

ชื่อโครงการวิจัย

ชื่อภาษาไทย การศึกษาการใช้เอนไซม์สกัดสารสตีวียอลไกลโคไซด์จากหญ้าหวานเพื่อผลิตเป็นไซรัปหญ้าหวานและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เบเกอรี่

ชื่อภาษาอังกฤษ The study of using enzyme extraction of Steviol glycosides from *Stevia rebaudiana Bertoni* for production of stevia syrup and application in bakery product.

ชื่อและสกุลผู้วิจัย

นางสาวชลธิชา	รอดบาง	รหัสประจำตัว	581310011
นางสาวหทัยวัลย์	เชิดชู	รหัสประจำตัว	581310070
นางสาวอชิรญาณ์	สืบประเสริฐกุล	รหัสประจำตัว	581310071

สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย อาจารย์ ดร. สุคันธา โอศิริพันธุ์

ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

ปัจจุบันจะเห็นว่าอัตราการเกิดโรคอ้วน โรคเบาหวาน และโรคความดันโลหิตสูง เพิ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (ขนิษฐ, 2555) จึงทำให้ในปี 2560 กระทรวงสาธารณสุขได้มีการรณรงค์เรื่อง การลดการบริโภคน้ำตาลของคนไทย จึงเป็นเหตุให้มีการประกาศการเพิ่มระดับภาษีน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบในอาหารทุกชนิด รวมถึงยุคสมัยที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้ผู้บริโภคหันมาใส่ใจในเรื่องของสุขภาพมากขึ้น ส่งผลให้ผู้ประกอบการในระบบอุตสาหกรรมอาหารทุกระดับได้มีการคิดค้น พัฒนา และปรับปรุงสูตรผลิตภัณฑ์อาหารให้มีการลดการใช้ปริมาณน้ำตาลซูโครสลง และนำสารให้ความหวานแทนน้ำตาลมาใช้แทนมากขึ้น จึงส่งผลให้การใช้สารให้ความหวานแทนน้ำตาลได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นอย่างกว้างขวาง โดยสารให้ความหวานจากธรรมชาติก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ผู้บริโภคให้ความสนใจอย่างต่อเนื่อง และหนึ่งในสารให้ความหวานจากธรรมชาติที่ได้รับความนิยมมากขึ้นในระบบอุตสาหกรรมอาหารทุกระดับคือ สารสกัดจากหญ้าหวาน ที่สามารถให้รสชาติหวานมากกว่าน้ำตาลซูโครสถึง 300 เท่า (Struck, Jaros, Brennan, & Rohm, 2014) อีกทั้งยังสามารถทนความร้อน กรดและด่างได้อีกด้วย โดยสารสกัดดังกล่าวคือ สารสตีวียอลไกลโคไซด์ สำหรับการใส่สารสตีวียอลไกลโคไซด์ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 360 ได้ระบุไว้ว่า สารสกัดสตีวียอลไกลโคไซด์ที่นำมาใช้นั้นต้องมีความบริสุทธิ์ ห้ามมีการใช้ใบหญ้าหวานโดยตรง และสำหรับปริมาณที่ใช้นั้น ต้องเป็นไปตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ดังนั้นการพัฒนาสารสกัดสตีวียอลไกลโคไซด์ให้อยู่ในรูปแบบไซรัปนั้น จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ที่สามารถนำไปปรับประยุกต์ใช้ในระบบ

อุตสาหกรรมอาหารได้สะดวกมากขึ้น ในแง่ของการควบคุมปริมาณการใช้ที่มีความสะดวกมากขึ้น ในด้านของการไม่จำเป็นต้องนำไปละลายน้ำ และสำหรับในด้านของผู้บริโภคนั้น สามารถนำไปเติมลงในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ ได้ทันที เช่น ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม หรือนำไปประกอบอาหารในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ เป็นต้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาการสกัดสารสตีวียอลไกลโคไซด์ด้วยเอนไซม์เพื่อพัฒนาเป็นไซรัปหญ้าหวาน และนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ เพื่อเพิ่มมูลค่าของหญ้าหวาน และยังช่วยเพิ่มกลุ่มเป้าหมายผู้บริโภคที่รักสุขภาพให้กับผู้ประกอบการอุตสาหกรรมอาหารประเภทเบเกอรี่อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษากรรมวิธีการสกัดสารสตีวียอลไกลโคไซด์ด้วยเอนไซม์
2. เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ไซรัปหญ้าหวานจากสารสตีวียอลไกลโคไซด์
3. เพื่อประยุกต์ใช้ไซรัปหญ้าหวานในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่

ประโยชน์ที่ได้รับจากการศึกษา

1. ทราบถึงกระบวนการที่เหมาะสมในการสกัดสารสตีวียอลไกลโคไซด์ด้วยเอนไซม์
2. สูตรการผลิตไซรัปหญ้าหวาน
3. แนวทางการประยุกต์ใช้ไซรัปหญ้าหวานในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1) หญ้าหวาน

หญ้าหวานเป็นพืชล้มลุกชนิดหนึ่ง มีลักษณะเป็นพุ่มเตี้ย ความสูงประมาณ 30 - 90 เซนติเมตร ซึ่งในปัจจุบันมีการบริโภคอย่างกว้างขวาง เนื่องจากหญ้าหวานสามารถนำไปบริโภคแทนน้ำตาลได้ โดยคุณสมบัติของหญ้าหวานนั้นมีแคลอรีที่ต่ำและมีความหวานมากกว่าน้ำตาล 10 - 15 เท่า ทั้งนี้สารสตีวียอลไกลโคไซด์ที่ได้จากการสกัดจากใบหญ้าหวาน เป็นสารให้ความหวานที่มีแคลอรีที่ต่ำเมื่อเทียบกับแซคคารินและแอสปาแตม และให้ความหวานมากกว่าน้ำตาลทรายถึง 300 เท่า ซึ่งในใบหญ้าหวานมีสารสตีวียอลไกลโคไซด์หลายชนิดที่ให้ความหวาน แต่ชนิดที่ให้ความหวานเป็นหลักคือ สตีวิโอไซด์ และ rebaudioside A นอกจากสารสกัดจากหญ้าหวานจะให้ความหวานแทนน้ำตาลแล้ว ยังเป็นสารจากธรรมชาติ ทนความร้อนได้สูงถึง 200 องศาเซลเซียส และทนต่อกรด จึงทำให้เป็นสารที่น่าสนใจในด้านอุตสาหกรรมอาหารเป็นอย่างมาก ส่วนในด้านของสุขภาพพบว่าหญ้าหวานถูกแนะนำให้ใช้ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน โรคอ้วนและสามารถป้องกันฟันผุได้อีกด้วย

สติวอลไกลโคไซด์ พบอยู่ในส่วนประกอบของหญ้าหวาน ดังนี้ Stevioside, Rebaudioside A, Rebaudioside B, Rebaudioside C, Rebaudioside D, Rebaudioside E, Rebaudioside F, Steviolbioside, Dulcoside A และมีรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องหลายฉบับ ที่พบว่าการนำสารสติวอลไกลโคไซด์ออกจากหญ้าหวาน นิยมใช้วิธีการสกัดทางเคมีและกายภาพ เช่น วิธีการสกัดด้วยน้ำ วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย

2) กระบวนการสกัดสติวอลไกลโคไซด์ในหญ้าหวาน

วิธีการสกัดสติวอลไกลโคไซด์จากหญ้าหวาน สามารถสกัดได้หลายวิธี ได้แก่

1. การสกัดหญ้าหวานด้วยวิธีทางกายภาพ วิธีที่นิยมใช้ในการสกัดคือ การสกัดด้วยน้ำด้วยวิธี PHWE เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคสูง
2. การสกัดหญ้าหวานด้วยวิธีทางเคมี มักเป็นการสกัดด้วยตัวทำละลาย เช่น เมทานอล เอทานอล และยังสามารถใช้ supercritical fluid extraction โดยใช้ CO₂ เป็นตัวทำละลายได้ แต่การใช้ CO₂ เพียงชนิดเดียวในการสกัดไม่มีประสิทธิภาพพอสำหรับการสกัดสติวอลไกลโคไซด์ เนื่องจากเป็นสารที่มีขี้ จึงต้องผสมตัวทำละลายอื่น ๆ ร่วม
3. การสกัดหญ้าหวานด้วยเอนไซม์ เป็นวิธีที่ใช้เอนไซม์สลายพันธะในหญ้าหวานเพื่อให้ได้สารให้ความหวานออกมาในปริมาณมาก และยังปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ทั้งนี้พบว่าวิธีการสกัดด้วยเอนไซม์เป็นวิธีที่ไม่ใช้สภาวะรุนแรง

3) เอนไซม์ในการสกัดสติวอลไกลโคไซด์

เอนไซม์ที่มักใช้ในการสกัดสารสติวอลไกลโคไซด์จากใบหญ้าหวาน มีดังนี้

1. เอนไซม์เพกทิเนส (Pectinase) : เป็นเอนไซม์ย่อยสลายพันธะไกลโคซิด (alpha - 1,4) พันธะเอสเทอร์ในเพกทิน (pectin) และสารเพกติก (pectic substance) โดยเอนไซม์เพกทิเนส มีลักษณะเป็นเอนไซม์เชิงซ้อน ประกอบไปด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ
 - 1.1. เพกทินเอสเทอเรส (Pectinesterase)
 - 1.2. พอลิกลาแล็กตูโรเนส (Polygalacturonase)
 - 1.3. เพกเตตไลเอส (Pectate lyases)
2. ไซลานเนส (Xylanase) : จัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเฮมิเซลลูเลส (hemicellulases) ชนิดหนึ่งที่มีหน้าที่ย่อยแกนหลัก (main chain) ของเฮมิเซลลูโลส ซึ่งมีด้วยกัน 2 ชนิด คือ ชนิด endo - 1,4 - β (E.C. 3.2.1.8 ชื่อตามระบบคือ β 1,4 - xylan xylanohydrolase) เร่งปฏิกิริยาการย่อยแบบสุ่มในสายพอลิเมอร์ของไซแลนที่มีแกนหลักเป็น น้ำตาลไซโลสต่อกันด้วยพันธะ β - 1,4 ทำให้ได้ไซโลโอลิ

โกแซ็งคาไรด์และชนิด $\text{exo} - 1,4 - \beta$ (E.C. 3.2.1.37 ชื่อตามระบบคือ $\beta - 1,4 - \text{xylan xylohydrolase}$) ซึ่งย่อยโอลิโกแซ็งคาไรด์จากปลายแต่จะไม่รีดิวซ์ให้สายสั้นลง

3. เซลลูเลส (Cellulase) : ไซเตรคของเซลลูเลส คือ เซลลูโลส ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุด ในธรรมชาติชนิดหนึ่ง สังเคราะห์ได้จาก UTP หรือ GPD - glucose (= donor) และ $[O - \beta - D - \text{glucopyranosyl} - 1 (1,4)]$ (= acceptor) ได้พอลิเมอร์ของกลูโคสในลักษณะ β - configuration คือ $\beta - 1,4$ เป็นพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้น้อยมาก ดังนั้นปฏิกิริยาจึงเฉื่อย (inert) ต่อพวกไฮโดรเลส หรือ hydrolytic enzyme เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลส คือเซลลูเลสซึ่งโดยทั่วไปเป็นเอนไซม์ผสมประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน

4) ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการใช้สารให้ความหวานจากหญ้าหวาน

ปัจจุบันนี้ผลิตภัณฑ์อาหารที่ใช้สารให้ความหวานจากหญ้าหวานแทนน้ำตาล สามารถพบเห็นได้มากขึ้นในท้องตลาด ไม่ว่าจะเป็นเครื่องดื่มหรือผลิตภัณฑ์ในกลุ่มเบเกอรี่ ซึ่งหลายบริษัทนำสารสกัดจากหญ้าหวานมาใช้เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคที่หันมาดูแลสุขภาพ เช่น Coca-Cola ที่ประเทศญี่ปุ่นได้นำสารสกัดจากหญ้าหวานมาทำเป็น Diet coke ดังรูปที่ 1 หรืออุตสาหกรรมเบเกอรี่ที่ใช้หญ้าหวานมาเป็นส่วนประกอบในการทำคุกกี้และเค้ก



รูปที่ 1 ภาพผลิตภัณฑ์ Diet coke ที่มีส่วนผสมของสารให้ความหวานจากหญ้าหวาน

จากการพัฒนาการนำสารสกัดจากหญ้าหวานมาพัฒนาและปรับปรุงลงในผลิตภัณฑ์อาหาร จึงนำมาซึ่งข้อกำหนดต่าง ๆ ในด้านของกฎหมาย ดังนี้

1. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 389 พ.ศ.2561 เรื่องวัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 5)
2. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 355 พ.ศ.2556 เรื่องอาหารในภาชนะบรรจุปิดสนิท
3. ประกาศกรมสรรพสามิต เรื่อง หลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขการเสียภาษีในอัตราตามมูลค่าร้อยละศูนย์สำหรับเครื่องดื่มประเภทน้ำผลไม้และน้ำพืชผัก
4. การคำนวณสติวอลโกลโคไซด์

ขอบเขตและวิธีการวิจัย

ขอบเขตการวิจัย

การศึกษาวิธีการสกัดสารสกัดวีโอลไกลโคไซด์ด้วยเอนไซม์ผสมเพคตินเอส ไชลานเนส และเซลลูเลส ที่สภาวะควบคุมความเข้มข้นของเอนไซม์ผสม 0, 2.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 45 และ 55 องศาเซลเซียส และผันแปรเวลาที่ 60, 90 และ 120 นาที

การพัฒนาสูตรโซลันท์สำหรับหว่านจากสารสกัดวีโอลไกลโคไซด์และไฮโดรคอลลอยด์
การใช้โซลันท์หว่านเพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ ได้แก่ เอแคลร์

วิธีการวิจัย

ตอนที่ 1 การเตรียมตัวอย่าง

วัตถุดิบ ได้แก่ หว่านอบแห้งจากบ้านอมลอง อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ ซื้อมากดหลวง จำนวน 1 กิโลกรัม (ราคา 800 บาท)

นำหว่านอบแห้งมาวัดค่าความชื้นด้วยเครื่อง aw analyzer จากนั้นนำหว่านที่มีค่าความชื้นต่ำกว่า 10% ไปอบไล่ความชื้นด้วยเครื่องปั่นแห้ง และร่อนผ่านตะแกรงด้วยตะแกรงขนาด 80 mesh แล้วจึงบรรจุผงหว่านที่ได้ลงในขวดสีชา พร้อมกับบรรจุซองดูดความชื้น

ตอนที่ 2 การสกัดด้วยเอนไซม์

2.1 เตรียมเอนไซม์ผสมเพคตินเอส ไชลานเนส และเซลลูเลส

เตรียมสารละลายเอนไซม์ Pectinase Xylanase Cellulase (ชื่อทางการค้า : iKnowZyme PXC) (เอเอ็น พี ซายน์, จังหวัดเชียงใหม่) (activity เท่ากับ 100 FBG/g) 100 มิลลิลิตร โดยแปรความเข้มข้นเอนไซม์ 0, 2.5 และ 5 %v/w

2.2 การสกัดสารสกัดวีโอลไกลโคไซด์

นำผงหว่านอบแห้ง 10 กรัม ผสมลงในเอนไซม์ที่เตรียมไว้ และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 45 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60, 90 และ 120 นาที จากนั้นนำไประเหยน้ำเพื่อให้ได้สารสกัดวีโอลไกลโคไซด์เข้มข้นด้วยเครื่อง Evaporator แล้วจึงนำสารสกัดที่ได้ไปตรวจเช็คความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC

ตอนที่ 3 การทำไชรี่ปัญห้าวาน

นำสารสกัดสติวอิออลไกลโคไซด์เข้มข้น ที่ได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับการจีแนน 0.6 กรัมแซนแทนกัม 0.225 กรัม และกลีเซอริน 5 กรัม เพื่อให้ได้เป็นไชรี่ปัญห้าวานปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 30 วินาที

*หมายเหตุ ถ้าจะทำการพาสเจอร์ไรส์ ต้องเตรียมปริมาณไชรี่ปัญห้าวานให้ได้ 10 ลิตร

ตอนที่ 4 การผลิตเอแคลร์จากไชรี่ปัญห้าวาน

สูตรมาตรฐานของการทำเอแคลร์นำมาจาก (โดยความกรุณาของ ผศ.ดร.พินดา รัตนปิติภรณ์)

ส่วนประกอบของตัวเอแคลร์ : นำแป้งเค้ก 100 กรัม นมผง 20 กรัม น้ำ 160 กรัม เนยสด 75 กรัม ไข่ไก่ 3 ฟอง

วิธีการผสม : นำแป้งเค้กและนมผงร่อนผ่านตะแกรงร่อนแป้ง พักไว้ จากนั้นตีมน้ำและเนยสดจนเดือด ใส่แป้งเค้กและนมผงที่ร่อนไว้ลงไป คนจนส่วนผสมเข้ากันดี แล้วจึงเทส่วนผสมที่ได้ลงอ่างผสม ตีส่วนผสมอีกครั้งด้วยหัวตีรูปใบไม้ ความเร็วปานกลาง จนส่วนผสมอุ่น จากนั้นค่อย ๆ ใส่ไข่ไก่ลงไปทีละฟอง ทำการตีต่อจนส่วนผสมเข้ากันดี แล้วจึงใช้หัวบีบขึ้นตัวแป้งและนำเข้าอบที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที พักให้เย็น แล้วจึงทำการใส่ไส้โดยใช้หัวบีบขนาดเล็ก

ส่วนประกอบของไส้เอแคลร์ : แป้งข้าวโพด 50 กรัม น้ำตาลทราย 200 กรัม น้ำ 330 นมข้นจืด 330 ไข่แดง 4 ฟอง เนยสด 50 กรัม และกลีเซอริน 3 กรัม

วิธีการผสม : นำน้ำตาลทรายและนมข้นจืดมาละลายในหม้อตุ๋นจนเดือด จากนั้นทำการร่อนแป้งข้าวโพด และนำไปละลายน้ำ คนให้ส่วนผสมเข้ากันดี แล้วจึงเติมไข่แดงลงไปผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทส่วนผสมที่ได้ลงในส่วนของน้ำตาลทรายและนมข้นจืดที่เดือด ใช้ไม้พายกวนจนส่วนผสมเข้ากัน แล้วจึงยกออกจากเตา เติมนเนยสดและกลีเซอริน คนให้เข้ากัน แล้วพักไว้จนเย็น

แผนการดำเนินการตลอดโครงการ

แผนดำเนินการ	เวลาที่ใช้ (สัปดาห์)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1. ศึกษาข้อมูลการทำวิจัยและจองเครื่องมือ การวิจัยและห้องปฏิบัติการ												
2. ศึกษาการเตรียมผงชูรสหวาน												
3. ศึกษาวิธีการสกัดชูรสหวาน												
4. ศึกษาการทำไซรัปชูรสหวาน												
5. ศึกษาการผลิตเอแคลร์จากไซรัปชูรสหวาน												
6. ทดสอบทางประสาทสัมผัส												
7. รวบรวมข้อมูลทางสถิติและเขียนรายงาน พร้อมทั้งทำสไลด์นำเสนอ												

สถานที่ใช้ในการวิจัย

คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

Struck, S., Jaros, D., Brennan, C., & Rohm, H. (2014). *Sugar replacement in sweetened bakery goods*.

ชนิษฐ์, ร. (2555). สถานการณ์การบริโภคน้ำตาลของประชากรไทย ปี 2540-2553.

http://dental2.anamai.moph.go.th/download/Journal/v17no2_2.pdf

ลงชื่อ
(.....)

ผู้วิจัย

ลงชื่อ
(.....)

ผู้วิจัย

ลงชื่อ
(.....)

ผู้วิจัย

ลงชื่อ
(.....)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย