บทความวิจัย

การลดความขมจากลิโมนินในน้ำส้มเขียวหวานโดยเปลือกไข่

Limonin Debittering of Orange Juice by Egg Shells

ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์[1] ปราณี อ่านเปรื่อง[2] สุหร่าย สายศร[3]

Nutta Laohakunjit[1] Pranee Anprung[2] Surai Saisorn[3]

ABSTRACT

This research involves studying a method of debittering orange juice, in which the bitterness is mainly caused by limonin, using egg shells with various particle sizes for adsorption effect. Analysis of the orange juice constituents indicates that it consists of 0.93% citric acid, 42.95 mg/100 mL of ascorbic acid, pH 3.5, 179.5 ppm of naringin and 11.39 ppm of limonin. To obtain a maximum reducing of limonin content, a stirred tank is used and operated at 25° C, pH 3.5 for 1 hr of adsorption reaction time and applies 15 gm of egg shells with 60-80 mesh in size per 100 mL of orange juice. At such condition, the limonin content is reduced from 11.39 ppm to 7.8 ppm, or 31.5% by weight and caused by lossing of 17.3% vitamin C.

Keyword: Debitter, Egg shells, Orange juice, Limonin

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิธีการลดความขมของน้ำส้มเขียวหวาน ซึ่งมีสาเหตุจากสารลิโมนินเป็นหลัก โดยใช้การดูดซับด้วยเปลือกไข่ขนาดอนุภาคต่างๆ จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำส้มเขียวหวานพบว่ามีกรดซิตริก 0.93% กรดแอสคอบิก 42.95 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร pH 3.5 นารินจิน 179.5 ppm และลิโมนิน 11.39 ppm จากการศึกษาการลดปริมาณ

[1] นิสิตปริญญาโท (Graduate Student)

[2] รองศาสตราจารย์ (Associate Professor)
ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

[3] รองศาสตราจารย์ (Associate Professor)
ภาควิชาอาหารเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Department of Food Chemistry, Faculty of Phamaceutical Science, Chulalongkorn University.

ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์, ปราณี อ่านเปรื่อง และ สุหร่าย สายศร. "การลดความขมจากลิโมนินในน้ำส้มเขียวหวานโดยเปลือกไข่" *อาหาร* 27, 1 (ม.ค.-มี.ค. 2540) 26-35

ลิโมนินในน้ำส้มเขียวหวานโดยใช้เปลือกไข่นี้พบว่า ภาวะที่สามารถลดปริมาณลิโมนินในถังกวนได้มากที่สุดคือที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส pH 3.5 เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เปลือกไข่ขนาด 60-80 เมช ปริมาณเปลือกไข่ 15 กรัมต่อน้ำส้ม 100 มิลลิลิตร ที่ภาวะดังกล่าวนี้ สามารถลดปริมาณลิโมนินจาก 11.39 ppm เป็น 7.8 ppm คิดเป็นการลดลงร้อยละ 31.5 โดยน้ำหนัก และทำให้สูญเสียวิตามินซีร้อยละ 17.3

บทนำ

รสขมในน้ำส้มเขียวหวานเกิดจากสารประกอบ 2 ชนิด คือ ลิโมนิน และ นารินจิน ซึ่งปริมาณของสารประกอบทั้งสองนี้จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระดับความเป็นกรดของน้ำส้มเขียวหวาน ซึ่งมีผลให้ผลิตภัณฑ์น้ำส้มเขียวหวานแปรรูปมีรสขมในระดับที่ผู้บริโภครู้สึกได้และไม่อาจยอมรับคุณภาพผลิตภัณฑ์ดังกล่าว จากรายงานวิจัยพบว่าผู้บริโภคส่วนใหญ่รับรู้รสขมในน้ำส้มที่มีลิโมนิน 6 ppm ขณะที่ผู้บริโภคประมาณร้อยละ 20 รับรู้รสขมจากลิโมนินที่ความเข้มข้น 2 ppm (Norman et al., 1990) ส่วนกรณีของรสขมจากนารินจินผู้บริโภครับรู้รสขมได้ที่ระดับความเข้มข้นสูงมากถึง 600 ppm (Barmore et al., 1986) จัดได้ว่าลิโมนินเป็นสารก่อรสขมตัวที่สำคัญที่สุด จึงได้มีรายงานการกำจัดลิโมนินและนารินจินในน้ำส้มเขียวหวานรวมถึงน้ำมะนาวด้วยวิธีต่างๆ กัน อาทิเช่น การตกตะกอน (Magnoloto, 1981) การแลกเปลี่ยนประจุ (Johnson and Chandler, 1988) การใช้จุลินทรีย์ที่สร้างเอ็นไซม์ลิโมโนเอทดีไฮโดรจิเนส (อัจฉรา และคณะ, 2532) และการใช้สารดูดซับสังเคราะห์ชนิดต่างๆ เช่น β - cyclodextrin (Shaw and Wilson, 1985) Amberlite XAD-7 (Johnson and Chandler, 1982) ที่กล่าวถึงนี้พบว่าสามารถลดปริมาณลิโมนินลงได้ในระดับต่างๆ กัน

สำหรับในงานวิจัยนี้ได้ทดลองศึกษาการลดปริมาณลิโมนินและนารินจินในน้ำส้มโดยใช้สารดูดซับธรรมชาติคือ เปลือกไข่ ขนาดอนุภาคต่างๆ ในระบบไม่ต่อเนื่อง

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมน้ำส้ม ส้มเขียวหวานจากตลาดไท ช่วงอายุประมาณ 35-40 สัปดาห์ แต่ละผลนำมาผ่าครึ่งซีกและคั้นน้ำให้ความร้อนที่ 85 °ซ. เพื่อจะเปลี่ยนสารตั้งต้นของลิโมนินให้เป็นลิโมนินทั้งหมด ทำให้เย็นและปั่นแยกที่ 800 x g 10 นาที ใช้น้ำส่วนใสลดรสขมและรสเปรี้ยว

การเตรียมเปลือกไข่ เปลือกไข่ล้างน้ำให้สะอาด ลอกเยื่อไข่ อบแห้งที่อุณหภูมิ 100 ±10° ซ. บดลดขนาดด้วยเครื่อง analytical mill แยกขนาดด้วยเครื่องเขย่าแบบตะแกรงร่อนเป็นขนาด 20-40 40-60 และ 60-80 เมช

กระบวนการลดความขมและรสเปรี้ยวแบบไม่ต่อเนื่อง ใช้เปลือกไข่ต่อน้ำส้ม 0 5 10 15 เป็นร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาทีในระบบสุญญากาศ เวลา 10 30 60 นาที แยกเปลือกไข่ออกจากน้ำส้มโดยการปั่นแยก 800 x g 5 นาที

2. วิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพ

น้ำส้มก่อนและหลังการเขย่าด้วยเปลือกไข่นำมาวิเคราะห์องศาบริกซ์ (ปริมาณสารที่ละลายน้ำทั้งหมด) ด้วย refractometer, acidity คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์โดยการไตเตรท (Kimball, 1991) วิตามินซีโดยการไตเตรทตามวิธี AOAC (1990) ปริมาณนารินจินโดยสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (Davis, 1947) ปริมาณลิโมนินวัดโดย HPLC ตามวิธีของ Rouseff and Fisher (1980) วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Symmetrical fractorial ขนาด 3x3x3 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

ผลและการวิจารณ์

1. องค์ประกอบของน้ำส้มเขียวหวานสด

ผลการวิเคราะห์น้ำส้มเขียวหวานที่ใช้ทดลองดัง Table 1.

Table 1. Analysis of the orange juice constituents.

Limonin (ppm)	Naringin (ppm)	Citric acid (%)	Vitamin C (mg/100mL)	pH	Brix
11.39	179.5	0.93	42.95	3.5	11

Table 2. Percentage of reduction of limonin, naringin, vitamin C and citric acid with 20-80 mesh of egg shell.

Size (mesh)	Amount (g)	Time (min)	% Reduction			
			Limonin	Naringin[NS]	Vitamin C	Citric acid
20-40	5	10	9.9^{m}	5	8.7^{k}	11.8^{k}
		30	14.4^{k}	6	11.9^{i}	23.7^{j}
		60	18.6^{h}	11	18.5^{c}	32.2^{i}
	10	10	12.8^{l}	11	10.8^{j}	16.1^{k}
		30	19.2^{g}	13	13.0^{h}	35.4^{hi}
		60	22.6^{f}	13	19.6^{b}	44.1^{fg}
	15	10	12.4^{l}	16	14.1^{g}	18.3^{k}
		30	24.6^{e}	17	16.3^{e}	44.1^{fg}
		60	27.3^{c}	21	20.7^{a}	48.4^{de}
40-60	5	10	4.1^{p}	3	10.8^{j}	30.1^{i}
		30	6.6^{n}	17	11.9^{i}	39.8^{gh}
		60	15.0^{k}	18	13.0^{h}	60.2^{bc}
	10	10	14.9^{k}	8	11.9^{i}	34.4^{hi}
		30	15.7^{j}	19	13.0^{h}	52.7^{d}
		60	22.0^{f}	14	15.2^{f}	62.4^{bc}
	15	10	19.5^{g}	16	13.0^{h}	38.7^{gh}
		30	22.3^{f}	23	14.1^{g}	63.1^{bc}
		60	29.6^{b}	24	16.3^{e}	64.5^{b}
60-80	5	10	1.2^{l}	1	8.7^{k}	31.2^{i}
		30	10.3^{m}	14	13.0^{h}	38.7^{gh}
		60	5.2^{o}	9	14.1^{g}	61.3^{bc}
	10	10	12.5^{l}	9	11.9^{i}	41.9^{fg}
		30	14.7^{k}	14	13.0^{h}	51.6^{de}
		60	16.5^{i}	17	15.2^{f}	73.1^{a}
	15	10	19.0^{g}	21	15.2^{f}	46.2^{ef}
		30	26.5^{d}	18	16.2^{e}	58.1^{c}
		60	31.5^{a}	17	17.3^{d}	74.2^{a}

NS : not significantly different at $p > 0.05$

Means with the different letter in the same column are significantly different at $p \leq 0.05$

2. คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ

จากผลการทดลองวัดอัตราการลดลงของลิโมนิน นารินจิน กรดซิตริก และวิตามินซีในน้ำส้มเขียวหวานสองซ้ำโดยใช้เปลือกไข่ขนาดอนุภาค 3 ระดับคือ 20-40 40-60 และ 60-80 เมช ในปริมาณน้ำหนักต่อปริมาตรน้ำส้มต่างๆ รวม 3 ระดับ คือ 5 10 15 กรัมต่อปริมาตรน้ำส้ม 100 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาในถังกวนใน

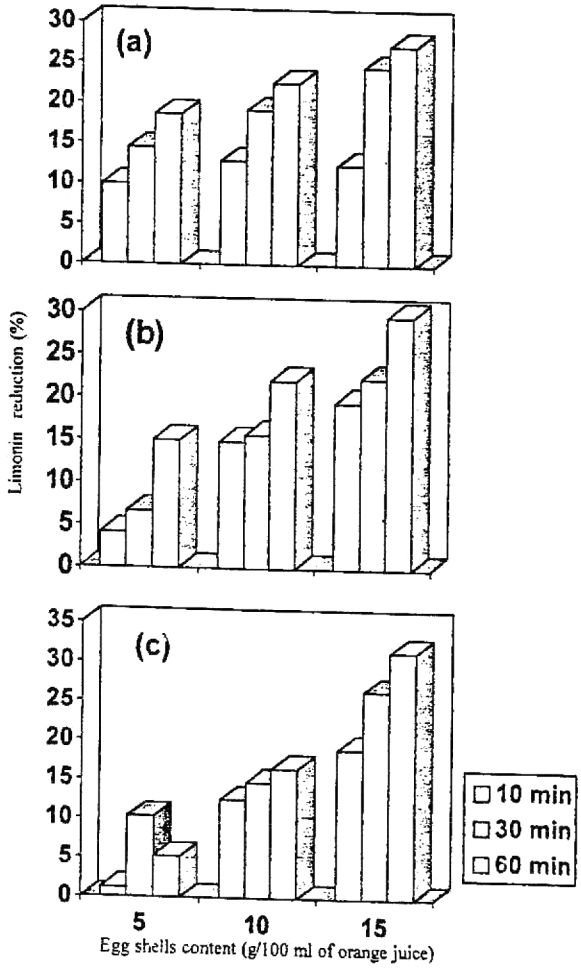

Figure 1. Profile of limonin reduction with 20-40 mesh(a), 40-60 mesh(b) and 60-80 mesh(c) of egg shells

จาก Figure 1. ปริมาณเปลือกไข่ซึ่งมีอนุภาคขนาด 60-80 เมช จำนวนร้อยละ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในเวลา 1 ชั่วโมง จะสามารถลดปริมาณลิโมนินได้สูงสุดจากเดิม 11.39 ppm ลดเหลือ 7.8 ppm คิดเป็นร้อยละ 31.5 ดังแสดงประกอบตาม Figure 2. คือ โครมาโตแกรมของลิโมนินที่ปรากฏในการวิเคราะห์ปริมาณลิโมนินด้วย HPLC จะเห็นว่าปริมาณลิโมนินลดลงจากโครมาโตแกรม A เป็นโครมาโตแกรม B อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

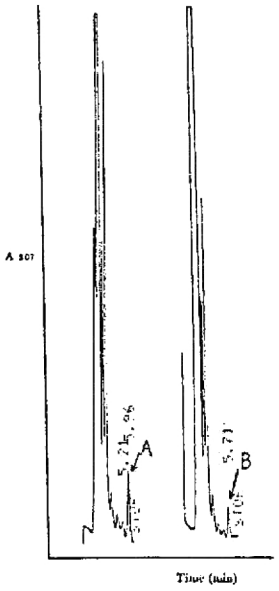

Figure 2. HPLC Chromatogram solvent (first band) and limonin (second 1 band).
Peak A = Limonin in raw orange juice measured at A 207 nm.
Peak B = Limonin in treated orange juice measured at A 207 nm.

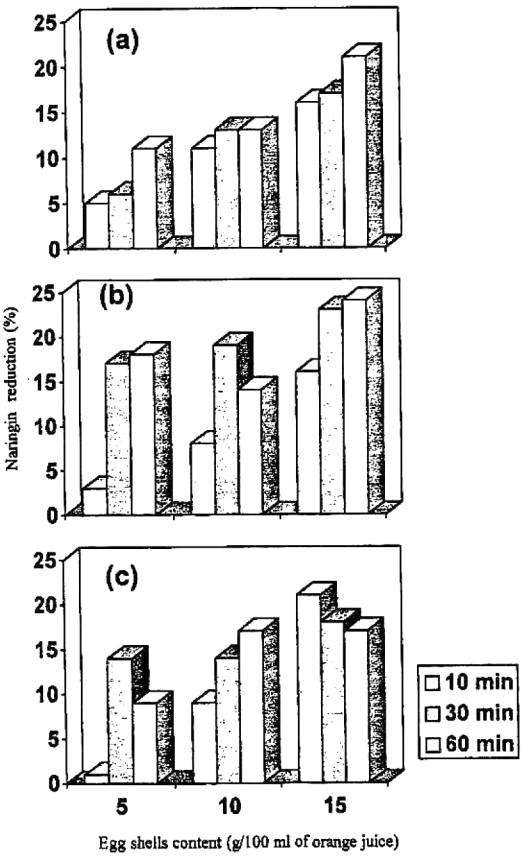

Figure 3. Profile of naringin reduction with 20-40 mesh(a), 40-60 mesh(b) and 60-80 mesh(c) of egg shells

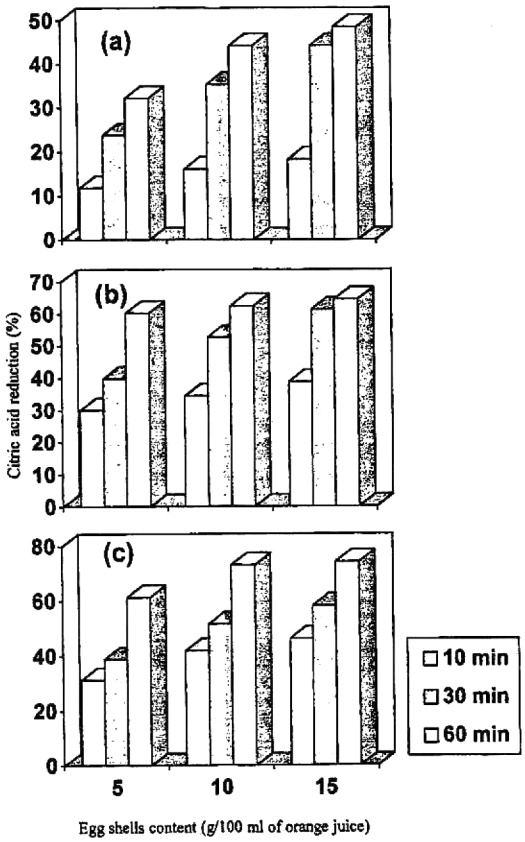

Figure 4. Profile of citric acid reduction with 20-40 mesh(a), 40-60 mesh(b) and 60-80 mesh (c) of egg shells

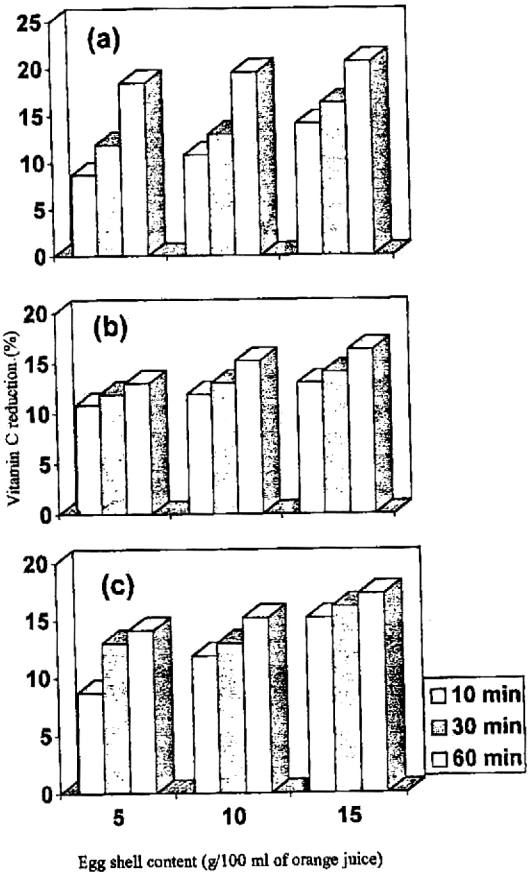

Figure 5. Profile of vitamin C reduction with 20-40 mesh(a), 40-60 mesh(b) and 60-80 mesh (c) of egg shells

จาก Figure 3. แสดงว่าปริมาณนารินจินไม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

จาก Figure 4. และ 5. พบว่าปริมาณกรดซิตริกและกรดแอสคอบิกหรือวิตามินซีลดลงอย่างมีนัยสำคัญ($p\leq0.05$) ซึ่งภายใต้สภาวะของการทดลองที่ปริมาณลิโมนินลดลงได้สูงสุด ปริมาณกรดทั้งสองชนิดนี้ก็ลดลงได้สูงสุดได้เช่นกัน กล่าวคือกรดซิตริกลดลงจากเดิมร้อยละ 0.93 เป็น 0.25 ส่วนกรดแอสคอบิลดลงจากเดิม 42.95 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร เป็น 35.48 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 73.1 และ 17.3 ตามลำดับ

จากการเปรียบเทียบกับรายงานวิจัยที่ใช้สารประกอบสังเคราะห์เป็นตัวดูดซับพบว่าเปลือกไข่มีข้อได้เปรียบกล่าวคือ ตามรายงานของ Chandler et al. (1968) พบว่าเมื่อใช้โพลีอาไมด์ จะลดลิโมนินได้ร้อยละ 29-43 สูญเสียวิตามินซีถึงร้อยละ 30 รายงานของ Nisperos and Johnson (1982) พบว่าสามารถลดลิโมนินได้เพียงร้อยละ 17.5 ถ้าใช้โพลีอาไมด์ การที่เปลือกไข่มีประสิทธิภาพในการดูดซับลิโมนินได้นั้นมีผลมาจากโครงสร้างของเปลือกไข่เป็นผลึกแคลเซียมคาร์บอเนตรูปหกเหลี่ยม (Kaplan and Sigmund, 1973) ในเปลือกไข่มีรูพรุนซึ่งมีรูปร่างตั้งแต่รูปไข่ถึงกลมโดยที่รูขนาดใหญ่มีขนาด 0.022-0.029 มิลลิเมตร รูเล็กสุดมีขนาด 0.0038-0.0054 มิลลิเมตร ถ้าพิจารณาขนาดโมเลกุลของลิโมนินซึ่งมีขนาด

7x10x14 อังสตรอม (Arnott et al.,1960) จะมีขนาดเล็กกว่ารูเปลือกไข่ แต่การที่เปลือกไข่ดูดซับลิโมนินได้ร้อยละ 31 โดยวิธีทำปฏิกิริยาในถังกวนนั้นสืบเนื่องจากเส้นใยโปรตีนที่ปิดรูเปลือกไข่มีกลุ่มอะมิโนสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างกลุ่มแลคโตนของลิโมนินเป็นพันธะระหว่างอะมิโน-ไฮโดรเจนเช่นเดียวกับโพลีอาไมด์ซึ่งมีกลุ่มอาไมด์ (Chandler et al., 1968) ส่งผลทำให้การแลกเปลี่ยนอิออนระหว่างกลุ่มแลคโตนของลิโมนินและผลึกแคลเซียมคาร์บอเนตเกิดได้ไม่เต็มที่

ส่วนกรณีที่เปลือกไข่ดูดซับนารินจินได้น้อยอาจเนื่องจากนารินจินมีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าลิโมนินจึงเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าลิโมนิน (Johnson and Chandler, 1988) นอกจากนี้เปลือกไข่สามารถลดกรดซิตริกได้ดีมากถึงร้อยละ 70 น่าจะเกิดจากการแลกเปลี่ยนอิออนซึ่งจะเป็นผลดีกับส้มพันธุ์ที่มีรสเปรี้ยวจัดรวมทั้งจะเป็นผลดีในการชลอปริมาณการเปลี่ยนสารตั้งต้นของลิโมนินไปเป็นลิโมนินในระหว่างการเก็บต่อไป แต่เปลือกไข่ไม่มีผลต่อค่าองศาบริกซ์อย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ดังนั้นเปลือกไข่ไม่เป็นตัวดูดซับน้ำตาลในน้ำส้มคั้น

สำหรับการลดลงของวิตามินซีถึงร้อยละ 17.2 นั้น ส่วนใหญ่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นจากสภาวะมีออกซิเจน ดังนั้นถ้าต้องการคงรักษาระดับวิตามินซี ต้องหลีกเลี่ยงสภาวะการทดลองที่มีออกซิเจนหรือเร่งสภาวะการทดลองให้เร็วที่สุด ซึ่งในกรณีนี้คณะผู้วิจัยมีข้อมูลจากการดูดซับสารให้รสขมอย่างต่อเนื่องภายใต้บรรยากาศก๊าซไนโตรเจนพบว่าไม่สูญเสียวิตามินซี (ณัฏฐา และ คณะ, 2539)

บทสรุป

การนำเปลือกไข่ซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้ในการลดรสขมและรสเปรี้ยว สามารถลดปริมาณลิโมนินได้ร้อยละ 27-31 ลดกรดได้ร้อยละ 48-70 ถึงแม้ว่าตัวดูดซับสังเคราะห์หลายชนิดมีประสิทธิภาพในการดูดซับลิโมนินและนารินจินได้มากกว่าร้อยละ 50 นั้น USFDA ยังไม่อนุญาตให้ใช้ตัวดูดซับสังเคราะห์ทุกตัวกับอาหาร ได้แต่อนุญาตให้ใช้ตัวดูดซับ 4 ชนิดในการดูดซับกรดซิตริกได้แก่ Duolite A378 Amberite IRA93 Duolite A30B Amberite IRA68 (Johnson and Chandler, 1988) ดังนั้นการใช้เปลือกไข่ซึ่งเป็นสารธรรมชาติน่าจะนำมาใช้ทดแทนได้ คณะผู้วิจัยจะได้ทำการทดลองศึกษาประสิทธิภาพของเปลือกไข่ในการลดปริมาณลิโมนินเพื่อใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำส้มต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์ สุหร่าย สายศร และ ปราณี อ่านเปรื่อง. 2539. Continuous limonin debittering of orange juice by egg shell column. (During preparation)

อัจฉรา ปีติปัญญากุล ปราณี อ่านเปรื่อง และ ชัยยุทธ ธัญญพิทยากุล. 2532. การลดความขมจากลิโมนินในน้ำมะนาวโดยเซลล์จุลินทรีย์ *Corynebacterium facials*. *วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย* เล่มที่ 14(1) หน้า 53-57.

AOAC. 1990. Official methods of analysis 15th ed., *The Association of Official Analytical Chemists*. Washington D.C.

Arnott, S., Davie, A.W., Robertson, J.W., Sim, G.A. and Watson, D.G. 1960. The structure of limonin. *Experientia* 26: 49.

Barmore, C.R., Fisher, J.F. Fellers, P.J. and Rouseff, R.L. 1986. Reduction of bitterness and tartness in grapefruit juice with florisil. *J. Food Sci.* 51: 415.

Chandler, B.V., Kefford, J.F. and Ziemelis, G. 1968. Removal of limonin from bitter orange juice. *J. Sci. Food and Agric.* 19: 83-86.

Davis, W.B. 1947. Determination of flavanones in citrus fruits. *Anal Chem.* 19:476-478.

Johnson, R.L. and Chandler, B.V. 1982. Reduction of bitterness and acidity in grapefruit by adsorption process. *J. Sci Food and Agric.* 33: 287.

Johnson, R.L. and Chandler, B.V. 1988. Adsorptive removal of bitter principles and titratable acid from citrus juice. *Food Technology.* 32: 130-137.

Kaplan, S. and Sigmund, K.A. 1973. The structure of the chicken egg shell membranes as studied with the scanning electron microscope and energy dispersive X-ray micro-analysis. *Poultry Sci.* 52: 1798-1801.

Kimball, D. 1991. Citrus processing quality control and technology. New York An *AVI Book*.

Magnoloto, D. 1981. Process for removing bitter taste from a fruit or vegetable

extract, and the debittered product thus obtained. *United States Patent* 4282264.

Nisperos, M.O. and Johnson, R.L. 1982. Removal of naringin and limonin from grapefruit juice using poly-vinylpyrrolidone. *Phil Agr.* 65: 275-282.

Normann, et al. 1990. Removal of bitternes from citrus juices using a past crosslinked adsorbent resin. *United States Patent* 4965083.

Rouseff, R.L. and Fisher, J.F. 1980. Determination of limonin and related limonoids in citrus juices by high performance liquid chromatography. *Anal Chem.* 52: 1228-1233.

Shaw, P.E. and Wilson, C.W. III. 1985. Reduction of bitterness in grapefruit juice with β-cyclodextrin polymer in a continuous flow process. *J. Food Sci.* 50: 1205.