คุณลักษณะของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสในกล้วยน้ำว้า *Musa sapientum* Linn.

Characterization of Polyphenol Oxidase (PPO) in Banana (*Musa sapientum* Linn.)

สมฤดี ไทพาณิชย์ [1] และ ธิดารัตน์ แย้มอาษา

Somruedee Thaiphanit [1] and Tidarath Yamasa

บทคัดย่อ

เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (Polyphenol Oxidase: PPO) ในเนื้อกล้วยน้ำว้า [*Musa sapientum* Linn. (ABB group)] เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดสีที่ไม่เป็นที่ต้องการในผลิตภัณฑ์จากเนื้อกล้วยน้ำว้า ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) อุณหภูมิ กรดซิตริก และกรดแอสคอร์บิก ต่อคุณลักษณะและกิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสในกล้วยน้ำว้า จากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าเนื้อกล้วยน้ำว้าสุกระยะที่ 7 ได้รับคะแนนทางประสาทสัมผัสสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกใช้เนื้อกล้วยน้ำว้าสุกระยะที่ 7 ในการศึกษาครั้งนี้ ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสที่สกัดได้ มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมกับการทำงานเท่ากับ 5.0 ที่อุณหภูมิ 25 °C และสูญเสียกิจกรรม ไป 65.82 % และ 88.77 % เมื่อบ่มที่ pH 3.0 และ pH 9.0 นาน 10 นาที ตามลำดับ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานเท่ากับ 30 °C เมื่อตรวจวัดเสถียรภาพของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสที่สกัดได้ที่ค่า pH ต่างๆ พบว่าเมื่อบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ช่วง pH 4.0-9.0 อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 30 นาที เอนไซม์จะมีกิจกรรมเหลืออยู่ 70 % เมื่อตรวจวัดสเถียรภาพของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสที่สกัดได้ต่ออุณหภูมิต่างๆ พบว่า เมื่อบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7 ที่อุณหภูมิช่วง 0-60 °C เป็นเวลา 10 นาที เอนไซม์ยังคงรักษากิจกรรมไว้ได้ และสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้จากได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 10 นาที นอกจากนี้การใช้กรดซิตริกหรือกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้นในช่วง 0.5-1.5 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสที่สกัดจากเนื้อกล้วยน้ำว้าได้อย่างสมบูรณ์

คำสำคัญ: พอลิฟีนอลออกซิเดส; PPO; กล้วย; กล้วยน้ำว้า; Musa

ABSTRACT

Banana [*Musa sapientum* Linn. (ABB group) 'Kluai Nam Wa'] polyphenol oxidase (PPO) causes undesirable color in banana products. The aim of this research was to investigate the effect of pH and temperature on the characterization of banana PPO including citric acid and ascorbic acid effects on the PPO activity. The sensory evaluation results showed that the 'Kluai Nam Wa' flesh in the stage 7 (PCI 7) had the most acceptability ($p \leq 0.05$); the PCI 7 of this banana was chosen for this study. The optimum pH of crude PPO was 5.0 at 25 °C and 65.82% and 88.77% loss of activity was found after incubation at pH 3.0 and pH 9.0 for 10 min. The enzyme had maximum activity at temperature (optimum temperature) 30°C. The results from pH stability studies showed that 70 % of crude PPO activity was maintained after incubation for 30 min at 0°C in a buffer solution at pH 4.0 – 9.0. From the temperature stability studies, the enzyme had relatively stable when incubated at 0-60ºc for 10 minutes in the buffer solution at pH 7.0. The enzyme activity was completely inactivated when it exposed to 80 ºC for 10 minutes. Moreover, 0.5-1.5% (w/v) citric acid and ascorbic acid fully inhibited the PPO activity.

Keywords: Polyphenol Oxidase; PPO; Banana; Kluai Nam Wa; Musa

Thaiphanit@gmail.com

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University

บทนำ

เนื้อกล้วยน้ำว้า [*Musa sapientum* Linn. (ABB group) 'Kluai Nam Wa'] สามารถใช้รับประทาน และประกอบอาหารได้หลายชนิด ทั้งสามารถแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ส่งขายภายในประเทศ และต่างประเทศ การแปรรูปผลิตภัณฑ์จากกล้วยน้ำว้า เช่น กล้วยตากแห้ง กล้วยอบ และไซรัปจากกล้วยน้ำว้า จะเกิดสีน้ำตาล หรือสีคล้ำได้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีขององค์ประกอบของอาหาร ซึ่งจะมีผลต่อสี กลิ่น รส และคุณค่าทางโภชนาการของอาหาร [1] [2] ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค การเกิดสีน้ำตาลจากการทำงานของเอนไซม์เป็นผลมาจากเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (Polyphenol Oxidase: PPO) ภายในเซลล์ของผลไม้ มีโอกาสสัมผัส และทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) เกิดเป็นสารประกอบพวกเมลานิน (melanin) ที่มีสีน้ำตาล ทั้งนี้มีปัจจัยหลายประการที่ส่งผลต่อคุณลักษณะ และ Activity ของ PPO เช่น ระยะการสุกของพืชที่ใช้เป็นวัตถุดิบ กระบวนการแปรรูป และระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ [3] [4] ที่ผ่านมามีการศึกษาคุณลักษณะ และ Activity ของ PPO ในผักผลไม้ต่างประเทศหลายชนิด เช่น แอปเปิ้ล (*Malus* sp.) แพร์ (*Pyrus* sp.) มันฝรั่ง (*Solanum tumerosum* L.) อาร์ติโชค (*Cynara scolymus* L.) ผักกาดหอม (*Lectuca sativa* L.) และพลัม (*Prunus* sp.) [3] แต่ข้อมูลของ PPO ในเนื้อกล้วยน้ำว้ายังมีค่อนข้างจำกัด การยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลในผลิตภัณฑ์จากเนื้อกล้วยน้ำว้าส่วนใหญ่ยังคงใช้กระบวนการทางความร้อนที่มากเกินความจำเป็น ส่งผลเสียต่อคุณภาพทางโภชนาการ และลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อุณหภูมิ ชนิด และปริมาณสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการแปรรูปผักและผลไม้ ได้แก่ กรดซิตริก และกรดแอสคอร์บิก ต่อคุณลักษณะ และ Activity ของ PPO ในเนื้อกล้วยน้ำว้าของประเทศไทย เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงกระบวนการยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลในผลิตภัณฑ์จากเนื้อกล้วยน้ำว้าที่มีประสิทธิภาพ ช่วยคงคุณภาพทางโภชนาการของเนื้อกล้วยน้ำว้า และช่วยให้ได้ผลิตภัณฑ์จากกล้วยน้ำว้าให้ตรงตามความต้องการของผู้บริโภคมากขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัตถุดิบ

นำกล้วยน้ำว้าสุกในระยะที่ 1 เปลือกกล้วยมีสีเขียว ผลแข็ง ตามมาตรฐาน CSIRO, (1972) [5] โดยได้รับความอนุเคราะห์จากคุณรุ่งอรุณ แย้มอาษา สวนกล้วยจังหวัดกาญจนบุรี และบ่มให้สุกในกล่องกระดาษที่อุณหภูมิ 32±2 °C ความชื้น 70–75 % เมื่อกล้วยสุกถึงระยะที่ 6-8 ตามมาตรฐาน CSIRO, (1972) [5] ดังแสดงโดยรูปที่ 1 จึงสุ่มตัวอย่างออกมาโดยคละหวี และคละลูกเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลอง

สุกระยะที่ 6 สุกระยะที่ 7 สุกระยะที่ 8

รูปที่ 1 กล้วยน้ำว้า

Thaiphanit@gmail.com

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University

2. การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของเนื้อกล้วยน้ำว้า และการคัดเลือก

ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของเนื้อกล้วยน้ำว้าสุกระยะที่ 6 ถึงระยะที่ 8 เพื่อคัดเลือกระยะการสุกของกล้วยน้ำว้าที่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้น ในการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสในเนื้อกล้วยน้ำว้า โดยการวิเคราะห์รายละเอียดเชิงปริมาณ (Quantitative descriptive analysis; QDA) ด้วยการให้คะแนน 1-5 [6] ใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน จำนวน 15 คน และทดสอบการยอมรับ โดยใช้ 9-pointed hedonic scale ด้วยผู้ทดสอบที่มีประสบการณ์ จำนวน 30 คน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3. การศึกษาคุณสมบัติของ crude PPO ในเนื้อกล้วยน้ำว้า

3.1 การเตรียม crude enzyme จากเนื้อกล้วยน้ำว้า

นำเนื้อกล้วยน้ำว้า 200 กรัม มาปั่นรวมกับสารละลาย phosphate buffer pH 7.0 ความเข้มข้น 0.2 M ปริมาณ 200 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องปั่น (Warning Commercial Laboratory Blender รุ่น BE-12) นาน 25 วินาที นำไปหมุนเหวี่ยง ใน refrigerated centrifuge (อุณหภูมิ 4 ºC) ที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที นำส่วนใสมาตกตะกอนโปรตีนด้วย 80 % saturation ammonium sulphate ที่อุณหภูมิ 0 ºC จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงใน refrigerated centrifuge (อุณหภูมิ 4 ºC) ที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยสารละลาย phosphate buffer pH 7.0 ความเข้มข้น 0.2 M ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เก็บ crude enzyme ที่อุณหภูมิ 0 ºC

3.2 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน crude enzyme จากเนื้อกล้วยน้ำว้า ตามวิธีของ Bradford (1976) [7]

3.3 วิเคราะห์ PPO activity ตามวิธีของ Duangmal และ Owusu-Apenten (1999) [8]

นำ crude enzyme มา 200 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลาย phosphate buffer pH 7.0 ความเข้มข้น 0.2 M ปริมาตร 2.80 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 °C วัดการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm โดยใช้เครื่อง spectrophotometer คำนวณอัตราเร็วเริ่มต้นจากความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลา คำนวณ PPO activity โดยให้เอนไซม์ 1 หน่วย (unit) เท่ากับการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง 0.001 หน่วยต่อนาที

3.4 ศึกษา optimum pH ของ crude PPO ในเนื้อกล้วยน้ำว้า ตามวิธีของสิริรัฐ สุดประเสริฐ (2546) [9]

นำ crude enzyme มา 200 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3.0 – 9.0 ปริมาตร 2.80 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 °C วิเคราะห์ PPO activity คำนวณ PPO activity ที่ได้ในแต่ละค่า pH ในรูปของ % relative activity โดยให้ PPO activity ที่มีค่าสูงสุดเป็น 100 % เลือกค่า pH ที่ให้ PPO activity สูงที่สุดไปใช้ในการศึกษา pH stability ของ crude PPO ในเนื้อกล้วยน้ำว้า

3.5 ศึกษา pH stability ของ crude PPO ในเนื้อกล้วยน้ำว้า ตามวิธีของสิริรัฐ สุดประเสริฐ (2546) [9]

นำ crude enzyme มาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ช่วง pH 3.0-9.0 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 บ่มที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ PPO activity ที่อุณหภูมิ 25°C โดยใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH ตามที่เลือกไว้ในข้อ 3.4 ปริมาตร 2.80 มิลลิลิตร เป็นสับสเตรท เปรียบเทียบกับ crude enzyme ในสารละลาย phosphate buffer pH 7.0 อัตราส่วน 1 ต่อ

Thaiphanit@gmail.com

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University

4 ที่ไม่ได้ผ่านการบ่ม (control) คำนวณ PPO activity แต่ละค่า pH ในรูปของ % Relative activity โดยให้ PPO activity ที่วิเคราะห์ได้จาก control มี % Relative activity เท่ากับ 100 %

3.6 ศึกษา optimum temperature ของ crude PPO ในเนื้อกล้วยน้ำว้าตามวิธีของ สิริรัฐ สุดประเสริฐ. (2546) [9]

นำ crude enzyme มา 200 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ช่วง pH ที่เลือกไว้ในข้อ 3.4 ปริมาตร 2.80 มิลลิลิตร วิเคราะห์ PPO activity โดยแปรอุณหภูมิในช่วง 10 - 90 °C ควบคุมอุณหภูมิโดยใช้ water bath คำนวณ PPO activity ที่ได้ในแต่ละอุณหภูมิเป็น % relative activity โดยให้ PPO activity ที่มีค่าสูงที่สุดมี relative activity เท่ากับ 100% เลือกระดับอุณหภูมิที่ให้ PPO activity สูงที่สุดไปใช้ในการศึกษา temperature stability ของ crude PPO ในเนื้อกล้วยน้ำว้า

3.7 ศึกษา temperature stability ของ crude PPO ในเนื้อกล้วยน้ำว้า ตามวิธีของ สิริรัฐ สุดประเสริฐ. (2546) [9]

นำ crude enzyme มาบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิในช่วง 0 - 80 °C นาน 10 นาที นำ crude enzyme ที่บ่มเสร็จแล้วปริมาตร 200 µl นำมาวิเคราะห์ PPO activity โดยใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ที่เลือกไว้ในข้อ 3.4 ปริมาตร 2.80 มิลลิลิตร อุณหภูมิที่เลือกไว้ในข้อที่ 3.6 เปรียบเทียบกับ PPO activity ใน crude enzyme ที่ไม่ได้ผ่านการบ่ม นำ PPO activity ที่ตรวจสอบได้มาคำนวณเป็น % relative activity โดยให้ PPO activity ใน crude enzyme ที่ไม่ได้ผ่านการบ่มมี residual activity เท่ากับ 100 %

การศึกษาสมบัติของ crude PPO ในเนื้อกล้วยน้ำว้า ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD)

4. การศึกษาชนิดของสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลต่อ PPO activity

ศึกษาชนิดของสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลต่อ PPO activity โดยการทดสอบเปรียบเทียบความเข้มข้นของ citric acid ความเข้มข้น 0.5%, 1%, 1.5% w/v, ascorbic acid ความเข้มข้น 0.5%, 1%, 1.5% w/v และสารผสมระหว่าง citric acid ความเข้มข้น 0.5% w/v กับ ascorbic acid ความเข้มข้น 0.5% w/v ผสมกับสารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ตามที่เลือกไว้ในข้อ 3.4 ปริมาตร 2.80 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C จากนั้นนำ crude enzyme ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลายดังกล่าว วิเคราะห์ PPO activity ที่อุณหภูมิ 25 °C เปรียบเทียบกับ reaction mixture ที่ไม่มีการใช้สารป้องกันการเกิดสีน้ำตาล คำนวณร้อยละการยับยั้ง (% inhibition) ตามวิธีของ สิริรัฐ สุดประเสริฐ (2546) [9] จากสมการ % inhibition = [(A0– A1)/A0] ×100 โดย A0 คือ PPO activity ที่ไม่ได้เติมสารยับยั้งการเกิดสีน้ำตาล และ A1 คือ PPO activity ที่ไม่ได้เติมสารยับยั้งการเกิดสีน้ำตาล ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของเนื้อกล้วยน้ำว้า และการคัดเลือก

จากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยการวิเคราะห์รายละเอียดเชิงปริมาณ พบว่ากล้วยน้ำว้าสุกระยะที่ 7 ได้คะแนนสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ในทุกๆ ด้านที่ศึกษา ยกเว้นด้านสี โดยได้คะแนนด้านกลิ่นเท่ากับ 4.45 ซึ่งเป็นกลิ่นหอมของกล้วย ด้านกลิ่นรสแปลกปลอมเท่ากับ 4.45 คือไม่มีกลิ่นรสแปลกปลอม ด้านรสชาติเท่ากับ 4.28 คือมีรสหวานมาก และความชอบโดยรวมเท่ากับ 4.20 (ตารางที่ 1) และจากการทดสอบการยอมรับ โดยวิธี 9-pointed hedonic scale พบว่ากล้วยน้ำว้าสุกระยะที่ 7 ได้คะแนน

Thaiphanit@gmail.com

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University

ความชอบรวมสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ในทุกๆ ด้านที่ศึกษา โดยได้คะแนนด้านสีเท่ากับ 7.61 ด้านกลิ่นเท่ากับ 7.36 ด้านรสชาติเท่ากับ 7.70 และความชอบโดยรวมเท่ากับ 7.81 ซึ่งอยู่ในระดับที่ผู้ทดสอบชอบปานกลางถึงชอบมาก (ตารางที่ 2) จึงเลือกใช้เนื้อกล้วยน้ำว้าสุกระยะที่ 7 ในการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ PPO ในเนื้อกล้วยน้ำว้าต่อไป

ตารางที่ 1 รายละเอียดเชิงปริมาณของกล้วยน้ำว้า (Quantitative descriptive analysis; QDA)

PCI	ลักษณะของกล้วยน้ำว้าสุก				
	ด้านสี (Color)	ด้านกลิ่น (Odor)	ด้านกลิ่นรสแปลกปลอม (Artifact)	ด้านรสชาติ (Taste)	ด้านความชอบโดยรวม (Overall liking)
6	4.50 ± 0.51[a]	2.66 ± 0.84[c]	3.13 ± 1.09[b]	2.50 ± 0.83[c]	2.65 ± 1.00[c]
7	3.82 ± 0.83[b]	4.45 ± 0.67[a]	4.45 ± 0.77[a]	4.28 ± 0.74[a]	4.20 ± 0.79[a]
8	3.00 ± 1.09[c]	4.05 ± 0.81[b]	3.41 ± 0.94[b]	3.93 ± 0.78[b]	3.35 ± 0.71[b]

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a-c] ข้อมูลที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 2 การยอมรับของผู้ทดสอบต่อกล้วยน้ำว้า (9-pointed hedonic scale)

PCI	ลักษณะของกล้วยน้ำว้าสุก			
	ด้านสี (Color)	ด้านกลิ่น (Odor)	ด้านรสชาติ (Taste)	ด้านความชอบโดยรวม (Overall liking)
6	4.73 ± 1.12[c]	4.85 ± 1.55[b]	5.00 ± 1.63[c]	5.20 ± 1.68[c]
7	5.37 ± 1.35[b]	7.36 ± 1.26[a]	7.70 ± 1.03[a]	7.81 ± 0.98[a]
8	7.61 ± 1.15[a]	4.53 ± 1.39[b]	6.16 ± 1.15[b]	6.00 ± 1.35[b]

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a-c] ข้อมูลที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

2. ผลการศึกษาสมบัติของ crude PPO ในกล้วยน้ำว้า

การเตรียม crude PPO จากเนื้อกล้วยน้ำว้าสุก 200 กรัม จะได้ crude PPO ปริมาตร 4 ml ที่มีลักษณะขาวขุ่น มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.33±0.01 μg/g และมี PPO activity เท่ากับ 0.087±0.001 units/mg protein

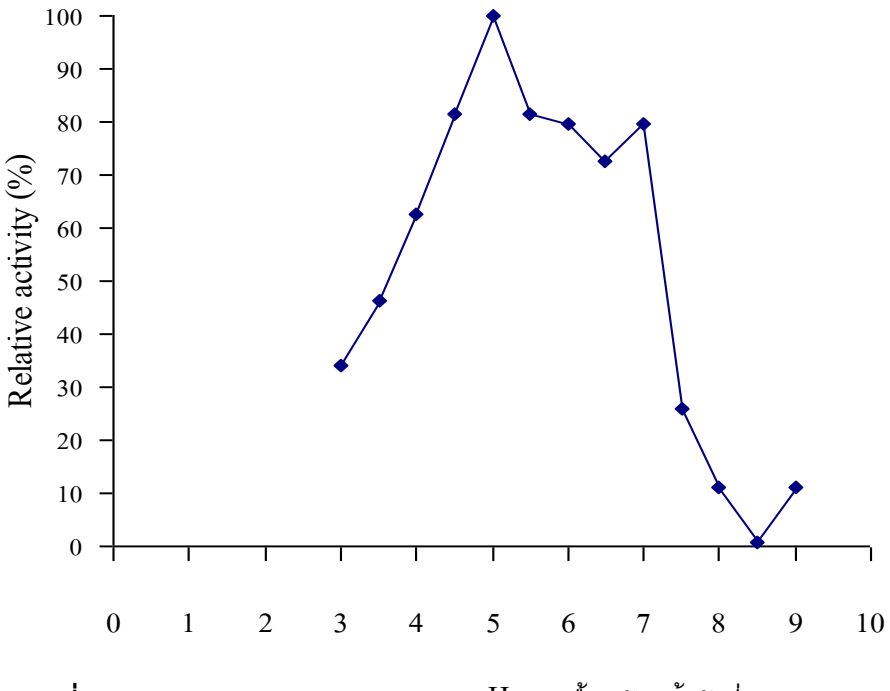
2.1 ผลการศึกษา optimum pH และ pH stability ของ crude PPO

จากการศึกษาพบว่า crude PPO จากเนื้อกล้วยน้ำว้ามี optimum pH เท่ากับ 5.0 (รูปที่ 2) มี activity เหลืออยู่ 34.18 % ที่ pH 3.0 และเหลืออยู่ 11.23 % ที่ pH 9.0 โดยเอนไซม์ยังมี activity เหลืออยู่ 70 % เมื่อบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ช่วง pH 4.0 – 9.0 อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 30 นาที (รูปที่ 3)

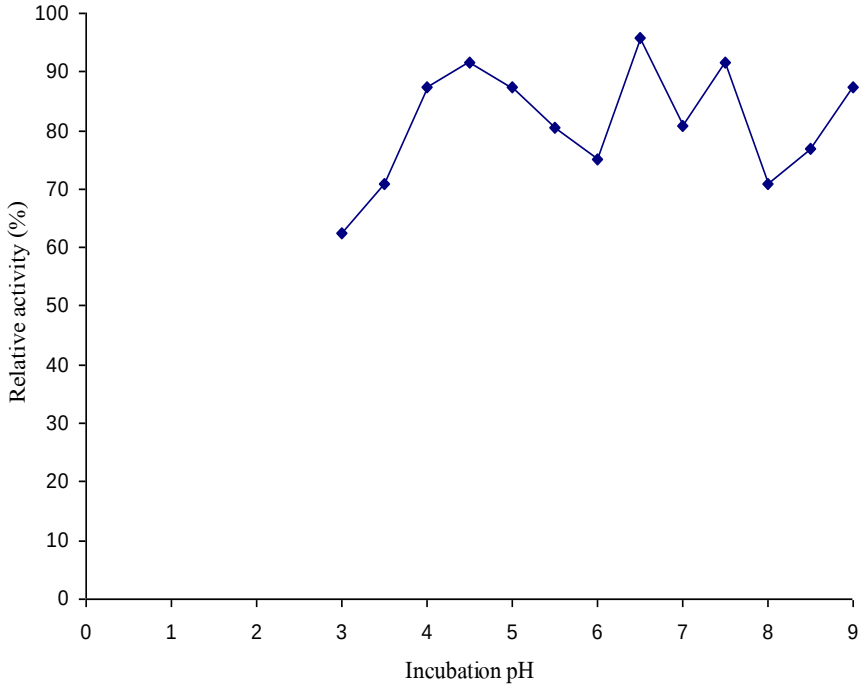
Thaiphanit@gmail.com

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University



รูปที่ 2 pH activity profile ของ crude PPO จากเนื้อกล้วยน้ำว้าที่อุณหภูมิ 25 °C เมื่อใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ เป็นสับสเตรท



รูปที่ 3 pH stability profile ของ crude PPO จากเนื้อกล้วยน้ำว้าที่อุณหภูมิ 25 °C เมื่อใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นสับสเตรท

Thaiphanit@gmail.com

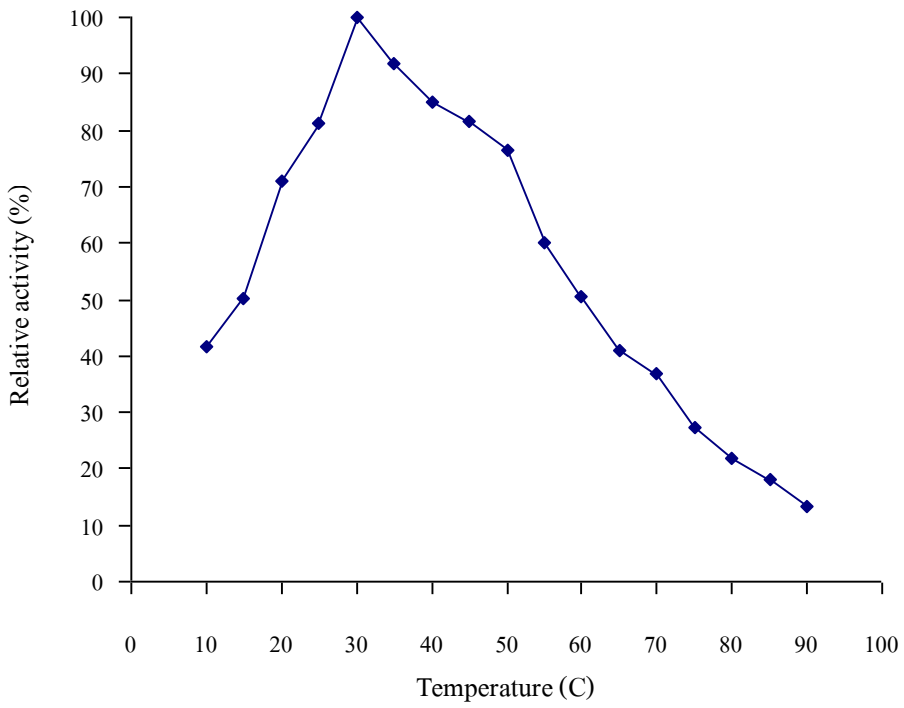
[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University

optimum pH คือ pH ที่ enzyme มี activity สูงที่สุด เมื่อระบบมี pH มากหรือน้อยกว่า optimum pH ของเอนไซม์ก็จะทำให้เอนไซม์มี activity ลดลง โดย pH ไปมีผลต่อการเกิด ionization ของ prototropic group ที่บริเวณ active site ของเอนไซม์ ซึ่งจะทำหน้าที่จับกับสับสเตรท หรือเปลี่ยนสับสเตรทให้เป็นผลิตภัณฑ์ [10] และเนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของ pH จึงส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปสามมิติของโครงสร้างโปรตีน ซึ่งนำไปสู่การเบี่ยงเบนของการจับสับสเตรท เอนไซม์จึงมี activity ลดลง [10] ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Yang และคณะ (2000) [11] ที่ศึกษา pH stabitity ของ PPO บริสุทธิ์ ที่สกัดจากกล้วย (*Musa sapientum* Linn.) โดยมีสับสเตรท เป็นสารละลาย dopamine ซึ่งพบว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพดีที่ pH 5 -11 แต่จะมี activity ลดลงที่ pH < 5

2.2 ผลการศึกษา optimum temperature และ temperature stability ของ crude PPO

จากผลการทดลองพบว่า crude PPO จากเนื้อกล้วยน้ำว้า มี optimum temperature เท่ากับ 30 °C และที่อุณหภูมิ 55 °C crude PPO มี activity เหลือ 60.11 % (รูปที่ 4) ซึ่ง optimum temperature เป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์มี activity สูงที่สุด ดังนั้นหากอุณหภูมิในระบบสูงหรือต่ำกว่า optimum temperature ของเอนไซม์ก็จะทำให้เอนไซม์มี activity ลดลง ผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Whitaker (1996) [10] ที่สรุปว่าโดยปกติ PPO จะมี optimum temperature อยู่ในช่วง 25-35°C และผลการทดลองของ Yang และคณะ (2000) [11] ที่ศึกษา optimum temperature ของ PPO บริสุทธิ์ ที่สกัดจากกล้วย (*Musa sapientum* Linn.) และพบว่า optimum temperature ของ crude PPO มีค่าเท่ากับ 30 °C



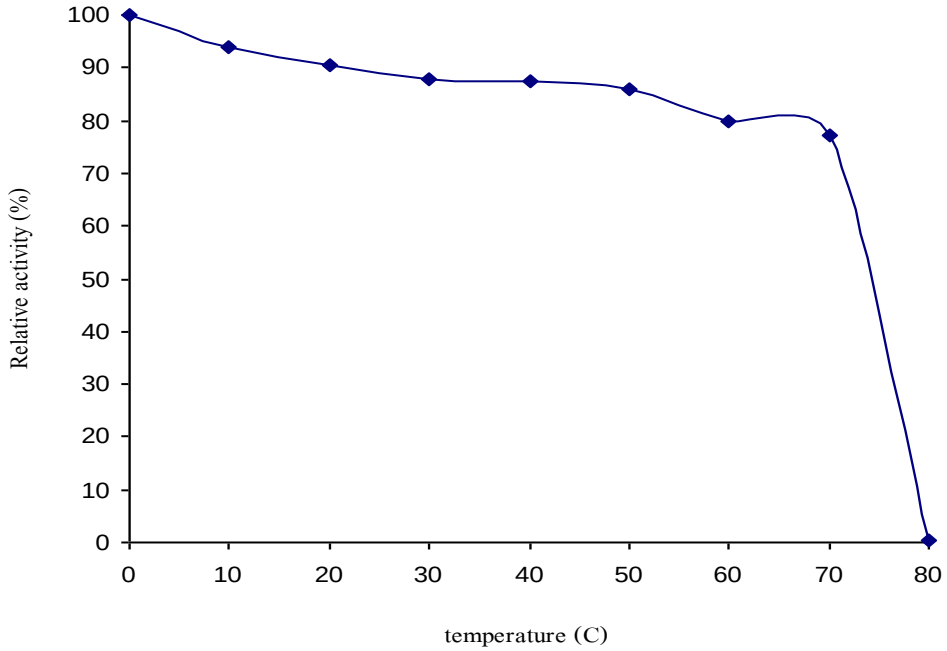
รูปที่ 4 Temperature activity profile ของ crude PPO จากเนื้อกล้วยน้ำว้า

Thaiphanit@gmail.com

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University

เมื่อวิเคราะห์โดยใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นสับสเตรทเมื่อบ่มที่อุณหภูมิช่วง 0 – 60 °C เป็นเวลา 10 นาที Crude PPO ยังคงรักษา activity ไว้ได้ โดยมี activity เหลืออยู่ 79.70 % หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 10 นาที ซึ่ง activity จะลดลงเรื่อยๆ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น และสามารถยับยั้ง activity ของ crude PPO ได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 10 นาที (รูปที่ 5) ผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Galeazzi, Sgarbieri และ Constantinides (1981) [12] ที่พบว่าความร้อนมีผลต่อการทำงานของ PPO จากกล้วยหอมเขียวค่อม (*Musa* (AAA group) "Kluai Hom Khieo Khom") โดยความร้อนสามารถยับยั้งการทำงานของ PPO ได้เนื่องจากความร้อนจะทำให้เอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนเสียสภาพตามธรรมชาติ และไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้



รูปที่ 5 Temperature stability profile ของ crude PPO ในกล้วยน้ำว้า หลังจากบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 10 นาที เมื่อวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 30 °C และใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นสับสเตรท

3. ผลการศึกษาชนิดของสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลต่อ PPO activity

จากการศึกษาชนิดของสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลต่อ PPO activity ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3 พบว่าสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลทั้งสองชนิด คือ กรดซิตริก และกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้นในช่วง 0.5-1.5 % สามารถยับยั้ง PPO activity ได้อย่างสมบูรณ์ กรดซิตริกมีคุณสมบัติเป็น chelating agent จับกับ copper ซึ่งเป็น cofactor ของเอนไซม์ PPO จึงยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PPO และกรดแอสคอร์บิกมีคุณสมบัติเป็น reducing agent ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของสาร o - quinone ไปเป็นสารสีน้ำตาล นอกจากนั้นกรดทั้ง 2 ชนิดยังมีผลทำให้ค่า pH ลดต่ำลง ส่งผลต่อโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์ PPO ทำให้สามารถยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลได้ [13]

Thaiphanit@gmail.com

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University

ตารางที่ 3 ผลของสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลต่อ PPO activity ในกล้วยน้ำว้า

สารป้องกันการเกิดสีน้ำตาล	% inhibition
น้ำกลั่น (Control)	0
กรดซิตริก 0.5% (w/v)	100.0±0.0
กรดซิตริก 1.0% (w/v)	100.0±0.0
กรดซิตริก 1.5% (w/v)	100.0±0.0
กรดแอสคอร์บิก 0.5% (w/v)	100.0±0.0
กรดแอสคอร์บิก 1.0% (w/v)	100.0±0.0
กรดแอสคอร์บิก 1.5% (w/v)	100.0±0.0
กรดซิตริก 0.5% (w/v) ผสมกรดแอสคอร์บิก 0.5% (w/v)	100.0±0.0

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สรุป

จากการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ PPO ในเนื้อกล้วยน้ำว้าสุกโดยการเตรียม crude PPO พบว่ามี optimum pH เท่ากับ 5.0 และมี optimum temperature เท่ากับ 30 °C โดย crude PPO ในกล้วยน้ำว้าจะสูญเสีย activity ไป 65.82 % และ 88.77 % เมื่อบ่มที่ pH 3.0 และ pH 9.0 นาน 10 นาที ตามลำดับ เมื่อตรวจวัด pH stability ของ crude PPO พบว่ายังมี activity เหลืออยู่ 70 % เมื่อบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ช่วง pH 4.0 – 9.0 อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 30 นาที โดย crude PPO ยังคงรักษา activity ไว้ได้ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิช่วง 0 – 60 °C เป็นเวลา 10 นาที และ activity ของ crude PPO จะลดลงเรื่อยๆ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น โดยสามารถยับยั้ง activity ของ crude PPO ได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 10 นาที นอกจากนี้ การใช้กรดซิตริก หรือกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้นในช่วง 0.5-1.5 % (w/v) สามารถยับยั้ง activity ของ crude PPO จากเนื้อกล้วยน้ำว้าสุกได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นจึงควรนำข้อมูลที่ได้ ไปประยุกต์ใช้ในการกำหนดกระบวนการยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลในผลิตภัณฑ์ ช่วยคงคุณภาพทางโภชนาการของกล้วยน้ำว้า และสามารถปรับปรุงลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์จากกล้วยน้ำว้าให้ตรงตามความต้องการของผู้บริโภคมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

[1] Zawistowski, J., Biliaderis, C. G., and Eskin, N. A. M. 1991. Polyphenol oxidase. In D.S. Robinson and N.A.M. Eskin (eds), Oxidative Enzymaes in Foods, pp.217-273. London: Elsevier Applied Science.

[2] Friedman, M. 1996. Food browning and its prevention: an overview. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 44: 631–653.

[3] Urszula Gawlik-Dziki, Urszula Złotek, Michał S´wieca. 2008. Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.). Food Chemistry. 107:129–135.

[4] Min-Kyung Lee. 2007. Inhibitory effect of banana polyphenol oxidase during ripening of banana by onion extract and Maillard reaction products. Food Chemistry. 102:146–149

Thaiphanit@gmail.com

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University

[5] CSIRO. 1972. Division of food research circular 8: Banana ripening guide. Cited in เบญจมาศ ศิลาย้อย .2538. กล้วย. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[6] ธิดารัตน์ แย้มอาษา. 2550. การยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลของเนื้อกล้วยน้ำว้า (*Musa sapientum* Linn.) สุก. ภาคนิพนธ์. ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม.

[7] Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.

[8] Duangmal, K. and Owusu-Apenten, R. K. 1999. A comparative study of polyphenoloxidase from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). Food Chemistry. 64: 351-359.

[9] สิริรัฐ สุดประเสริฐ. 2546. การควบคุมการเกิดสีน้ำตาลในผลิตภัณฑ์กล้วย *Musa sapientum* L. ปริญญานิพนธ์. สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.

[10] Whitaker, J. R.1972. Principles of Enzymology for the Food Science. New York: Marcle Dekker.

[11] Yang, C. P., Fujita, S., Ashrafuzzaman, M. D., Nakamura, N., and Hayashi, N. 2000. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48(7): 2732-2735.

[12] Galeazzi, M. A. M., Sgarbieri, V. C., and Constantinides, S.M. 1981. Isolation, purifioation and physiochemical characterization of polyphenol oxidase (PPO) from a dwarf variety of banana (*Musa cavendishii* L.). Journal of Food Science. 46: 150-155.

[13] Lyengar, R. and McEvily, A. J. 1992. Anti-Browning agent : alternatives to the use of sulfites in foods. Trends in Food Science & Technology. 3: 60-64.

Thaiphanit@gmail.com

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University