรัมต่อลิตร) สูงกว่าเปคตินทางการค้า แต่มีปริมาณแรมโนส (0.030 กรัมต่อลิตร) และ กลูโคส (0.102 กรัมต่อลิตร) ต่ำกว่าสารสกัดเปคตินทางการค้า (อะราบิโนส 0.059, กาแลคโตส 0.048, แรมโนส 0.032 และกลูโคส 0.9 กรัมต่อลิตร) นอกจากนี้สารสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอยังมีปริมาณเมทานอลอยู่ที่ 355.50 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณความชื้นที่ต่ำกว่า อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นเดียวกัน สารละลายเปคตินจากเปลือกส้มโอมีค่าความหนืดต่ำกว่าสารละลายเปคตินทางการค้า เมื่อทำการศึกษาลักษณะโครงสร้างภายนอกของผลึกเปคตินพบว่า ผลึกเปคตินจากเปลือกส้มโอมีความละเอียดมากกว่าผลึกเปคตินทางการค้า อีกทั้งสารสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอมีความบริสุทธิ์กว่าเปคตินทางการค้าเมื่อทำการทดสอบการดูดคลายความร้อนและวิเคราะห์หมู่ functional ด้วยเครื่อง FT-IR และจากการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ พบว่า สารละลายเปคตินจากเปลือกส้มโอที่ความเข้มข้น 60 ppm มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* และ แบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ *Serratia marcescens* ได้ ในขณะที่สารละลายเปคตินทางการค้าจากพืชตระกูลส้มมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ *Klebsiella pneumoniae* และ *S. marcescense* ได้ แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis, Enterococcus faecalis* และ *Staphylococcus aureus* จากนั้นได้ทำการศึกษาการทำคอมโปซิทระหว่างเปคตินกับไบโอพอลิเมอร์ชนิดพอลิแลคติคแอซิด (PLA) พบว่า เปคตินมีความสามารถในการเพิ่มความสามารถต่อต้านแรงดึง

และความยืดหยุ่นของวัสดุก่อนการเปลี่ยนสภาพได้ค่อนข้างดี แต่ทำให้เปอร์เซ็นต์การยืดตัวก่อนขาดลดลงเมื่อมีการเพิ่มปริมาณเปคติน ซึ่งจากการทดลองนี้สามารถที่จะนำข้อมูลไปศึกษาต่อหรือมีการพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์เพื่อใช้เป็นฟิล์มสำหรับอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

คำสำคัญ : เปคติน, ไบโอพอลิเมอร์, คอมโปซิท

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# Abstract

Restructuration of Pectin / Biopolymer Composite for Application in Food Industry

Pectin is a functional food and widely used in food industry. Thai industries import pectin with expensive cost. Besides, it is lack of some structural pectin modification technology for new properties. Therefore, this research aimed to extract the highest yield of pectin from pomelo peel obtained using different extraction conditions and created composit between pectin and biopolymer. The highest yield of pectin extraction used 1.0M citric acid at pH4.5 then pectin extracted was become chunk directly change with citric acid concentration. Physicochemistry of extracted pectin from pomelo peel, protein (1.53%), arabinose (0.085 g/L) and galactose (0.090 g/L) are higher than their commercial pectin (1.40%, 0.059 g/L and 0.048 g/L, respectively) except for rhamnose and glucose (extracted pectin, rhamnose 0.030 g/L and glucose 0.102 g/L; commercial pectin, rhamnose 0.032 g/L and glucose 0.9 g/L). Moreover, extracted pectin has 355.50 g/L methanol, lower moisture content. However, the pomelo pectin showed lower viscosity than commercial pectin at the same concentration. The results of SEM, DSC and FT-IR presented that extracted pectin crystal structure was fine and more purify than commercial pectin. For microbial inhibition test, at 60 ppm, extracted pectin has microbial growth inhibition of gram positive bacterial strain *Bacillus subtilis* and gram negative bacterial strain *Serratia marcescense*. Although commercial pectin can inhibit growth of gram negative bacterial strains *Klebsiella pneumoniae* and *S. marcescense*, gram positive bacterial strains *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* can grow up. In addition, pectin adding to biopolymer type polylactic acid (PLA) has ability to increase tensile strength and improved Young's modulus except for elongation at break was decreased. From this study, information can used to produce or improve film or new product for food industry.

Keywords : Pectin, Biopolymer, Composit

**สารบัญ**

**หน้า**

กิตติกรรมประกาศ.....ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ง
สารบัญ.....จ
สารบัญตาราง.....ฉ
สารบัญภาพ.....ช
บทที่ 1 บทนำ.....1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....6
ขอบเขตของโครงการวิจัย.....6
บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....8
วัสดุและสารเคมี.....8
การเตรียมและวิธีการสกัดตัวอย่าง.....9
การทดสอบและวิเคราะห์คุณสมบัติของเปคติน.....10
การทำคอมโปซิทระหว่างเปคตินและไบโอพอลิเมอร์.....12
บทที่ 3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....13
ผลของการสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอด้วยสารละลายกรด.....13
ผลการทดสอบและวิเคราะห์คุณสมบัติของเปคติน.....18
ผลการทำคอมโปซิทระหว่างเปคตินและไบโอพอลิเมอร์.....27
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง.....33
เอกสารอ้างอิง.....34
ประวัติผู้วิจัย.....37

**สารบัญตาราง**

**ตาราง** **หน้า**

3.1 ลักษณะของเปคตินที่สกัดด้วยสารละลายกรดซิตริก ปรับความเป็นกรดด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้ได้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4.5.....18

3.2 ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลในตัวอย่างเปคตินทางการค้า และสารสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอ.....19

3.3 ค่า Inhibition zone ของสารสกัดเปคตินต่อเชื้อแบคทีเรีย.....20

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# สารบัญรูปภาพ

**รูป** **หน้า**


3.1 ลักษณะของสารสกัดเปคตินที่สกัดได้จากเปลือกส้มโอจากกรดชนิดต่างๆ
(a) 0.1M Citric acid (b) 0.5M Citric acid (c) 1.0M Citric acid
(d) 0.1M Oxalic acid (e) 0.5M Oxalic acid (f) 1.0M Oxalic acid
(g) 0.1M Hydrochloric acid (h) 0.1M Nitric acid.....16

3.2 ภาพแสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอ และสารสกัดเปคตินทางการค้า (A) เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis*
(B) เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Klebsiella pneumoniae*
(C) เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Serratia marcescens*……..……21

3.3 กราฟแสดงค่าการดูดคลายความร้อนด้วยเครื่อง DSC ของสารสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอ.....22

3.4 กราฟแสดงค่าการดูดคลายความร้อนด้วยเครื่อง DSC ของสารสกัดเปคตินทางการค้าจากพืชตระกูลส้ม.....23

3.5 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์หมู่ functional ด้วยเครื่อง FTIR…….24

3.6 ลักษณะโครงสร้างภายนอกของผลึกเปคตินด้วยกล้อง SEM (1) ผลึกเปคตินที่สกัดจากเปลือกส้มโอ (2) ผลึกเปคตินทางการค้าจากพืชตระกูลส้ม……...26

3.7 การผสมพลาสติก PLA กับเปคตินที่ความเข้มข้นต่างๆ……27

3.8 การขึ้นรูปคอมโปซิทเพื่อทดสอบคุณสมบัติต่างๆ……28

3.9 กราฟแสดงค่าความต่อต้านแรงกระแทกที่ปริมาณเปคตินที่แตกต่างกัน……...29

3.10 กราฟแสดงค่าความแข็งของผิวสัมผัสที่ปริมาณเปคตินที่แตกต่างกัน……...30

3.11 กราฟแสดงค่าความต่อต้านแรงดึง (Tensile strength) ที่ปริมาณเปคตินที่แตกต่างกัน……..31

3.12 กราฟแสดงค่าเปอร์เซนต์การยืดตัวก่อนขาด (Elongation at break) ที่ปริมาณเปคตินที่แตกต่างกัน…….31

3.13 กราฟแสดงค่าคงที่ความยืดหยุ่นของวัสดุก่อนการเปลี่ยนสภาพ (Young's modulus) ที่ปริมาณเปคตินที่แตกต่างกัน……..…32

# บทที่ 1
# บทนำ

**ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย**

เปคติน (pectin) เป็นสารโพลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ทำให้อาหารมีความยืดหยุ่น คงตัว มันวาว น่ารับประทาน เปคตินยังจัดเป็น functional food หรือสารที่มีคุณค่าทางอาหาร ที่สำคัญ มีเยื่อใยสูง สามารถช่วยลดปริมาณโคเลสเตอรอล (cholesterol) ระดับน้ำตาลในกระแสเลือด โดยเปคตินจะไปจับกับกรดน้ำดี (bile acid) ที่เกิดจากการเมตาบอซึมของโคเลสเตอรอลโดยมีวิตามินซีเป็นตัวช่วย เปคตินยังมีฤทธิ์ต้านการเกิดมะเร็ง (Yamada, 1996; Yamada *et al*., 2003) เปคตินสามารถเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็งลำไส้ (Olano-Martin *et al*., 2003)

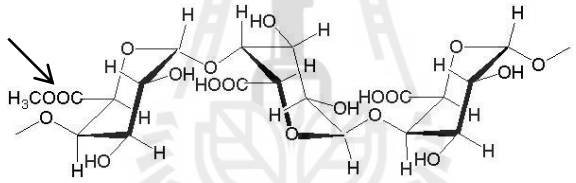
ในปัจจุบันความนิยมของการใช้เปคตินมีกันทั่วโลก โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อทำเป็นเจลและรักษาสภาพอาหารให้คงที่ ชาวตะวันตกนิยมบริโภคเปคตินโดยเฉลี่ยประมาณ 4-5 กรัมต่อคนต่อวัน (Pilnik, 1990) ทั่วโลกนิยมบริโภคประมาณปีละ 45 ล้านกิโลกรัม สร้างรายได้มากกว่า 400 ล้านยูโร (Savary *et al*., 2003) ด้วยคุณสมบัติการเป็นเจลที่ดีจึงนิยมนำมาทำเป็นแยม (jam) เจลลี่ (jelly) และส่วนผสมในอาหารต่างๆ เช่น น้ำผลไม้ เบเกอรี่ โยเกิร์ท นมปรุงแต่ง ด้วยลักษณะโครงสร้างและความสามารถในการสร้างเป็นเจลจะมีการเปลี่ยนแปลงได้บ้างตามชนิดพืช แต่ส่วนมากแล้วโครงสร้างของเปคตินของแต่ละพืชจะมีโครงสร้างพื้นฐานที่เหมือนกัน เปคตินสามารถสกัดได้จากพืชต่างๆ เช่น เปลือกส้ม กากแอปเปิล กากมะเขือเทศ เป็นต้น

เปคตินมีความสำคัญทางอุตสาหกรรมอาหารมาก มีราคาแพง ประมาณ 800-1200 บาทต่อกิโลกรัม ในประเทศไทยคาดว่ามีการนำเข้าจากต่างประเทศไม่น้อยกว่าปีละหลายพันล้านบาท ทั้งๆ ที่สามารถผลิตได้ง่ายจากเศษและเปลือกผลไม้ที่มีอยู่อย่างมากมาย เช่น มะเขือเทศ ส้มโอ เป็นต้น ที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋อง อุตสาหกรรมผลไม้แปรรูป รวมทั้งตามบ้านเรือน เป็นต้น ประการที่สองไทยยังขาดเทคโนโลยีการดัดแปรโครงสร้างเปคตินเพื่อก่อให้เกิดคุณสมบัติชนิดใหม่ๆ เนื่องจากโครงสร้างของเปคตินมีความสลับสับซ้อนแต่มีหมู่ทางเคมีพื้นฐาน ได้แก่ หมู่คาร์บอกซิลิก (carboxylic group) หมู่เมธิลเอสเตอร์ (methyl ester group) และหมู่เมธิลเอมายด์ (methyl amide group) บนสายน้ำตาลหลายๆชนิด ทำให้ง่ายต่อการดัดแปรหรือเชื่อมต่อกับโครงสร้างไบโอโพลีเมอร์ (Biopolymers) อื่นๆ ซึ่งจะทำให้ได้โครงสร้างหรือเจลชนิดใหม่ๆ และมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งจะช่วยส่งเสริมและผลักดันให้เกิดการพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตเปคตินและเปคตินดัดแปรจากเศษวัสดุและเปลือกผลไม้ที่ไม่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ ก่อให้เกิดรายได้ทั้งระดับเล็กและใหญ่ได้เป็นอย่างดี ก่อให้เกิดการใช้ทรัพยากรทางธรรมชาติสูงสุดและรักษาสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสม

ด้วยเหตุนี้นักวิจัยจึงมีความสนใจในการปรับโครงสร้างของคอมโปซิทระหว่างเปคตินและไบโอโพลีเมอร์เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหาร

เปคตินเป็นโพลิแซคคาไรด์ของกรดกาแลคทูโรนิก (galacturonic acid, GalA) ประมาณ 65% โดยมีหมู่คาร์บอกซิลิก (carboxylic group) ที่อาจถูกแทนที่ด้วยหมู่เมธิลเอสเตอร์ (methyl ester) หรือเกลือในรูปของโซเดียม แคลเซียม หรือ แอมโมเนีย โครงสร้างของเปคตินอาจมีหมู่เอมายด์ (amide group) ร่วมอยู่ด้วย

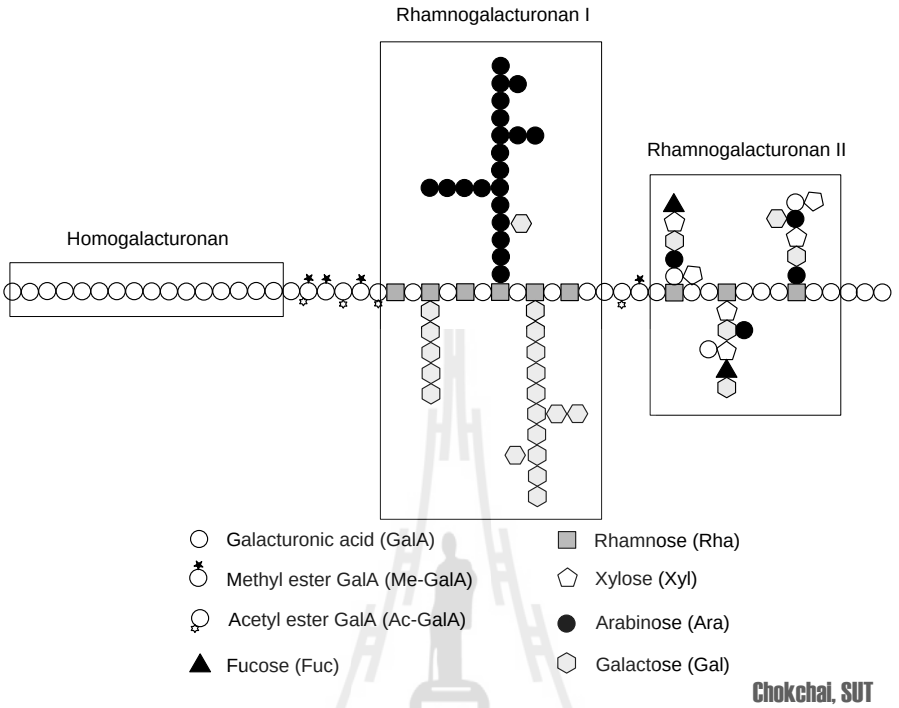
เปคตินสามารถสกัดได้จากพืชที่มีลักษณะเนื้อเยื่อนุ่มๆ โดยเปคตินจะถูกฝังอยู่บริเวณผนังเซลล์อยู่ร่วมกับโพลีเมอร์อื่นๆ เช่น เซลลูโลส (cellulose) และเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) คุณสมบัติพื้นฐานของเปคตินถูกค้นพบมานานมากกว่า 200 ปีแล้ว แต่องค์ความรู้ด้านโครงสร้างที่มีความสลับซับซ้อนรวมทั้งการถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพิ่งจะมีการค้นพบเมื่อไม่นานมานี่เอง โดยการใช้เทคนิคทางชีวเคมี โครงสร้างทางเคมีของเปคตินจึงสามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วน คือ ส่วนเรียบ (smooth regions) ที่ประกอบด้วยกรดกาแลคทูโรนิกเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ $\alpha$-1,4 เรียกว่า Homogalacturonan มีโครงสร้างเสมือนเป็นสันหลังของเปคติน (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างพื้นฐานของโฮโมกาแลคทูโรแนนเสมือนเป็นสันหลังของโครงสร้างเปคตินและตำแหน่งการเติมหมู่เมธิลที่หมู่คาร์บอกซิลิก (ลูกศร)

ส่วนที่สอง เรียกว่า ส่วนขน (hairy regions) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลหลายๆ ชนิด เช่น แรมโนส (rhamnose, Rha) กาแลคโตส (galactose, Gal) อาราบิโนส (arabinose, Ara) ไซโรส (xylose, Xyl) ฟิวโคส (fucose, Fuc) และน้ำตาลชนิดอื่นๆ เรียงต่อกันเป็นสายสั้นๆ บนสายของส่วนเรียบ (สันหลัง) โดยเรียกรวมๆ ว่า Rhamnogalacturonan (ดังรูปที่ 2) ในส่วนขนนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ Rhamnogalacturonan I (RGI) ประกอบด้วยน้ำตาล 2 ชนิด คือ กรดกาแลคทูโรนิก และ แรมโนสเรียงซ้ำๆ กันเป็นโครงสร้างสันหลัง และมีแขนงที่ประกอบด้วยอาราบิโนสและกาแลคโตส ชนิดที่สองเรียกว่า Rhamnogalacturonan II (RGII) มีโครงสร้างสันหลังเหมือนกับ RGI แต่มีสายน้ำตาลหลายชนิดต่อเป็นแขนจำนวนมาก และมีองค์ประกอบค่อนข้างคงที่ในแต่ละพืช ระหว่างแต่ละส่วนของโครงสร้างสันหลังอาจมีการเติมหมู่เมธิลและอะเซติลที่หมู่คาร์บอกซิลิกของกรดกาแลคทูโรนิกได้เป็นเมธิลเอสเตอร์หรือหมู่เมธอซิล (methoxyl group) และอะเซติลเอสเตอร์ (Me-GalA และ Ac-GalA ตามลำดับ) (Yapo *et al*., 2007) จากโครงสร้างเปคตินที่มีหมู่เมธิลเอสเตอร์และอะเซททิล-

เอสเตอร์นี่เอง จึงทำให้สามารถวัดระดับการเกิดปฏิกิริยาในค่าของ degree of methylesterification (DE) และ degree of acetylation (DA) ได้




รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างพื้นฐานของเปคตินประกอบด้วยส่วนเรียบและส่วนขน

ในการทำให้เปคตินเป็นเจลจะต้องละลายเปคตินในน้ำร้อน ความร้อนทำให้เกิดการเชื่อมพันธะไฮโดรเจนเกิดเป็นร่างแห่ห่อหุ้มน้ำไว้ คุณสมบัติการเกิดเจลนี้จึงขึ้นกับองค์ประกอบในโครงสร้างโดยเฉพาะส่วนขนที่มีส่วนยื่นออกมาจากสันหลัง และปริมาณหมู่เมธิลเอสเตอร์/หมู่อะเซททิลเอสเตอร์ หรือค่า DE และ DA รวมทั้งค่า pH, ปริมาณน้ำตาลในสารละลายเปคติน อย่างไรก็ตามมีการพบว่า ความแข็งแรงของพันธะที่ใช้ยึดเหนี่ยวเพื่อทำให้เกิดเจลนี้เกิดจากหมู่เมธิลเอสเตอร์เป็นหลัก นอกจากนี้ยังมีอิทธิพลมาจากปริมาณน้ำตาลในสารละลายเปคติน, ปริมาณกรด และปริมาณอิออนประจุบวก เช่น แคลเซียมอิออน ที่ช่วยเชื่อมพันธะคาร์บอกซิลิกเข้าด้วยกันอีกด้วย จึงทำให้เจลมีความหนืดและยืดหยุ่น เช่น เปคตินที่ได้จากมะนาวมีค่า DE ประมาณ 81% ซึ่งมีหมู่เมธิล-เอสเตอร์มาก เป็นเจลได้ดีในสภาวะกรด (Willats *et al*., 2006)

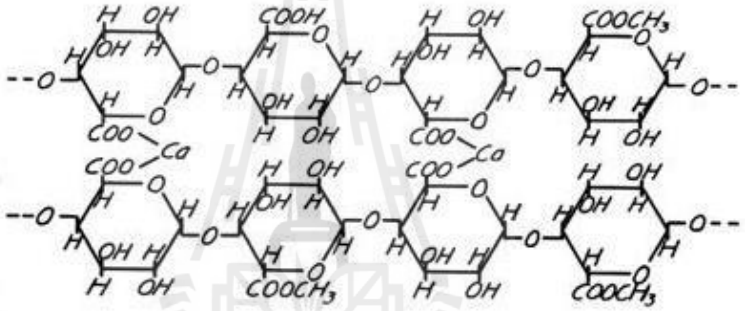
ทางอุตสาหกรรมอาหารจึงได้แบ่งประเภทของเปคตินออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่

(1) เปคตินชนิดเมธิลเอสเตอร์สูง (High methyl ester pectin หรือ High methoxyl pectin, HM pectin)

เป็นเปคตินธรรมชาติที่มีค่า DE สูง หรือมีหมู่เมธิลเอสเตอร์สูงกว่า 7% ทำให้เกิด hydrophobic interaction และการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับน้ำและโมเลกุลด้วยกันเองได้มาก จึงทำให้เกิดเป็นเจลได้ช้า จำเป็นต้องใช้น้ำตาลและกรดเป็นจำนวนมากมาช่วย

(2) เปคตินชนิดเมธิลเอสเตอร์ต่ำ (Low methyl ester pectin หรือ Low methoxyl pectin, LM pectin)

เปคตินชนิดนี้ได้มาจากเปคตินชนิดแรกนำมาเติมกรดหรือด่างอ่อนเพื่อลดหมู่เมธิลที่ตำแหน่งคาร์บอกซิลิก ทำให้มีค่า DE ต่ำ หรือมีหมู่เมธิลเอสเตอร์อยู่ระหว่าง 3-7% จึงมีแรง hydrophobic interaction ต่ำ หมู่เมธิลเอสเตอร์สามารถหันออกมารับประจุบวกชนิด 2+ (dications) ได้ดี เช่น $Ca^{2+}$ (ดูรูปที่ 3) จึงสามารถทำให้เป็นเจลได้ง่าย ใช้ความร้อนต่ำและไม่ต้องใช้น้ำตาลหรือกรดมาช่วย ผู้ผลิตบางรายนิยมเรียกว่าเปคตินน้ำตาลต่ำ (Low sugar pectin) ทำให้เป็นที่นิยมบริโภคมากกว่าชนิด HM



รูปที่ 3 แสดงการจับกันระหว่างสายเปคตินด้วยโมเลกุลของแคลเซียม (http://obiolla.com/bloodorange.aspx)

(3) เปคตินอะมิเดท (Amidated pectin)

เปคตินชนิดนี้ได้มาจากเปคตินชนิดแรกแล้วเติมแอมโมเนียในสภาวะด่างอ่อน เพื่อลดการเกิดเอสเตอร์ ทำให้ตำแหน่งคาร์บอซิลิกมีหมู่เอมายด์ เรียกว่ากรดเอมายด์ (acid amide) ซึ่งสามารถทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ได้ดี ทำให้ได้เปคตินที่มีความสามารถควบคุมค่า pH ในอาหารได้ดี มีคุณสมบัติการเป็นเจลคงที่ และการอ่อนตัวไม่ขึ้นกับปริมาณน้ำตาลเหมือนสองชนิดแรก

การสกัดเปคตินจากผลไม้สามารถทำได้ด้วยการต้มเปลือก ใย และเศษผลไม้ในน้ำเดือดนานตามแต่ละชนิดของผลไม้ โดยอาจมีการเติมเกลือของแคลเซียมหรือสารเคมีบางชนิดเพื่อช่วยในการสกัด จากนั้นทำให้เย็นแล้วแยกกากทิ้ง น้ำที่ได้นำมาเติมแอลกอฮอล์ เปคตินก็จะตกตะกอนจับเป็นก้อน แล้วจึงล้างทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์อีกหลายๆ ครั้ง จากนั้นจึงนำไปอบแห้งในสุญญากาศแล้วนำมาบด จะได้เปคตินชนิดไม่ละลายในแอลกอฮอล์หรือเรียกว่า alcohol-insoluble solids (AIS)

เปคตินนี้มักเป็นชนิด HM การทำเจลเปคตินสามารถทำได้ง่าย โดยนำเปคตินผงมาละลายน้ำ แล้วต้มให้สุก จากนั้นเติมเครื่องปรุงรส สี ผลไม้ หรือน้ำตาลแล้วเทลงแม่พิมพ์หรือบนอาหาร ทิ้งไว้ให้เย็นก็จะได้เจลที่มีลักษณะเหนียว ยืดหยุ่น น่ารับประทาน

เปคตินสามารถถูกดัดแปรโครงสร้างหรือย่อยสลายได้ด้วยสารเคมีหลายชนิด เช่น กรด ด่าง สารละลายอินทรีย์ และเอนไซม์ (Pectinolytic enzymes) เป็นต้น ในทางอุตสาหกรรมเอนไซม์ที่สำคัญมี 2 ชนิด คือ

(1) เปคตินเอสตาเรส (Pectinestarase, PE) สามารถตัดหมู่เมธิลของเปคติน สามารถสกัดเอนไซม์ได้จากผลไม้และเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด นิยมใช้เพื่อลดความหนืด ความขุ่นของน้ำผลไม้ที่เกิดจากเปคติน

(2) โพลีกาแลคทูโรเนส (Polygalacturonase, PG) สามารถตัดสายสันหลังของเปคตินทำให้สายเปคตินขาดเป็นเส้นสั้นๆ

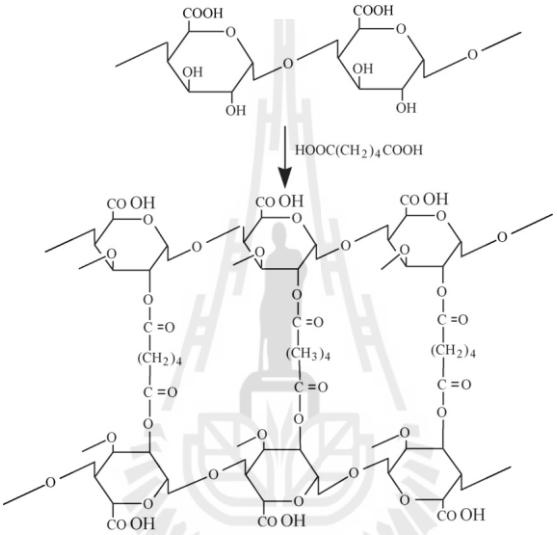
Koubala และคณะ (2007a) ได้ศึกษาคุณสมบัติของเปคตินที่สกัดได้จากเปลือกแอปเปิลเขียว (Ambarella) ที่ได้จากของเสียโรงงานผลิตน้ำแอปเปิล เปคตินที่ได้เป็นชนิดไม่ละลายในแอลกอฮอล์ แล้วนำมาดัดแปลงโครงสร้างด้วยกรด HCl, กรดออกซาลิก (oxalic acid) พบว่าให้ปริมาณและคุณภาพดีพอๆ กับเปคตินที่ผลิตในเชิงอุตสาหกรรมจากมะนาว คณะของ Koubala ยังได้ทำการหาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของเปคตินจากเปลือกมะม่วงด้วยเทคนิคเดียวกัน พบว่าให้เจลที่มีคุณสมบัติดีกว่าทางการค้า (Koubala *et al*., 2007b)

Grizotto และคณะ (2007) ได้ใช้อัลจิเนทและกลีเซอรอลมาปรับโครงสร้างเปคตินที่สกัดได้จากสับปะรด มีผลทำให้ได้เปคตินที่มีความแข็งมากขึ้น Kratchanova และคณะ (2004) ได้ใช้คลื่นไมโครเวฟให้ความร้อนกับกระบวนการสกัดเปคตินจากส้ม พบว่าคลื่นไมโครเวฟสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เปคติเนส จึงทำให้ได้ผลผลิตสูงมากกว่ากระบวนการสกัดเดิม เปคตินจากธรรมชาติความสามารถทำให้แข็งตัวมากขึ้น พบว่าขึ้นกับปริมาณอิออนบวก โดยเฉพาะ $Ca^{2+}$ (Norziah *et al*., 2001; Gilsenan *et al*., 2003a; 2003b)

เปคตินสามารถเชื่อมกับโพลีเมอร์อื่นๆได้เป็นอย่างดี เช่น เจลาติน (gelatin) โดยมีน้ำตาลซูโคสและกลูโคสเป็นตัวควบคุมคุณสมบัตทางเคมีกายภาพของเจล (Al-Ruqaie *et al*., 1997) เปคตินสามารถเชื่อมกับ poly(vinyl alcohol) ได้เป็นเปคตินใหม่ที่มีค่า glass transition temperature (Tg) เพิ่มขึ้นมากและสามารถทำเป็นแผ่นฟิล์มบางๆได้ (Fishman and Coffin, 1998) ล่าสุดพบว่าเปคตินสามารถจับกับแป้งมันสำปะหลังในระหว่างการต้มได้ อย่างไรก็ตามเมื่อต้มที่อุณหภูมิสูงใกล้จุดเดือดพบว่าโครงสร้างที่เชื่อมกันหลุดและมีการกรดกาแลคทูโรนิกหลุดออกมาเป็นจำนวนมาก (Menoli and Beleia, 2007)

Liu และคณะ (2004) ได้ศึกษาทำคอมโปซิทระหว่างเปคตินกับ poly(lactile-co-glycolide) ได้เป็นโครงสร้างโพลีเมอร์ที่มีลักษณะรูพรุนและมีความยืดหยุ่น สามารถใช้เป็นกระดูกอ่อนเทียมได้ อย่างไรก็ตามโพลีเมอร์ที่นำมาใช้ต้องละลายในคลอโรฟอร์มจึงไม่สามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ Morris และคณะ (2002) ได้ดัดแปลงโครงสร้างเปคตินด้วยการเติมหมู่ benzyl bromide เข้าไปยังหมู่คาร์บอกซิลิกทำให้สามารถดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเล็ตได้

โครงสร้างของเปคตินสามารถเติมโลหะหนักเข้าไปได้ โดยใช้กรดอะดิปิคมาเชื่อมโครงสร้างตรงตำแหน่งคาร์บอกซิลิกทำให้โครงสร้างที่มีรูพรุน ดังรูปที่ 4 ซึ่งสามารถดูดอิออนซับโลหะหนักในงานสิ่งแวดล้อม เช่น $Pb^{2+}$, $Cu^{2+}$ และ $Zn^{2+}$ ได้เป็นอย่างดี (Li *et al*., 2007)




รูปที่ 4 กลไกการดัดแปรโครงสร้างเปคตินด้วยกรดอะดิปิค (Adipic acid) (Li *et al*., 2007)

**วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย**

1) เพื่อได้วิธีการสกัดเพคตินที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุดจากเศษและเปลือกผลไม้ไทย
2) เพื่อได้วิธีทำคอมโปซิทระหว่างเปคตินและไบโอโพลีเมอร์ชนิดต่างๆ
3) เพื่อได้กรรมวิธีการปรับโครงสร้างคอมโปซิทระหว่างเปคตินและไบโอโพลีเมอร์เพื่อให้มีความเสถียรและเหมาะสมในอุตสาหกรรมอาหารในอนาคต

**ขอบเขตของโครงการวิจัย**

1) ทำการศึกษาวิธีการสกัดเปคตินจากเศษและเปลือกผลไม้ไทยให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด
2) ทำการดัดแปรโครงสร้างเปคตินพื้นฐานด้วย อิออนของเกลือ กรด ด่าง สารละลายอินทรีย์ และเอนไซม์ในสภาวะต่างๆ
3) ทำคอมโปซิทระหว่างเปคตินกับไบโอโพลีเมอร์

4) ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี กายภาพ และฤทธิ์ต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ของเปคติน คอมโปซิทเปรียบเทียบกับเปคตินธรรมชาติ

# บทที่ 2
# วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

## 2.1 วัสดุและสารเคมี

2.1.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

- เปลือกส้มโอ
- เม็ดพลาสติกชนิดพอลิแลคติคแอซิด (PLA) เกรด 2002 จากบริษัท Nature work

2.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- กรวยกรอง
- ขวดรูปชมพู่
- ตะแกรงกรองสาร
- บีกเกอร์
- แท่งแก้วคน
- ปิเปตต์
- อุปกรณ์หั่น เช่น มีด กรรไกร เขียง
- ขวดปรับปริมาตร

2.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- กรดซิตริก (Citric acid)
- กรดไนตริก (Nitric acid)
- กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)
- กรดออกซาลิก (Oxalic acid)
- เอทานอล (Ethanol)
- กรดซัลฟูริค (Sulphuric acid)
- กรดบอริก (Boric acid)

2.1.4 เครื่องมือที่ใช้

- เครื่องกวนแบบให้ความร้อน (Hot plate stirrer)
- เครื่องวัดความหนืด (Brookfield)
- ตู้อบชนิดควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- เครื่อง FT-IR
- กล้องจุลทรรศจุลทรรศน์อีเล็คตรอนชนิดส่องกราด (SEM)

- เครื่องวัดความชื้น
- เครื่อง Differential scanning calorimetry (DSC)
- เครื่องไอออนโครมาโทกราฟี
- เครื่องผสมแบบปิด (Internal mixer)

**2.2 การเตรียมและวิธีการสกัดตัวอย่าง**

นำเปลือกส้มโอเฉพาะส่วนที่เป็นสีขาวมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆขนาดประมาณ 5x5 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปแช่ใน 95% เอทิลแอลกอฮอล์ นาน 15 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ สะเด็ดน้ำให้แห้งแล้วนำไปอบ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเปลือกส้มโอที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมไปต้มกับสารละลายกรดชนิดต่างๆ ได้แก่ กรดซิตริก กรดออกซาลิก กรดไฮโดรคลอริก กรดไนตริก โดยใช้สารละลายกรดที่ต่างกันทั้งชนิดและความเข้มข้น ในอัตราส่วน 1:50 (w/v) โดยกรดที่ใช้ในการสกัด ที่ความเข้มข้น 0.1 M, 0.5 M และ 1.0 M เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการตกตะกอนเปคตินด้วย 95% เอทิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 1:3 (v/v) ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง และนำตะกอนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักเปคตินที่ได้เพื่อหาประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัด

จากนั้นทำการปรับ pH ของสารสกัดเปคตินด้วยกรดซิตริกที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 M ให้ได้ 4.5 และทำการตกตะกอนด้วย 95% เอทิลแอลกอฮอล์ แล้วนำตะกอนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และนำไปบดเพื่อทำการวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆ ของเปคตินต่อไป

**2.3 การทดสอบและวิเคราะห์คุณสมบัติของเปคติน**

2.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ใช้วิธี Kjeldahl โดยเป็นการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Ough and Amerine, 1988) เริ่มจากนำตัวอย่างเปคตินอบแห้งที่สกัดด้วย 0.1M กรดซิตริก ไปบดให้ละเอียด ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ลงในหลอด Kjeldahl และใช้หลอดเปล่า 1 หลอดเป็น sample blank เติม mixed catalyst (ผสม $K_2SO_4$: $CuSO_45H_2O$ อัตราส่วน 100:10) ลงไปประมาณ 5 กรัม เติมกรด $H_2SO_4$ เข้มข้นลงไป 20 มิลลิลิตร เขย่าให้ส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำไปย่อยใน digestion block ในตู้ดูดควันที่อุณหภูมิ 400 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีของสารละลายที่ย่อยใสหรือสีขาวขุ่น ทิ้งไว้ให้เย็น เติมสารละลายกรดบอริก 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่ย่อยได้ไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่น ก่อนเริ่มกลั่นเติมน้ำกลั่นลงไป 50 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 35% NaOH ลงไป 25 มิลลิลิตร ใช้กรดบอริกจับแก๊สแอมโมเนียที่เกิดขึ้น สีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเขียว ได้สารละลายที่กลั่นแล้ว นำกรด

บอริกที่ได้ไปไตเตรทด้วยสารละลาย 0.1M HCl จนสีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีชมพู เมื่อเทียบกับ sample blank

ความเข้มข้นของไนโตรเจนทั้งหมด คำนวณได้จาก

$$\% \text{ ไนโตรเจน (Total N)} = \frac{N \times (V-B) \times 14 \times 100}{W}$$

เมื่อ N = ความเข้มข้นของกรด HCl (M)

V = ปริมาตรของกรด HCl ที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของกรด HCl ที่ใช้ไตเตรทกับ blank (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

2.3.2 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาล

ตัวอย่างเปคตินที่สกัดได้จะถูกย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 1 M อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง โดยก่อนที่จะให้ความร้อนให้ทำการย่อยเปคตินด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 13 M อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงปรับให้ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกเป็น 1 M อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของน้ำตาลด้วยเครื่อง Ion chromatography ยี่ห้อ Dionex รุ่น ICS-5000 (Blakeney *et al*., 1983 อ้างถึงใน Koubala *et al*., 2008)

2.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณเมทานอลและกรดอะซีติก (ดัดแปลงจาก Thomas et al., 2003)

วัดปริมาณเมทานอลและกรดอะซีติกที่หลุดออกมาในสารละลายด่าง 0.4 M NaOH / 80% isopropanol แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ยี่ห้อ Agilent รุ่น 7890A

2.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

ชั่งตัวอย่างผงเปคตินที่สกัดได้และจดบันทึก จากนั้นทำการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการชั่งน้ำหนักตัวอย่างหลังทำการอบอีกครั้ง เพื่อหาเปอร์เซนต์ความชื้นในตัวอย่าง

2.3.5 การทดสอบการดูดคลายความร้อน (Gilsenan et al., 2003 และ Einhorn-Stoll et al., 2007)

ชั่งตัวอย่างเปคตินที่ทำการสกัดประมาณ 5-10 มิลลิกรัม ใส่ลงใน aluminium pan ขนาด 40 ไมโครลิตร ปิดฝาให้สนิท แล้วนำเข้าเครื่อง DSC ยี่ห้อ Perkin Elmer model DSC-7 ให้ความร้อน

ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 25-600 องศาเซลเซียส กำหนดให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้นและลดลง 10 องศาเซลเซียสต่อนาที บันทึกผลและแสดงผลด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์

2.3.6 การวิเคราะห์โครงสร้างภายนอกของผลึกเปคตินด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนชนิดส่องกราด

บดผลึกเปคตินที่สกัดได้และผลึกเปคตินทางการค้าแล้วร่อนด้วยตะแกรงขนาด 50 ไมโครเมตร จากนั้นผงเปคตินจะถูกตรึงไว้บนแท่นโลหะแล้วทำการโค้ทด้วยผงทองในระบบสูญญากาศจากนั้นตัวอย่างจะถูกวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ยี่ห้อ Juol รุ่น JSM-5800LV เพื่อศึกษาลักษณะพื้นผิวของตัวอย่าง ทั้งส่วนที่เรียบและส่วนที่เป็นรอยแตก

2.3.7 การวิเคราะห์หาหมู่ functional ด้วยเครื่อง FT-IR

ตัวอย่างสารประกอบจะถูกอัดลงในดิสก์สำหรับทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ATR-microscope FT-IR การวิเคราะห์จะใช้ Vertex 70 spectrometer ใช้พื้นที่ 25x25 มิลลิเมตร สแกนด้วยสเปคตรัมช่วงความถี่ 400-4000 $cm^{-1}$ และสแกนซ้ำ 32 รอบ ที่ความละเอียดทุกๆ 4 $cm^{-1}$ (Singthong *et al.*, 2005)

2.3.8 การวิเคราะห์ค่าความหนืด

เตรียมตัวอย่างเปคตินที่สกัดได้และเปคตินทางการค้าที่ความเข้มข้น 3%(w/v) ทำการวิเคราะห์ค่าความหนืดด้วยเครื่อง Brookfield (Well-Brookfield LVT, series 82198, USA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ค่าความหนืดที่วัดได้ควรอยู่ในช่วง 1-100 เซนติพอยส์ ทั้งนี้จะต้องเลือกใช้แกนหมุนให้สัมพันธ์กับความหนืดของตัวอย่าง ในการทดลองนี้ใช้แกนหมุนเบอร์ 1

2.3.9 การทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (ดัดแปลงจาก Elsabee et al., 2007)

ทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion method เริ่มจากการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis* และ *Staphylococcus aureus* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* และ *Serratia marcescens* เลี้ยงในอาหาร LB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยปริมาณของเชื้อที่ใช้ทดสอบอยู่ที่ $10^{5}$-$10^{6}$ $CFUml^{-1}$ นำไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วมา spread เชื้อที่เตรียมไว้ลงบนอาหาร Nutrient Agar (NA) ให้ทั่ว ทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นวางกระดาษที่หยดสารสกัดเปคตินที่ต้องการ

ทดสอบวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้ออยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและวัด clear zone ที่เกิดขึ้น

**2.4 การทำคอมโปซิทระหว่างเปคตินและไบโอพอลิเมอร์**

2.4.1 การเตรียมผสม PLA (PLA blends preparation)

ก่อนทำการผสม PLA และเปคติน จะต้องนำเม็ด PLA และเปคตินไปทำการอบเพื่อไล่ความชื้นในวัสดุทั้งสองด้วยเครื่องอบความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำวัสดุทั้งสองเข้าเครื่องผสมแบบปิด ยี่ห้อ Haake รุ่น Rheomix 3000p ใช้ความเร็วของการหมุนที่ 50 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที โดยเตรียมวัสดุผสมให้มีความเข้มข้นของเปคตินที่ 0, 3, 6, 9 และ 12% ใน PLA(โดยน้ำหนัก) หลังจากที่นำวัสดุผสมออกจากเครื่องผสมแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วจึงนำวัสดุผสมที่ได้ไปทำการบดด้วยเครื่อง Retsch grinder machine วัสดุผสมที่ทำการบดจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปขึ้นรูป

2.4.2 การขึ้นรูปชิ้นงาน

ตัวอย่าง ของผสม PLA สำหรับทดสอบจะถูกหล่อด้วยกำลังอัด (compression molding) ด้วยเครื่องยี่ห้อ Gotech รุ่น GT-7014-A30 โดยใช้แม่พิมพ์เป็นสแตนเลสสตีล ของผสม PLA จะถูกนำไปใส่ระหว่างแผ่นเทฟลอน ซึ่งประกบด้วยแผ่นโลหะ 2 แผ่น โดยแต่ละของผสมจะถูกให้ความร้อนก่อนที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และปั๊ม 5 ครั้ง ก่อนที่จะทำการอัดขึ้นรูปที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะนำตัวอย่างออกจากแม่พิมพ์

2.4.3 การทดสอบคุณสมบัติทางกล

ชิ้นงานแม่พิมพ์ตัวอย่างมีขนาด 180x180 ตารางมิลลิเมตร หนา 4 มิลลิเมตร ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์การทนต่อแรงดึงและแรงกระแทก เพื่อทดสอบคุณสมบัติทางกลแบบพลวัต (Dynamic mechanical analysis) และใช้ตัวอย่างในการทดสอบอย่างน้อย 5 ตัวอย่าง

2.4.4 การทดสอบแรงดึง (Tensile testing)

ตัวอย่างถูกเตรียมให้มีลักษณะเหมือนดัมเบลล์ (Dumbbell shape) ความหนา 4 มิลลิเมตร, ความกว้างทั้งหมด 9.53 มิลลิเมตร, ความยาวทั้งหมด 63.5 มิลลิเมตร, ระยะทดสอบ ที่ความยาว 7.62 มิลลิเมตร ความกว้าง 3.18 มิลลิเมตร การทดสอบแรงดึงจะใส่แรงที่ 50 กิโลนิวตัน ด้วยเครื่อง Instron

universal testing machine รุ่น 5569 โดยให้ความเร็วในการดึง (crosshead speed) ที่ 1 มิลลิเมตรต่อนาที การทดสอบจะทำที่อุณหภูมิห้อง และเก็บข้อมูลด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์

2.4.5 การทดสอบการกระแทก (Impact testing)

ตัวอย่างถูกขึ้นรูปเป็นสี่เหลี่ยมมุมฉากมีความหนา 4 มิลลิเมตร ความกว้าง 12.7 มิลลิเมตร และความยาว 64 มิลลิเมตร โดยตัวอย่างจะถูกทำรอยบากไว้ก่อนทำการทดสอบ จากนั้นทำการทดสอบแรงกระแทกแบบ Notched Izod impact test ด้วยเครื่อง Atlas testing machine รุ่น BPI ที่อุณหภูมิห้อง โดยให้ pendulum energy ที่ 2.7 จูล โดยในแต่ละสภาวะจะต้องทำการทดสอบตัวอย่างอย่างน้อย 5 ตัวอย่าง

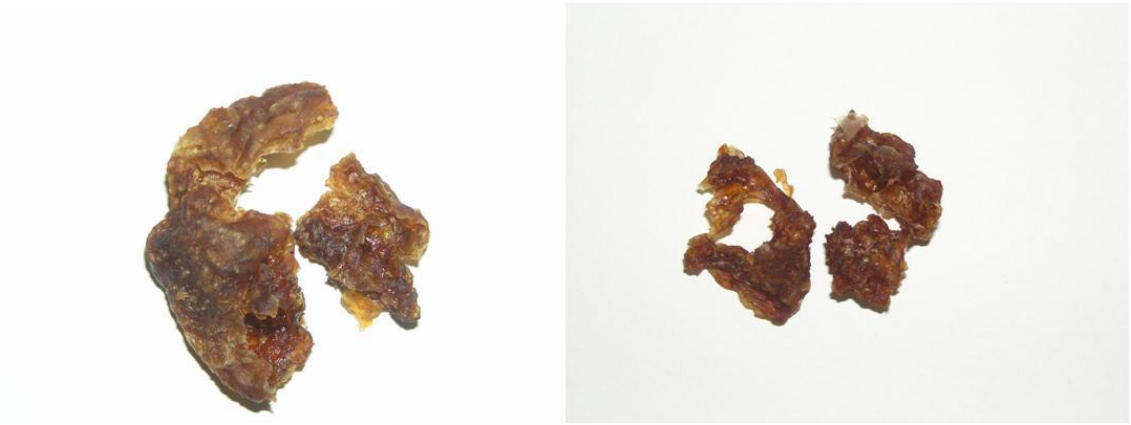
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทที่ 3
# ผลการวิจัย

**3.1 ผลของการสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอด้วยสารละลายกรด**

ในการสกัดเปลือกส้มโออบแห้งโดยใช้สารละลายกรดที่ต่างกันทั้งชนิดและความเข้มข้น โดยกรดที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ กรดซิตริก กรดออกซาลิก กรดไฮโดรคลอริก กรดไนตริก ที่ความเข้มข้น 0.1 M, 0.5 M และ 1.0 M พบว่า เปคตินที่สกัดด้วยสารละลายกรดออกซาลิก พบว่าที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 M หลังจากทำการตกตะกอนด้วย 95% เอทิลแอลกอฮอล์ พบว่า สารละลายเปคตินไม่เกิดการฟอร์มเป็นเจล ทำให้ลักษณะที่ได้คล้ายกับตะกอนของผงแป้ง เมื่อทำการอบแห้ง จะมีลักษณะเป็นก้อน และผง เมื่อนำเปลือกส้มโอมาสกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1% พบว่าเมื่อทำการตกตะกอนและนำไปอบสารสกัดเปคตินมีสีค่อนข้างเข้ม หากความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มขึ้นเป็น 0.5 และ 1.0 M พบว่า สารละลายเปคตินเกิดการแตกตัว เมื่อทำการตกตะกอนด้วย 95% เอทิลแอลกอฮอล์ ไม่สามารถกรองผ่านกระดาษกรองได้ เช่นเดียวกันกับการสกัดเปลือกส้มโอโดยการใช้สารละลายกรดไนตริกที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 M ส่วนกรดไนตริกที่ความเข้มข้น 0.1 M เปคตินที่ได้ ไม่เกิดการฟอร์มเจลเมื่อทำการตกตะกอน แต่สามารถกรองผ่านกระดาษกรองได้ สำหรับกรดซิตริกที่มีความเข้มข้น 1.0 M ให้ปริมาณเปคตินที่สกัดสูงที่สุด คือ 257.9% ลักษณะของเปคตินที่สกัดได้นั้นหลังจากอบแห้งด้วยอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง มาสภาพที่ค่อนข้างชื้นมาก เนื่องจากโครงสร้างของสารสกัดเปคตินมีการอุ้มน้ำภายในโครงสร้างที่มากขึ้นตามความเข้มข้นของกรดซิตริกที่ใช้สกัด เมื่อยืดเวลาที่ใช้ในการอบเป็น 120 ชั่วโมง ก็ยังคงลักษณะเช่นเดิม ย่อมแสดงว่า ปริมาณน้ำที่มีอยู่ในเปคตินอาจเกิดการทำปฏิกิริยากับเปคตินสร้างเป็นเจลที่มีความเสถียร หลังการทดสอบการฟอร์มเจลพบว่าทำเป็นเจลได้ดี ลักษณะของเปคตินที่สกัดได้จากกรดต่างชนิดกัน ที่ความเข้มข้นต่างกัน ดังรูปที่ 3.1

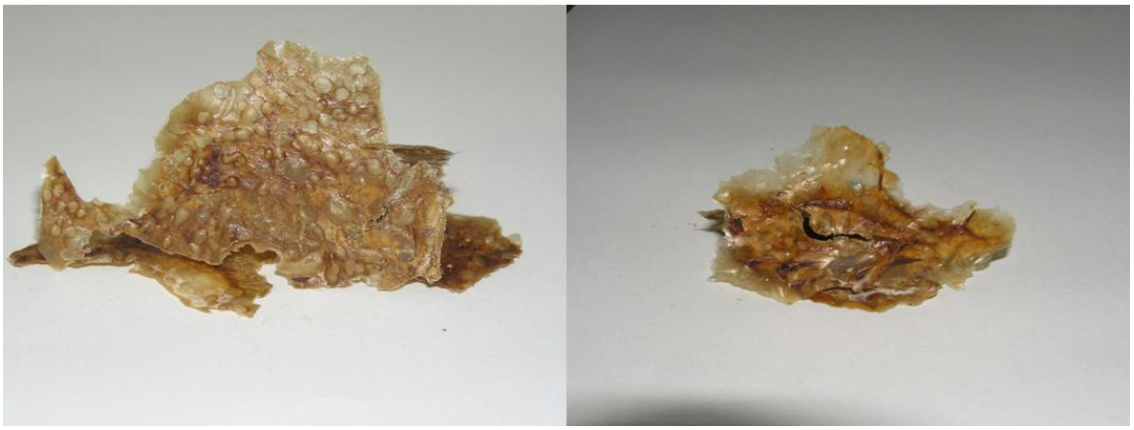
a) 0.1M Citric acid



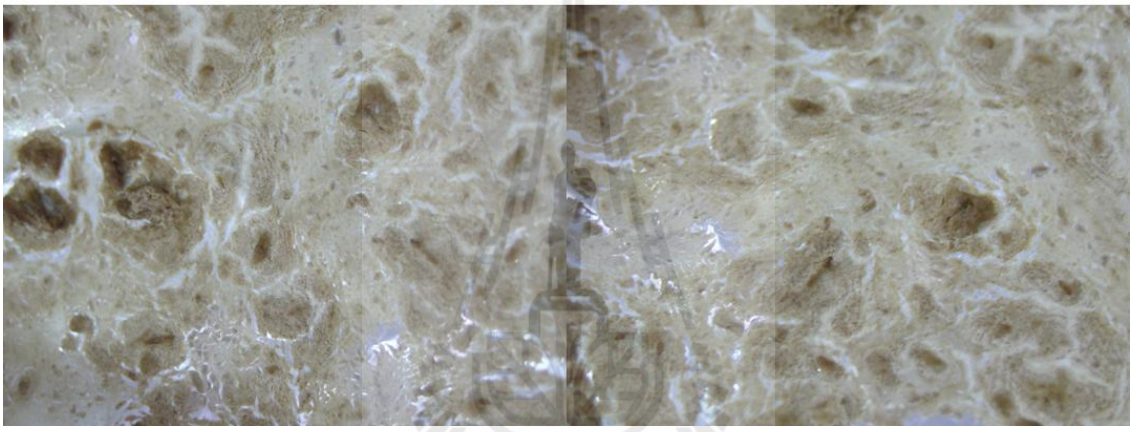
b) 0.5M Citric acid

c) 1.0M Citric acid

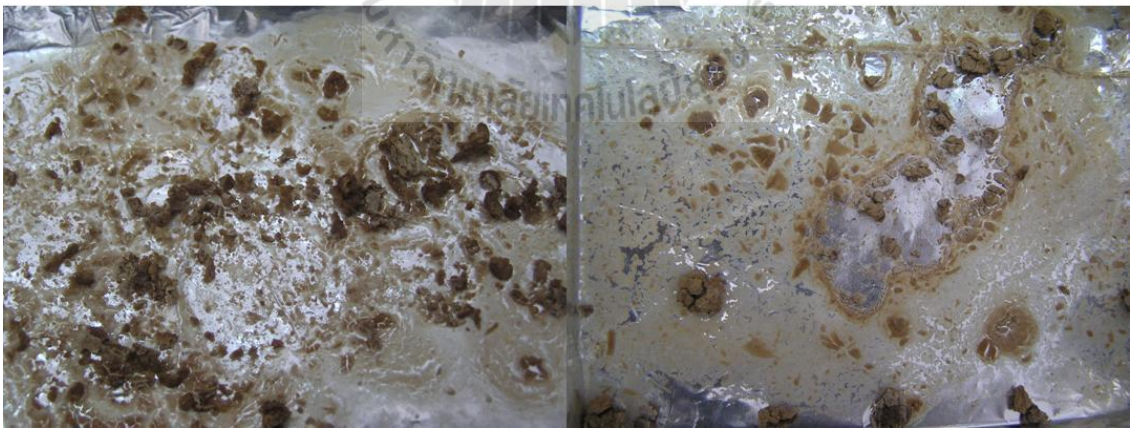
d) 0.1M Oxalic acid



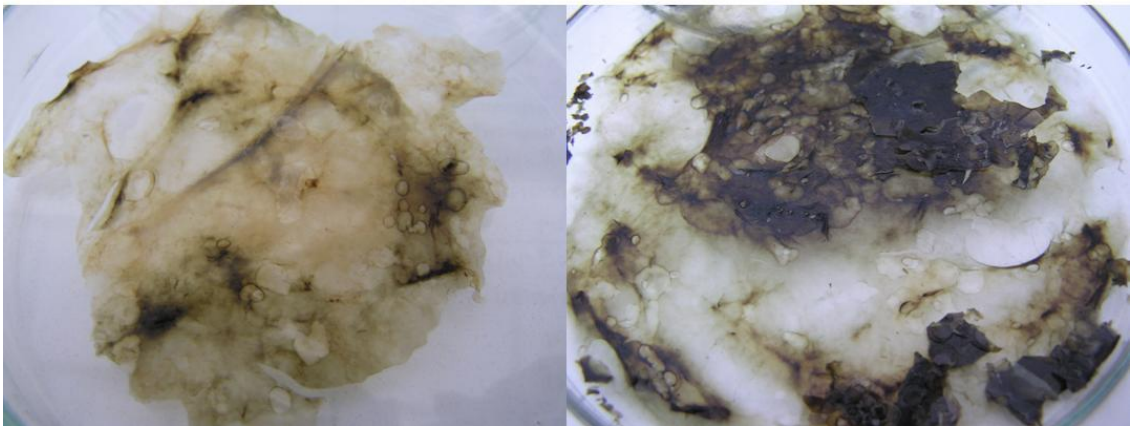
e) 0.5M Oxalic acid



f) 1.0M Oxalic acid



**g) 0.1M Hydrochloric acid**

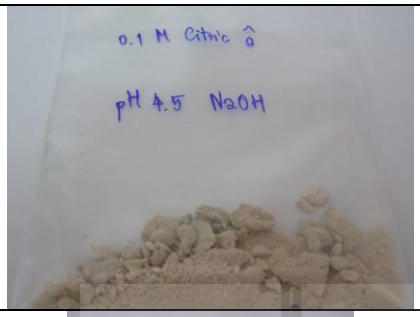
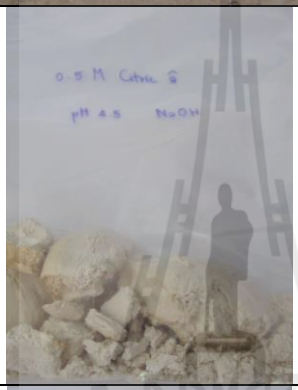
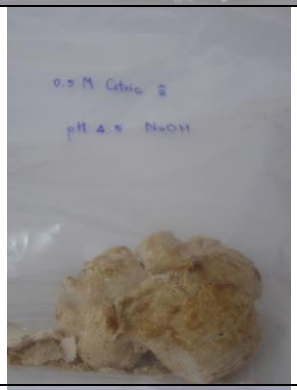
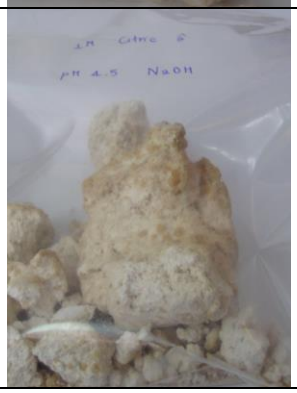


**h) 0.1M Nitric acid**

รูปที่ 3.1 ลักษณะของสารสกัดเปคตินที่สกัดได้จากเปลือกส้มโอจากกรดชนิดต่างๆ (a) 0.1M Citric acid (b) 0.5M Citric acid (c) 1.0M Citric acid (d) 0.1M Oxalic acid (e) 0.5M Oxalic acid (f) 1.0M Oxalic acid (g) 0.1M Hydrochloric acid (h) 0.1M Nitric acid

จึงทำการเลือกใช้กรดซิตริกสกัดเปคติน เปคตินที่ได้จะนำมาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อปรับ pH ของสารละลายเปคตินที่สกัด ด้วยกรดซิตริกที่ความเข้มข้น 0.1M, 0.5M และ 1.0 M ให้ได้ pH 4.5 และทำการตกตะกอนด้วย 95% เอทิลแอลกอฮอล์อีกครั้งนั้น พบว่า สารสกัดเปคตินจะเกิดการจับตัวกัน เกิดเป็นก้อนลักษณะแข็งสีขาว แตกหักได้ยาก และสามารถละลายน้ำได้ โดยความเข้มข้นที่สูงขึ้นของกรดซิตริกที่ใช้สกัดส่งผลให้ตะกอนเปคตินเมื่อทำการปรับ pH แล้ว มีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งลักษณะของเปคตินที่ได้ แสดงในตารางที่ 3.1 จากการทดลองในการปรับ pH ของสารละลายเปคตินที่สกัดได้จากกรดอื่นพบว่ามีเพียงสารสกัดเปคตินจากกรดซิตริกเท่านั้นที่ยังคงลักษณะของผลึกเปคตินไว้ได้

ตารางที่ 3.1 ลักษณะของเปคตินที่สกัดด้วยสารละลายกรดซิตริก ปรับความเป็นกรดด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้ได้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4.5

| ความเข้มข้น | ตัวอย่าง | |
|---|---|---|
| | 1 | 2 |
| 0.1 M Citric acid |   | |
| 0.5 M Citric acid |  |  |
| 1.0 M Citric acid | |  |

**3.2 ผลการทดสอบและวิเคราะห์คุณสมบัติของเปคติน**

3.2.1 ผลของการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและชนิดของน้ำตาล

ทำการวิเคราะห์โปรตีนรวมด้วยวิธี Kjeldahl เปคตินที่สกัดได้จากเปลือกส้มโอ จากการสกัดด้วย กรดซิตริก ความเข้มข้น 0.1 M และวิเคราะห์น้ำตาลด้วยเครื่อง Ion chromatography ไม่พบน้ำตาลซูโครส และ น้ำตาลฟรุคโตส ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลในตัวอย่างเปคตินทางการค้าและสารสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอ

| | เปคตินทางการค้า | สารสกัดเปคติน จากเปลือกส้มโอ |
|---|---|---|
| โปรตีน (%) | 1.40 | 1.53 |
| แรมโนส (กรัมต่อลิตร) | 0.032 | 0.030 |
| อะราบิโนส (กรัมต่อลิตร) | 0.059 | 0.085 |
| กาแลคโตส (กรัมต่อลิตร) | 0.048 | 0.090 |
| กลูโคส (กรัมต่อลิตร) | 0.9 | 0.102 |
| ซูโครส (กรัมต่อลิตร) | - | - |
| ฟรุคโตส (กรัมต่อลิตร) | - | - |

3.2.2 ผลของการวิเคราะห์หาปริมาณเมทานอลและกรดอะซีติก

เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดเปคตินด้วยเครื่อง Gas chromatography พบว่าเมื่อสกัดเปคตินด้วย 0.4 M NaOH/80% isopropanol สารสกัดที่ได้ มีปริมาณเมทานอล 0.355 กรัมต่อลิตร (11.079 mmol) แต่ตรวจไม่พบ กรดอะซิติกในตัวอย่างสารสกัดเปคตินที่ทำการวิเคราะห์ ซึ่งปริมาณเมทานอลที่วิเคราะห์ได้มีปริมาณมากกว่าการศึกษาของ Savary และ Nunez (2003) เล็กน้อยโดยพบปริมาณเมทานอลจากเปคติน 2.59 mmol

3.2.3 ปริมาณความชื้น

เมื่อนำผงเปคตินที่สกัดจากเปลือกส้มโอ ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส พบว่ามีปริมาณความชื้นที่ 13.57% ซึ่งน้อยกว่าปริมาณความชื้นที่มีในผงเปคตินทางการค้า 16.53% อย่างไรก็ตาม ปริมาณความชื้นของเปคตินที่สกัดจากเปลือกส้มโอและทางการค้ายังมีปริมาณความชื้นสูงกว่าเปคตินจากพืชตระกูลส้ม (8.3%) ที่สกัดด้วยกรดซิตริกความเข้มข้น 0.5 M อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Kurita *et al*., 2008)

3.2.4 ผลการวิเคราะห์ความหนืดด้วยเครื่อง Brookfield

สารสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอที่ความเข้มข้น 3% (w/v) วัดค่าความหนืดได้ที่ 25.3 cP เมื่อเทียบกับสารสกัดเปคตินทางการค้าจากพืชตระกูลส้มของบริษัท Fluka พบว่ามีค่าความหนืดที่ 88.8 cP และสารสกัดเปคตินทางการค้าจากแอปเปิ้ลของบริษัท Fluka มีค่าความหนืดที่ 57.4 cP ซึ่งสูงมากกว่าสารสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอ

3.2.5 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ดังนี้ แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis* และ *Staphylococcus aureus* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* และ *Serratia marcescens* โดยใช้สารสกัดเปคตินทั้งจากเปลือกส้มโอและการค้าที่ความเข้มข้น 60 ppm ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 3.3

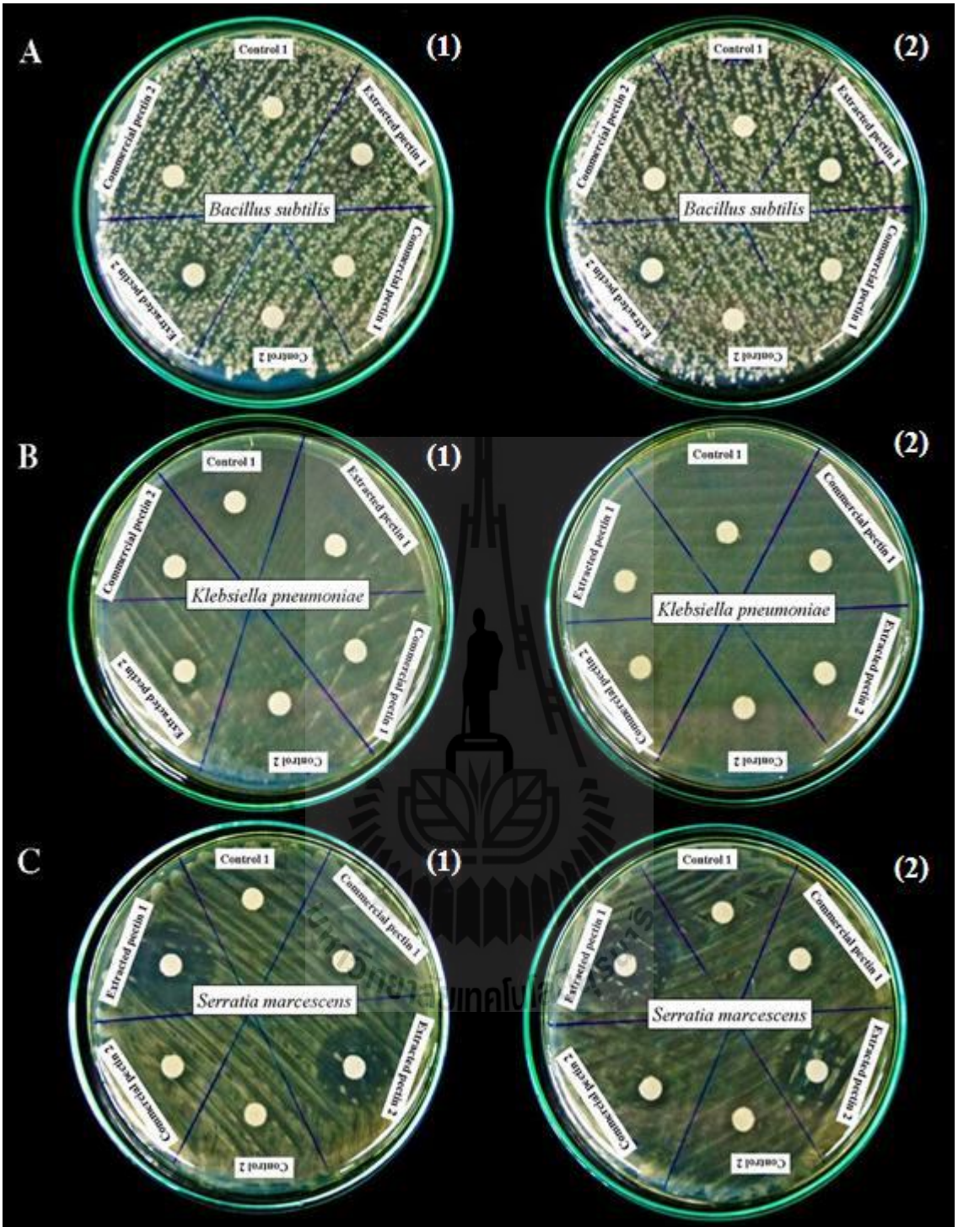
ตารางที่ 3.3 ค่า Inhibition zone ของสารสกัดเปคตินต่อเชื้อแบคทีเรีย

| เชื้อจุลินทรีย์ | Inhibition zone (มิลลิเมตร) ของสารสกัดเปคติน | | |
|---|---|---|---|
| | จากเปลือกส้มโอ | ทางการค้าจากพืชตระกูลส้ม | Control |
| *Bacillus subtilis* | $9.4 \pm 0.5$ | - | - |
| *Enterococcus faecalis* | - | - | - |
| *Staphylococcus aureus* | - | - | - |
| *Escherichia coli* | - | - | - |
| *Klebsiella pneumoniae* | - | $7.4 \pm 0.8$ | - |
| *Serratia marcescens* | $21.0 \pm 1.4$ | $7.7 \pm 0.2$ | - |

- ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

Control : Deionized water

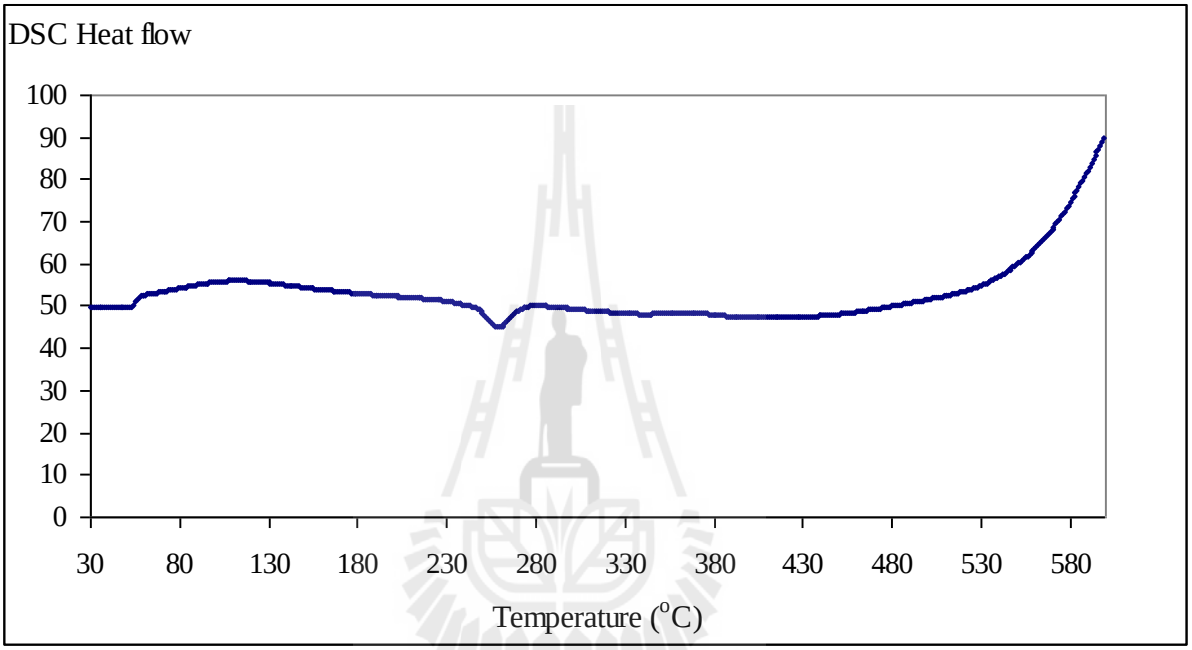
จากผลการทดลองการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย พบว่า สารสกัดเปคตินทางการค้าจากพืชตระกูลส้มไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ต่างๆ ดังนี้ *B. subtilis, E. faecalis, S. aureus* และ แบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ *E. coli* แต่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ *K. pneumoniae* และ *S. marcescens* ส่วนสารสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ *B. subtilis* และแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ *S. marcescens* ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญมากกว่าสารสกัดเปคตินทางการค้าจากพืชตระกูลส้มประมาณ 3 เท่า แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ *E. faecalis, S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ *E. coli* และ *K. pneumoniae*



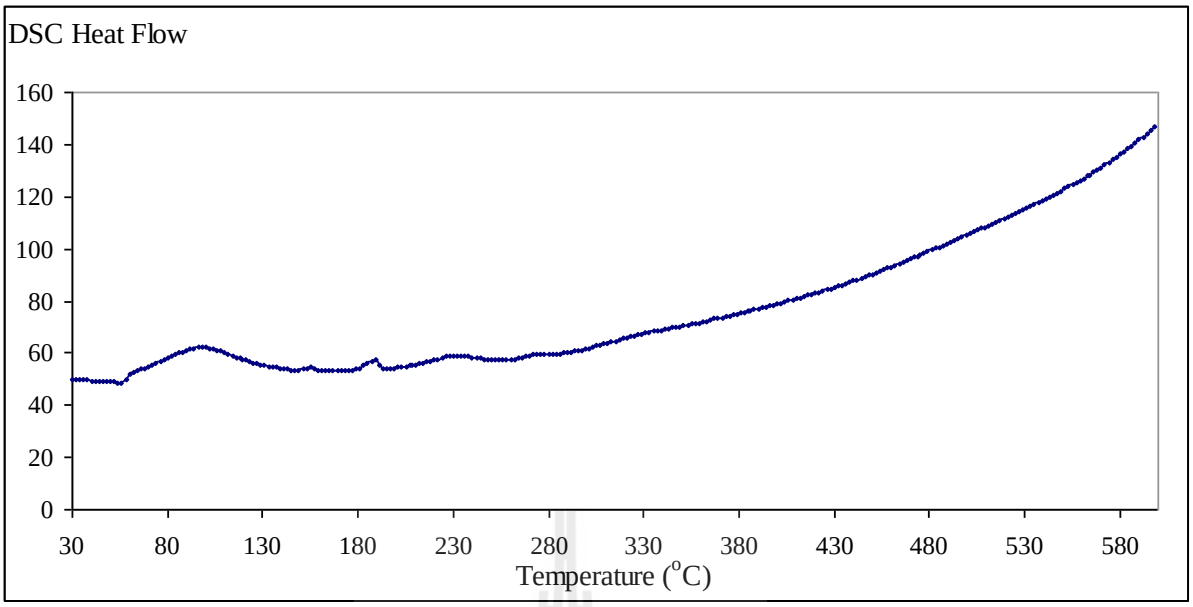

รูปที่ 3.2 ภาพแสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอ (1) และสารสกัดเปคตินทางการค้า (2) เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* (A) เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Klebsiella pneumoniae* (B) เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Serratia marcescens* (C)

3.2.6 ผลการทดสอบการดูดคลายความร้อน

ผลจากการทดสอบด้วยเครื่อง DSC ดังแสดงในรูปที่ 3.3 และ 3.4 พบว่า ค่า $T_g$ (glass transition) ของเปคตินที่สกัดจากเปลือกส้มโอมีค่าประมาณ 75 องศาเซลเซียส และค่า $T_m$ (melting temperature) ของเปคตินจากเปลือกส้มโอมีค่าประมาณ 258 องศาเซลเซียส จากกราฟการวิเคราะห์ DSC พบว่า เปคตินจากเปลือกส้มโอ มีความบริสุทธิ์ มากกว่าเปคตินทางการค้า จึงทำให้ไม่สามารถหาค่า $T_m$ ของเปคตินทางการค้าได้




รูปที่ 3.3 กราฟแสดงค่าการดูดคลายความร้อนด้วยเครื่อง DSC ของสารสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอ

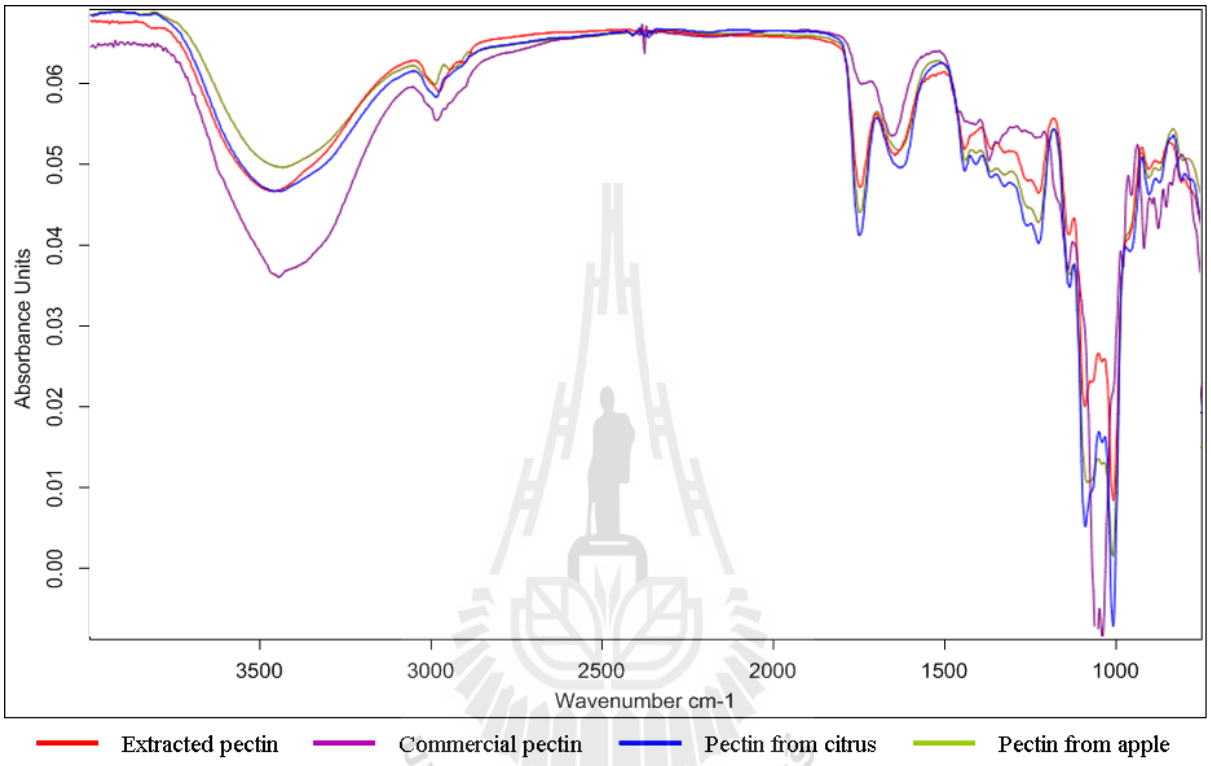



รูปที่ 3.4 กราฟแสดงค่าการดูดคลายความร้อนด้วยเครื่อง DSC ของสารสกัดเปคตินทางการค้าจากพืชตระกูลส้ม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2.7 การวิเคราะห์หาหมู่ functional ด้วยเครื่อง FT-IR

จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR พบว่า ตัวอย่างสารสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอ มีค่าการดูดกลืนแสงของหมู่ function ที่ตำแหน่งเดียวกันกับ เปคตินจากพืชตระกูลส้ม และ เปคตินจากแอปเปิ้ล เมื่อเปรียบเทียบกับเปคตินทางการค้าพบว่า สารสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอมีความบริสุทธิ์มากกว่าสารสกัดเปคตินทางการค้า



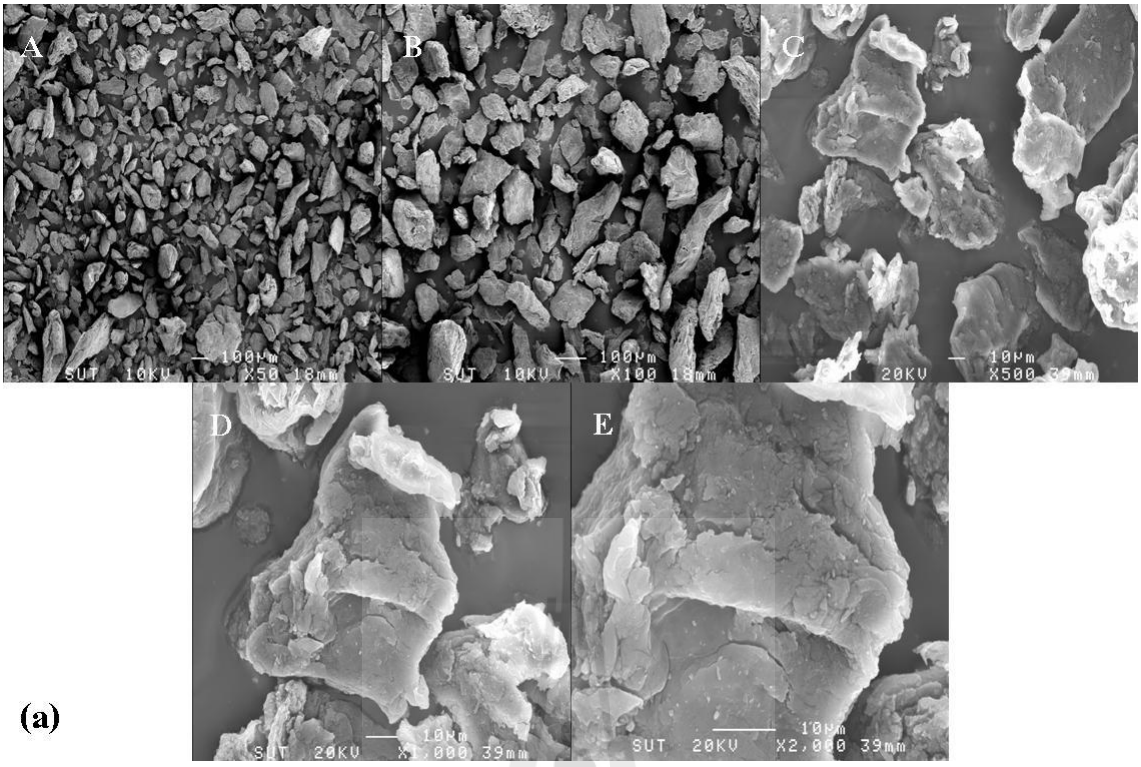

รูปที่ 3.5 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์หมู่ functional ด้วยเครื่อง FTIR

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2.8 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างภายนอกของผลึกเปคตินด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราด

จากการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เมื่อนำผงเปคตินมาร่อนด้วยตะแกรงที่มีขนาด 50 ไมโครเมตร พบว่า ที่กำลังขยาย 50x ขนาดของผลึกเปคตินที่สกัดจากเปลือกส้มโอมีขนาดใกล้เคียงกันมากกว่าเปคตินทางการค้า

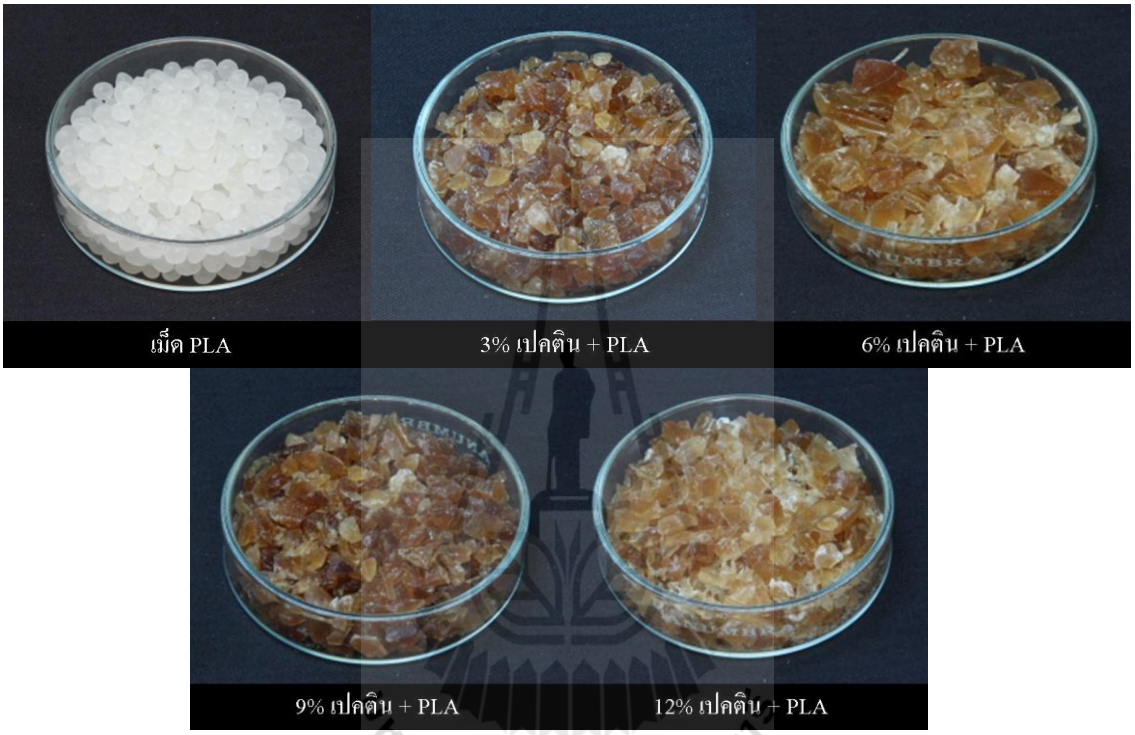
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี




รูปที่ 3.6 ลักษณะโครงสร้างภายนอกของผลึกเปคตินด้วยกล้อง SEM (a) ผลึกเปคตินที่สกัดจากเปลือกส้มโอ (b) ผลึกเปคตินทางการค้าจากพืชตระกูลส้ม

**3.3 ผลการทำคอมโปซิทระหว่างเปคตินกับไบโอพอลิเมอร์**

นำเปคตินที่ได้ทำให้อยู่ในรูปของสารละลาย แล้วทำการผสมกับไบโอพอลิเมอร์ชนิดพอลิ-แลคติคแอซิด (PLA) โดยผสมในอัตราส่วนของเปคตินต่อ PLA 0%, 3%, 6%, 9% และ12% โดยใช้เครื่อง Internal mixer ที่อุณหภูมิ 170°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำเข้าเครื่องฉีดขึ้นรูปเพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าต่างๆต่อไป ซึ่งผลการขึ้นรูปพบว่าเกิดความเข้ากันได้ระหว่างเปคตินและPLAได้ดีและสามารถขึ้นรูปที่ 170°C ได้ตามต้องการ

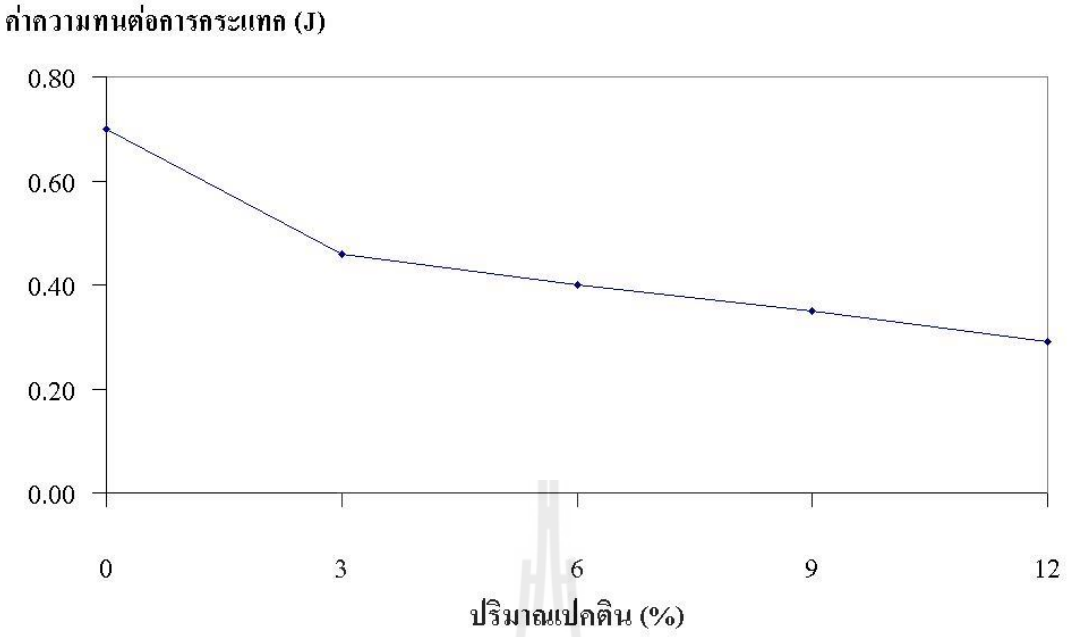



รูปที่ 3.7 การผสมพลาสติก PLA กับเปคตินที่ความเข้มข้นต่างๆ

รูปที่ 3.8 การขึ้นรูปคอมโปซิทเพื่อทดสอบคุณสมบัติต่างๆ

3.3.1ผลการทดสอบความต้านทานแรงกระแทก

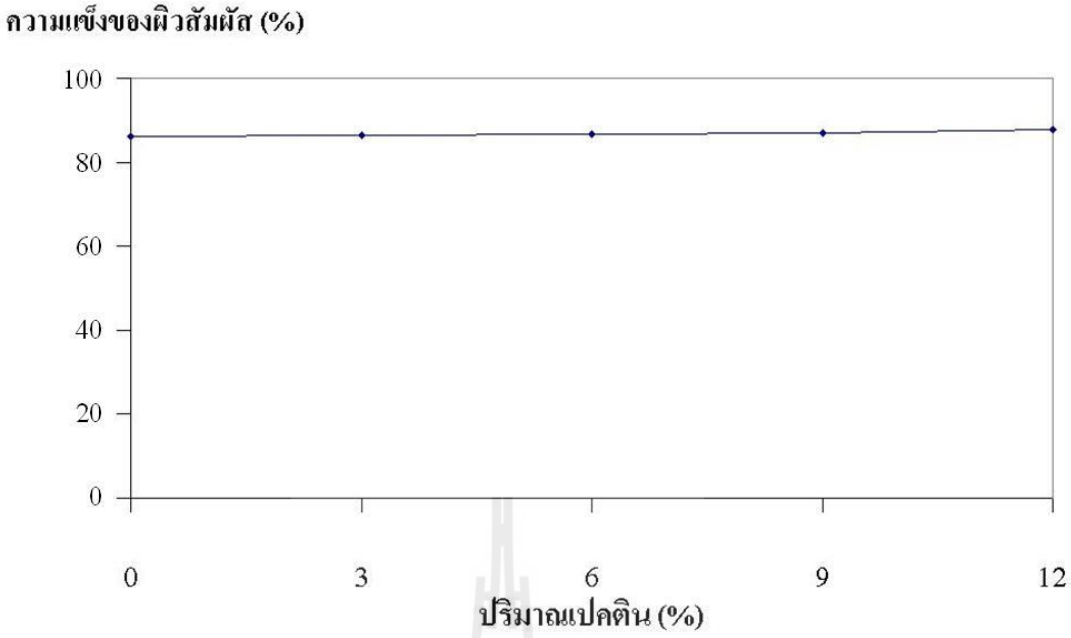
โดยใช้เครื่อง ATLAS polymer evaluation products BPI (USA) น้ำหนักในการใช้กระแทก 270 กรัม ใช้ความหนาของชิ้นงาน 3 มิลลิเมตร ค่าความต่อต้านแรงกระแทกพบว่าพลาสติก PLA ให้ค่าต่อต้านแรงกระแทกที่ 0.7 จูล และค่อยๆลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณเปคติน แสดงว่าเปคตินที่เพิ่มเข้าไปมีส่วนทำให้ความแข็งแรงของโมเลกุลหรือการยึดจับกันระหว่างพันธะของ PLA ถูกทำลายและหรือถูกแทนที่ด้วยเปคตินที่มีความแข็งแรงน้อยกว่า จึงทำให้ความแข็งแรงนั้นลดลง ดังที่แสดงในรูปที่ 3.9




รูปที่ 3.9 กราฟแสดงค่าความต่อต้านแรงกระแทกที่ปริมาณเปคตินที่แตกต่างกัน

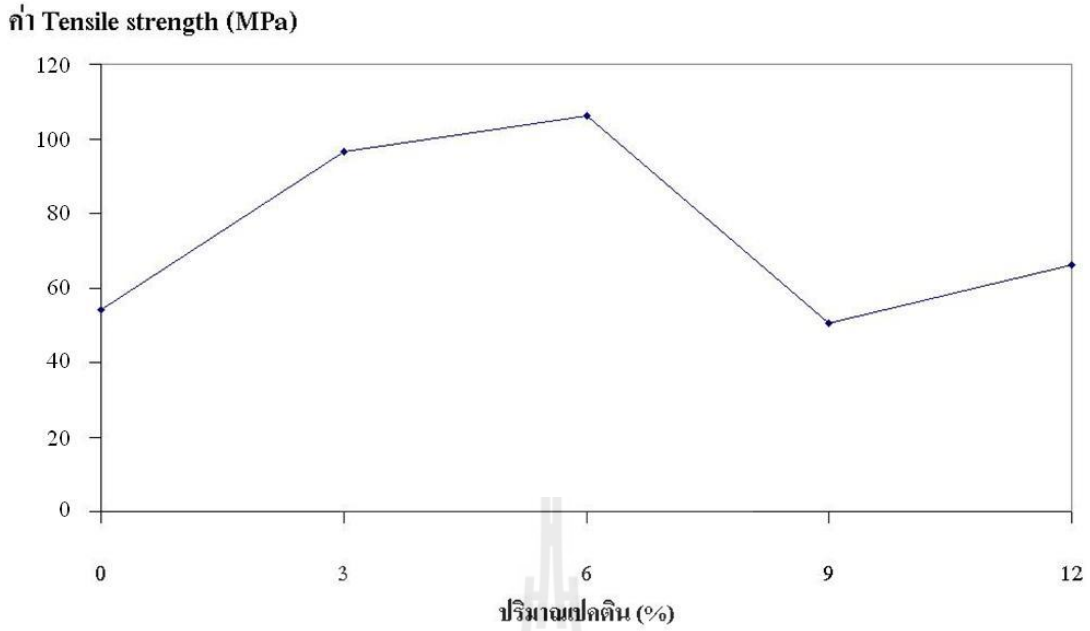
3.3.2 ผลการทดสอบวัดความแข็งของผิวสัมผัส

เครื่อง Duro-Tech model M202 ASTMD 2240 ใช้หัววัด Shore D น้ำหนักโหลด 4,000 กรัม โดย วัดแบบสุ่ม 5 จุด จุดละ 5 วินาที ค่าความแข็งหรือความต้านทางต่อการกดที่ได้นำมาแปลผลกับค่าของแข็งของเหล็กที่ค่า 1.66 แล้วแปรผลเป็นร้อยละความแข็งเมื่อเทียบกับเหล็ก ผลของการวัดความแข็งของผิวสัมผัสพบว่าปริมาณเปคตินที่เพิ่มขึ้นนั้นไม่มีผลต่อค่าความแข็งที่ผิวสัมผัสของตัวอย่าง ดังรูปที่ 3.10

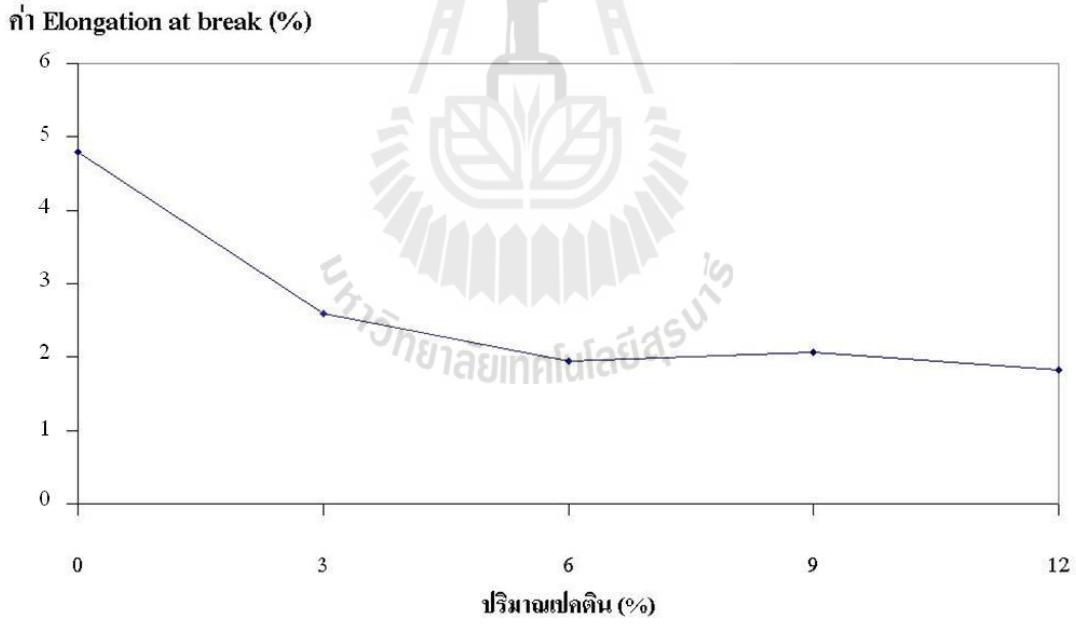



รูปที่ 3.10 กราฟแสดงค่าความแข็งของผิวสัมผัสที่ปริมาณเปคตินที่แตกต่างกัน

ค่าความต่อต้านแรงดึง (Tensile strength) และค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัวก่อนขาด (Elongation at break) ของ PLA และ PLA ผสมเปคตินในปริมาณต่างๆ แสดงในรูปที่ 3.11 และ 3.12 โดยที่ ค่าความต่อต้านแรงดึงของ PLA อยู่ที่ 54.16 MPa และเมื่อมีการใส่เปคตินลงไปพบว่าค่าความต่อต้านแรงดึงนั้นเพิ่มขึ้นปริมาณการเติมจนมีค่าที่สูงสุดอยู่ที่ 6% เปคตินที่ค่าค่าความต่อต้านแรงดึง 106.02 MPa หรือเพิ่มขึ้นคิดเป็น 95.8% และค่อยๆลดลงตามลำดับ ดังรูปที่ 3.11 สำหรับค่าเปอร์เซนต์การยืดตัวก่อนขาดนั้นกลับให้ผลในทางตรงกันข้ามคือ ค่าสูงสุดของค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัวก่อนขาดจะพบที่ค่า 4.79 % ที่วัสดุ PLA และมีแนวโน้มที่ลดลงเมื่อมีการเติมเปคตินลงในปริมาณที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ ซึ่งอาจเนื่องมาจากเปคตินที่เพิ่มลงไปมีค่าสูงสุดของค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัวก่อนขาดต่ำจึงทำให้ค่าดังกล่าวนั้นลดต่ำลง ดังแสดงในรูปที่ 3.12

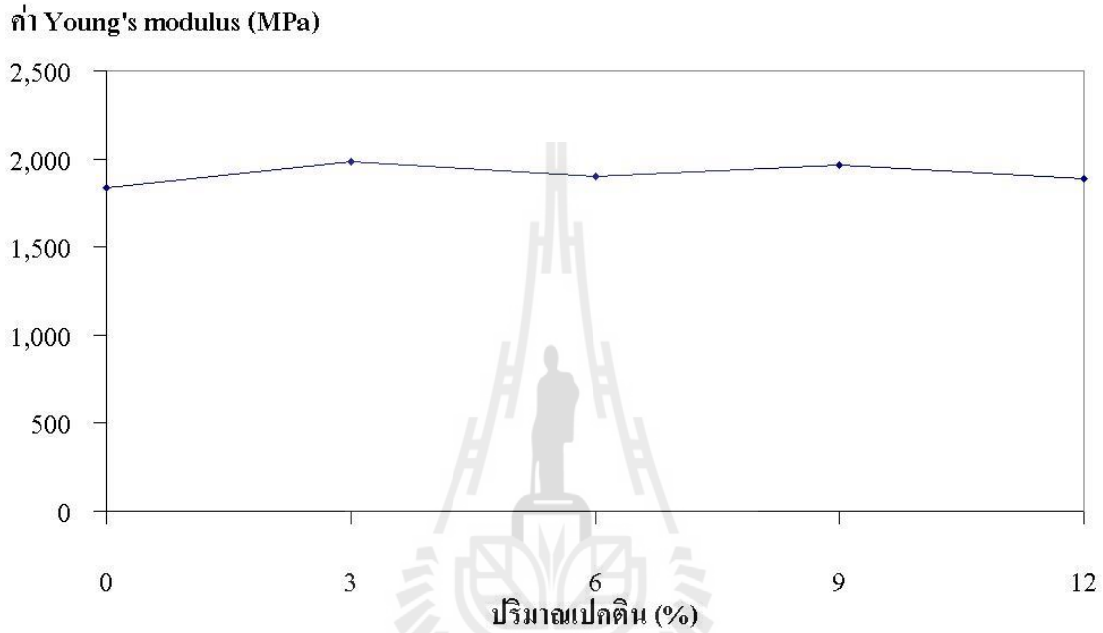



รูปที่ 3.11 กราฟแสดงค่าความต่อต้านแรงดึง (Tensile strength) ที่ปริมาณเปคตินที่แตกต่างกัน




รูปที่ 3.12 กราฟแสดงค่าเปอร์เซนต์การยืดตัวก่อนขาด (Elongation at break) ที่ปริมาณเปคตินที่แตกต่างกัน

ในส่วนของค่า Young's modulus ที่แสดงค่าคงที่ความยืดหยุ่นของวัสดุก่อนการเปลี่ยนสภาพ นั้นพบว่ามีค่าที่เพิ่มขึ้นจากเดิม (PLA) ซึ่งเปคตินที่เพิ่มลงในปริมาณ 3% นั้นให้ค่าคงที่ความยืดหยุ่นของวัสดุก่อนการเปลี่ยนสภาพที่ 1986.18 MPa ซึ่งเป็นค่าสูงสุดและมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยแต่ไม่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 3.13 ซึ่งแสดงว่าเปคตินนั้นมีความสามารถในการเพิ่มทั้งความสามารถต่อต้านแรงดึงและความยืดหยุ่นของวัสดุก่อนการเปลี่ยนสภาพได้ค่อนข้างดี แต่กลับทำให้เปอร์เซนต์การยืดตัวก่อนขาดนั้นลดลงและยิ่งลดลงเมื่อมีการเพิ่มปริมาณของเปคตินลงไปอีกด้วย




รูปที่ 3.13 กราฟแสดงค่าคงที่ความยืดหยุ่นของวัสดุก่อนการเปลี่ยนสภาพ (Young's modulus) ที่ปริมาณเปคตินที่แตกต่างกัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทที่ 4
# บทสรุป

สารเปคตินส่วนใหญ่จะทำการสกัดจากกากแอปเปิ้ล กากมะเขือเทศ และเปลือกส้ม นอกจากจะมีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารแล้ว ในปัจจุบันได้มีการนำเปคตินมาดัดแปลงเพื่อที่จะนำไปในใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆอีกด้วย การทดลองนี้เป็นการสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอโดยใช้กรดต่างๆเป็นตัวสกัด ซึ่งพบว่า กรดซิตริก สามารถสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอได้ดีกว่า กรดไฮโดรคลอริก กรดไนตริก กรดออกซาลิก จากนั้นได้ทำการศึกษาและวิเคราะห์คุณสมบัติของเปคตินที่สกัดได้ พบว่า สารสกัดเปคติน มีความชื้นต่ำกว่าเปคตินทางการค้า มีปริมาณโปรตีน 1.53% มีน้ำตาลแรมโนส 0.030 กรัมต่อลิตร อะราบิโนส 0.085 กรัมต่อลิตร กาแลคโตส 0.090 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 0.102 กรัมต่อลิตร จากการวิเคราะห์พบว่ามีปริมาณเมทานอล 355.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่พบกรดอะซิติก และค่าความหนืดของสารสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอมีค่าน้อยกว่าสารสกัดเปคตินทางการค้า ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ค่าความหนืด สารสกัดเปคตินทางการค้ามีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทำคอมโปสิทกับสารพอลิเมอร์อื่นเพื่อขึ้นรูปและศึกษาในขั้นตอนของการทำไบโอพอลิเมอร์ นอกจากนี้สารสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดเปคตินทางการค้าจากพืชตระกูลส้มประมาณ 3 เท่า และจากผลการทดสอบการดูดคลายความร้อน ผลการวิเคราะห์หมู่ functional ด้วยเครื่อง FT-IR และผลการวิเคราะห์โครงสร้างภายนอกของผลึกเปคตินด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราดพบว่า สารสกัดเปคตินจากเปลือกส้มโอมีความบริสุทธิ์และมีขนาดใกล้เคียงกันมากกว่าสารสกัดเปคตินทางการค้า

ผลการทำคอมโปสิทระหว่างเปคตินและไบโอพอลิเมอร์ชนิดพอลิแลคติคแอซิด (PLA) เพื่อนำไปขึ้นรูปและวิเคราะห์หาค่าต่างๆ พบว่า สารทั้งสองชนิดเข้ากันได้ดี สามารถขึ้นรูปตามที่ต้องการได้ ปริมาณเปคตินที่ใส่เข้าไปเพิ่มขึ้นมีผลให้ค่าความแข็งของผิวสัมผัสเพิ่มขึ้นแต่ทนต่อแรงกระแทกลดลง และจากค่า Young's modulus ที่แสดงผลสามารถสรุปได้ว่า เปคตินนั้นมีความสามารถในการเพิ่มทั้งความสามารถต่อต้านแรงดึงสูงขึ้นถึง 95.8% เมื่อใช้เปคตินที่ 6% และความยืดหยุ่นของวัสดุก่อนการเปลี่ยนสภาพได้ค่อนข้างดี แต่กลับทำให้เปอร์เซนต์การยืดตัวก่อนขาดนั้นลดลงและยิ่งลดลงเมื่อมีการเพิ่มปริมาณของเปคตินลงไป

# เอกสารอ้างอิง


Al-Ruqaie, I.M., Kasapis, S. and Abeysekera, R. (1997). Structural properties of pectin-gelatin gels. Part II: effect of sucrose/glucose syrup. Carbohydrate Polymers 34, 309-321.

Einhorn-Stoll, U., Kunzek, H. and Dongowski, G. (2007). Thermal analysis of chemically and mechanically modified pectins. Food Hydrocolloids 21, 1101-1112.

Elsabee, M.Z., Abodou, E.S., Nagy, K.S.A. and Eweis, M. (2007). Surface modification of polypropylene films by chitosan and chitosan/pectin multilayer. Carbohydrate Polymers (accepted).

Fishman, M.L. and Coffin, D.R. (1998). Mechanical, microstructural and solubility properties of pectin/poly(vinyl alcohol) blends. Carbohydrate Polymers 35, 195-203.

Gilsenan, P.M, Richardson, R.K. and Morris, E.R. (2003a). Associative and segreegative interactions between gelatin and low-methoxy pectin: Part 1. Associative interactions in the absence of $Ca^{2+}$. Food Hydrocolloids 17, 723-737.

Gilsenan, P.M, Richardson, R.K. and Morris, E.R. (2003b). Associative and segreegative interactions between gelatin and low-methoxy pectin: Part 2. co-gelation in the absence of $Ca^{2+}$. Food Hydrocolloids 17, 739-749.

Grizotto, R.K., Bruns, R.E., De Aguirre, J.M. and De Menezes, H.C. (2007). Technological aspects for restructuring concentrated pineapple pulp. LWT 40, 759-765.

Koubala, B.B., Mbome, L.I, Kansci, G., Mbiapo, F.T., Crepeau, M.J., Thibault, J.F. And Ralet, M.C. (2007a). Physicochemical properties of pectins from ambarella peels (Spondias cytherea) obtained using different extraction conditions. Food Chem. (accepted).

Koubala, B.B., Kansci, G., Mbome, L.I, Crepeau, M.J., Thibault, J.F. And Ralet, M.C. (2007b). Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from “Amelioree” and “Mango” mango peels. Food Hydrocolloids. (accepted).

Koubala, B. B., Kansci, G., Mbome, L. I., Crepeau, M. J., Thibault, J. F. and Ralet, M. C. (2008). Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from "*Amelioree*" and "*Mango*" mango peels. Food hydrocolloids.

Kratchanova, M., Pavlova, E. and Panchev, I (2004). The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. Carbohydrate Polymers 56, 181-185.

Kurita, O., Fujiwara, T. and Yamazaki, E. (2008). Characterization of the pectin extracted from citrus peel in the presence of citric acid. Carbohydrate Polymers 74, 725-730.

Li, F.T., Yang, H., Zhao, Y. and Xu, R. (2007). Novel modified pectin for heavy metal adsorption. Chinese Chemical Letters 18 325–328

Liu, L., Won, Y.J., Cooke, P.H., Coffin, DR., Fishman, M.L., Hicks, K.B. and Ma, P.X. (2004). Pectin/poly(lactide-co-glycolide) composite matrics for biomedical applications. Biomaterials 25, 3201-3210.

Menoli, A.V. and Beleia, A. (2007). Starch and pectin solubilization and texture modification during pre-cooking and cooking of cassava root (Manihot esculenta Crantz). LWT 40, 744-747.

Morris, G.A., Hromadkova, Z., Ebringerova, A., Malovikova,A., Alfoldi, J. and Harding, S.E. (2002). Modification of pectin with UV-adsorbing substitutents and its effect on the structural and hydrodynamic properties of the water-soluble derivatives. Carbohydrate Polymers 48, 351-359.

Norziah, M.H., Kong, S.S., Karin, A.A. and Seow, C.C. (2001). Pectin-sucrose-Ca2+ interactions: effects on rheological properties. Food Hydrocolloids 15, 491-498.

Olano-Martin, E., Rimbach, G.H., Gibson, G.R., & Rastall, R.A. (2003). Pectin and pectic-oligosaccharides induce apoptosis in *in vitro* human colonic adenocarcinoma cells. Anticancer Research, 23(1A), 341–346.

Ough, C. S. and Amerine, M. A. (1988). Methods for Analysis of Musts and Wines . 377 pp. *In*. John Wiley and Sons, New York.

Pilnik, W. (1990). Pectin a many splendoured thing. In G.O. Phillips, P. A. Williams, & D.J. Wedlock (Eds.), Gums and stabilizers for the food industry (pp. 313–326). Oxford: Oxford University Press.

Savary, B.J., Hotchkiss, A.T., Fishman, M.L., Cameron, R.G., and Shatters, R.G. (2003). Development of a Valencia orange pectin methyl esterase for generating novel pectin products. In F. Voragen, H. Schols, & R. Visser (Eds.), Advances in pectin and pectinase research (pp. 345–361). The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Savary, B.J. and Nunez, A. (2003). Gas chromatography-mass spectrometry method for determining the methanol and acetic acid contents of pectin using headspace solid-phase microextraction and stable isotope dilution. Journal of Chromatography A 1017, 151-159.

Singthong, J., Ningsanond, S., Cui, S.W., and Goff, H.D. (2005). Extraction and physicochemical characterization of Krueo Ma Noy pectin. Food Hydrocolloids 19, 793-801.

Thomas, M., Guillemin, F., Guillon, F. and Thibault, J.F. (2003). Pectins in the fruits of Japanese quince (Chaenameles japonica). Carbohydrate Polymers 53, 361-372.

Willats, W.G.T., Knox, J.P., and Mikkelsen, J.D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. Food Science & Technology 17, 97-104.

Yamada, H. (1996). Contribution of pectins on health care. In J. Visser,&A.G. J. Voragen (Eds.), Pectins and pectinases (pp. 173–190). Amsterdam: Elsevier.

Yamada, H., Kiyohara, H., and Matsumoto, T. (2003). Recent studies on possible functions of bioactive pectins and pectic polysaccharides from medicinal herbs. In F. Voragen, H. Schols, & R. Visser (Eds.), Advances in pectin and pectinase research (pp. 481–490). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Yapo, B.M., Lerouge, P., Thibault, J.F. and Ralet, M.C. (2007). Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. Carbohydrate Polymers 69, 426-435.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**Curriculum vitae**

***Name:*** **Chokchai Wanapu (Intapruk)**

***Sex:*** Male

***Nationality:*** Thai

***Religion:*** Buddhism

***Home Address:*** 114/246 Ratchsima-Pakthongchai Road, Nong Ja Bok, Muang, Nakhon ratchasima 30000, Thailand.

***Present Status:*** Associate Professor in Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakonratchasima 30000, Thailand.

***Education Background and Experience:***

From 1978 - 1982: B.Sc. (Chemistry) from Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiangmai University, Chiangmai, Thailand.

From 1982 - 1984: M.Sc. (Biochemistry) from Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

From 1991 - 1994: Ph.D. (Engineering in Biotechnology) from Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Osaka University, Osaka, Japan.

From 1996 – 1997: Head of Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkla 90110, Thailand.

From 1997 – 1999: Director of Center of Scientific and Equipment, Walailak University, Nakonsritummarat 80000, Thailand.

From 1999 – 2001: Director of Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima 30000, Thailand.

From 2002 – 2005: Manager of SUT's Farm, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima 30000, Thailand.

From 2006 – 2011: Chair, School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima 30000, Thailand.

***Scientific Experients:***

Plant and microbial molecular genetics

Fermentation Techniques

Biopolymers

***Symposium:***

Krongjai, T. and **Wanapu, C.** (2004) The transformation of chitinase gene into grape plants. The 4th National Symposium on Graduate Research. 94.

Usansa, U., **Wanapu, C.** and Boonkerd. N. (2004) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. The 4th National Symposium on Graduate Research. 124.

Wongkalasin, K., **Wanapu, C.** and Rodtong, S. (2004) Selection of maolactic bacteria for wine fermentation. The 4th National Symposium on Graduate Research. 128.

Kuapunyakoon, T., **Wanapu, C.**, Boonkerd, N. and Chervin,C. (2004) What is the gene which expression depends ethylene receptor inhibition in berry of Carbernet Sauvignon at veraison. The 4th National Symposium on Graduate Research. 93.

Cheunkum, O. and **Wanapu, C.** (2002) Production of Lactic acid from cassava solid waste.The 3rd National Symposium on Graduate Research.633-634.

Sripunya, P. and **Wanapu, C.** (2005) Selection of Yeast Strains Containing ß-glucosidase for improving Aroma in Grape Wine. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0100.

Tasing, K., **Wanapu, C.**, Boonkerd, N., Wongkaew, S. (2005) Transformation of grape calli variety shiraz with Leucaena chitinase cDNA. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0109.

Wongkalasin, K., **Wanapu, C.** and Rodtong, S. (2005) Selection of malolactic bacteria for wine fermentation. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0116.

Lertpinyochaithaworn, N., Sripiromrak, A. and **Wanapu, C.** (2005) Ma-Maow wine production. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0139.

Usansa, U., **Wanapu, C.** and Boonkerd, N. (2005) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, F0028.

**Wanapu, C.**, Rattana, P., Teaumroong, N. and Boonkerd, N. (2005) Success stories of stainable factory Management for the Thai traditional alcoholic beverage enterprises. In International Symposium on "Corporate sustainablility management – approaches and applications" 24-25 November 2005, Bangkok. Session 2B-3: 1-8.

Boonkerd N., Teaumroong, N., **Wanapu C.** and Chankhun Y. (2005) Application of Bio and Bioorganic fertilizers in organic farming systems for sustainable agriculture. In International Symposium on "Corporate sustainablility management – approaches and applications" 24-25 November 2005, Bangkok. Session 2B-4: 1-7.

Muaenjang, T. and **Wanapu, C.** (2006) The study of ethanol production of thermotolerant yeast S1 strain. The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006, Bangkok.

Sripiromrak, A. and **Wanapu, C.** (2006) Isolation and classification of thermotolerant yeast for ethanol production. The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006, Bangkok.

Wasuwan, R., Boonkerd, N. and **Wanapu, C.** (2006) Classification and nitrogen fixation efficiency analysis of *Azolla* species in rice fields of Thailand. The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006, Bangkok.

Usansa, U., Wanapu, C. and N. Boonkerd (2005) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. 31st Congress on Science and Technology of Thailand, Chaing Mai, 2005.

Usansa U., Burberg, F. Geiger, E., Back W., Tea-umroong, N., **Wanapu, C**. Arendt, E. K., Kreisz, S. and Zarnkow, M. (2008) The use of response surface methodology to optimize malting conditions of two black rice varieties (*Oryza sativa* L. indica) as a raw material for gluten- free foods. First International Symposium on Gluten-Free Products and Beverages, Cork, Ireland, September 2008.

Usansa, U., Burberg, F. Geiger, E., Back W., Tea-umroong, N., **Wanapu, C**. Arendt, E. K., Kreisz, S. and Zarnkow, M. (2009) The optimization of malting condition for Thai rice. 10th RGJ-Congress. Pattaya, April 2009.

Usansa, U, Geiger, E., **Wanapu, C**. and Teaumroong, N. (2009) Improvement of nitrogenous content in wort produced from rice malt. ASBC Annual Meeting. Arizona, USA June 6-10, 2009.

Kongkaew, A., Wanapu, C. and Usansa, U. (2010). Response surface optimization of wort production for brewing from rice malt using commercial enzymes and malt barley. The 16th Asian Agricultural Symposium on Agricultural Technology: Sufficiency Agriculture, August 25 – 27, 2010, Faculty of Agricultural Technology, KMITL, Bangkok, Thailand.

Satsum, A, and **Wanapu, C**. (2010). FT-IR study for hydroxyapatite/alginate nanocomposite beads. The 3rd SUT Graduate Conference 2010, November 21 – 23, 2010, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Li, L., **Wanapu, C**., Huang, X., Huang Q., and Huang, T. (2010). Genetic variation of *Brassica napus* cultivars using SSR markers. The 3rd SUT Graduate Conference 2010, November 21 – 23, 2010, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Kongkaew, A., Wanapu, C., and Usansa, U. (2010). Beer production from rice malt based in pilot scale brewing : chemical and sensorial properties approach. The 3rd SUT Graduate Conference 2010, November 21 – 23, 2010, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Pinpeangchan, S, And **Wanapu, C**. (2012). Controlled releasing of urea fertilizer by biodegradable polymer with convertional encapsulation. Burapha University International Conference 2012, July 9-11, 2012, Burapha University, Chonburi Thailand.

Ditsayabut, P., Kupittayanant P., and **Wanapu, C**. (2012). High selenium-Enriched Yeast Production. Burapha University International Conference 2012, July 9-11, 2012, Burapha University, Chonburi Thailand.

Ditsayabut, P., Kupittayanant P., and **Wanapu, C**. (2012). High selenium-Enriched Yeast Production. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Lertpinyochaithaworn N, and **Wanapu, C**. (2012). Effect of ethanolic on black-kernal rice flavonoids character. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Muaenjang, T., Ponchana P., and **Wanapu, C**. (2012). Improved Enzymatic Hydrolysis of Cassava Residue by Polyethylene Glycol Addition. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Pinpeangchan, S, And **Wanapu, C**. (2012). Controlled releasing of urea fertilizer by biodegradable polymer with convertional encapsulation. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Pliansrithong P., Usansa U., and **Wanapu, C**. (2012).Protein Properties in Broken Rice for optimizing of Rice Ratio in Beer Production. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Satsum, A, and **Wanapu, C**. (2012). FT-IR study for Aiginate/Hydroxyapatite/latex Nanocomposite Beads. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

***Scientific Publication:***

**Intapruk, C.**, Tirawanchai, N., Wilairat, P. and Panyim, S. (1984). Application of cloned malaria parasite DNA in strain identification. Mahidol University Annual Research Abstracts 11, 297.

**Intapruk, C.** (1984). in Manual for international laboratory workshop "Genetic engineering techniques in tropical diseases research" to be published by WHO special programme for research and training in tropical diseases, 195-204.

Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Tungpradubkul, S. and Panyim, S. (1984). Strain characterization of human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, by the use of a cloned parasite DNA probe. Microbial utilization of renewable resources. 4, 210-213.

Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Wilairat, P., Yuthavong, Y. and Panyim, S. (1985). Cloning of repetitive DNA from *Plasmodium falciparum* and its use in strain and species identification. Mahidol University Annual Research Abstracts, 12, 250.

**Intapruk, C.** (1985). in Manual for national laboratory workshop "DNA cloning techniques" (in Thai) to be published by the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, the Ministry of Science and Technology, 172-188.

Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Tungpradabkul, S., Sertsrivanich, R., Panyim, S., Yuthavong, Y. (1985). Recombinant DNA techniques as potential diagnostic means. Ann. Ist. Super. Sanita. 21, 299-305.

Sriroongrueng, W. and **Intapruk, C.** (1989) The prenatal diagnosis of thalassemias (in Thai). Songkla Med J. 6, 428-435.

**Intapruk, C**., Higashimura, N., Yamamoto, K., Okada, N., Shinmyo, A. and Takano M (1991). Nucleotide sequences of two genomic DNAs encoding peroxidase of *Arabidopsis thaliana*. Gene 98: 237-241.

**Intapruk, C.**, Yamamoto, K., Fujiyama, K., Shinmyo, A. and Takano, M. (1993). Cloning of cDNAs encoding two peroxidases of *Arabidopsis thaliana*. J Ferment Bioeng 75: 166-172.

Shinmyo, A., Fujiyama, K., Kawaoka, A. and **Intapruk, C.** (1993). Structure and expression of peroxidase isozyme genes in horseradish and *Arabidopsis*. *In*: KG Welinder, SK Rasmussen, C Penel and H Greppin, eds, Plant Peroxidases Biochemistry and Physiology. Univ Geneva, Switzerland, pp 222-228.

**Intapruk, C.**, Yamamoto, K., Sekine, M., Shinmyo, A. and Takano, M. (1994). Regulatory sequences involved in the peroxidase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Reports 13: 123-129.

**Intapruk, C.**, Takano, M. and Shinmyo, A. (1994). Nucleotide sequence of a new cDNA for peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 104: 285-286.

**Wanapu, C**. and Shinmyo, A. (1996). *cis*-Regulatory of the peroxidase gene in *Arabidopsis thaliana* involved in root specific expression and responsiveness to high-salt stress. Ann New York Acad Sci. 782 (12): 107-114.

Rodtong, S.; **Wanapu, C.** and Ishizaki, A. (2000). Starch-utilizing bacteria for L-lactic acid production. The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. 52.

Kanchanatawee, S., **Wanapu, C.** and Ketudat-Cairns, M. (2000). Biotechnology postgraduate program in Thailand. Thai J. Biotechnol. 2, 55-62.

Sripo, T., Phongdara, A., **Wanapu, C.** and Caplan, A.B. (2002). Screening and characterization of aldehyde dehydrogenase gene from *Halomonas salina* strain AS11. J. Biotech. 95, 171-179.

Kuapunyakoon, T. and **Wanapu, C.** (2003). Effects of diammonium phosphate (DAP) supplementation on growth rate and ethanol production of *Saccharomyces cereviseae* K1-V1116 in tamarind wine. Suranaree J. Sci. Technol. 10: 147-151.

Sripunya, P., **Wanapu, C.** and Boonkerd, N. (2005). Effect of ß-glucosidase enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* on aroma production during mango (Chok-anan) wine fermentation. Thai J. Biotechnol. 6: 50-56.

Usansa, U., Sompong, N., **Wanapu, C.,** Boonkerd, N. and Teaumroong, N. (2009). The influences of steeping duration and temperature on the α- and ß- amylase activities of six Thai rice malt cultivars (*Oryza sativa* L. indica). J. Inst. Brew. 105 (2) 140-147.

Teaumroong, N., **Wanapu, C**., Chankum, Y., Arjharn, W., Sang-Arthit, S., Teaimthaisong, K. and Boonkerd, N. (2010). Production and application of bioorganic fertilizers for organic farming systems in Thailand: A case study. In: Insam, H. , Franke-Whittle, I. and Goberna, M. (eds). Microbs at work: from wastes to resources. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 294-296.

Usansa, U., Burberg, F., Geiger, E., Back, W., **Wanapu, C.,** Arendt, E.K., Kreisz, S., Boonkerd, N., Teaumroong, N. and Zarnkow, M. (2011). Optimization of malting for two black rice varieties, black non-waxy rice and black waxy rice (*Oryza sativa* L. Indica). J. Inst. Brew. 117(1), 39–46.

Vechklang, K., Boonanuntanasarn S. Ponchunchoovong, S., Pirarat N. and **Wanapu, C.** (2011). The potential for rice wine residual as an alternative protein source in a practical diet for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at the juvenile stage. Aqua. Nut., 17(6), 685-694.

Li L., **Wanapu, C.**, Huang, X., Huang, T., Li, Q., Peng, Y. and Huang, G. (2011). Comparison of AFLP and SSR for Genetic Diversity Analysis of *Brassica napus* Hybrids. J Agri. Sc. 3(3), 101-110.

Boonterm, C., **Wanapu, C**., Silapapun, A. and Boonkerd, N. (2011). Effects of nitrogen, potassium fertilized, and clusters per vine on anthocyanins content in cabernet sauvignon wine. Suranaree J. Sci. Technol. 18(1), 41-54.

Li, L., Huang, X., **Wanapu, C**., Li, Q., Huang, G. and Huang, T. (2011). Genetic diversity analysis of 25 rapeseed varieties from Guizhou rapeseed regional test by SSR marker. Guizhou Agri. Sc. 11, 1-4 (in Chinese).

**Wanapu, C.,** Sripunya, P. and Boonkerd, N. (2012). Selection of yeast strains □-glucosidase for improving wine aroma. J. Agri. Sc. Technol. B, 2, 691-702.

Kongkaew, A., Usansa, U. and **Wanapu, C.** (2012). Beer production from rice mait based in pilot-scale: volatile compounds and sensorial properties analysis. The Journal of King Mongkut's University of Technology. 3(1), 86-94.

Kongkaew, A., Usansa, U. and **Wanapu, C.** (2012). Optimisation of wort production from rice malt using enzymes and barley malt. Af. J. Biotech. 11(42), 9941-9949.

Vechklang, K., Lim, C., Boonanuntanasarn, S., Welker, T., Ponchunchuwong, S., Klesius, P.H. and **Wanapu, C.** (2012). Growth performance and resistance to Streptococcus iniae of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets supplemted with GroBiotic-A and Brewtech dried brewers yeast. J App. Aqua. 24, 183-198.

***Patents:*** 5 Thai patents and 3 Trade Secrets.

***Current Research Works:***

1. The Bioprocess Control of Microbial Alginates for Industrial Production.
2. Composition of Biopolymer and Filmogenics.
3. Improvement of Bioethanol Production by Using Thermotolerant Yeasts and Bioconversion.
4. Thai Rice Beer Production.