บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 กล้วยหอม

กล้วยหอมจัดอยู่ในจีนัส Musa สำหรับชื่อสปีชีส์นั้น นักพฤกษศาสตร์ยังสับสนในการระบุชื่อให้เด่นชัด ดังนั้น ชื่อวิทยาศาสตร์จึงมักระบุชื่อพันธุ์ของกล้วยหอมเพื่อขยายความ *Musa sp.* ให้เด่นชัดขึ้น

กล้วยหอมที่ปลูกในประเทศไทยมีหลายพันธุ์ และพันธุ์ที่ส่งเสริม ได้แก่ พันธุ์หอมทอง (พันธุ์ Gros Michel) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีลำต้นขนาดใหญ่ และแข็งแรง ขนาดเครือใหญ่ และได้สัด--ส่วน แตกต่างจากกลุ่มกล้วยหอมเขียวตรงที่กาบใบด้านบนและเส้นกลางใบมีสีเข้มกว่า และกาบใบด้านในมีสีเขียวหรือสีชมพู ปลายผลมีลักษณะคอดเป็นคอขวด ผลสุกมีสีเหลือง รสหอมหวาน มีเปลือกหนา ทำให้ไม่มีปัญหาเกี่ยวกับการบอบช้ำจากการขนส่งมากนัก แต่มีข้อเสียคืออ่อนแอต่อโรคตายพราย นอกจากนี้ ยังมีการปลูกกล้วยหอมพันธุ์อื่น ๆ ในพื้นที่ทั่วไปและแต่ละพันธุ์จะมีลักษณะแตกต่างกันดังนี้คือ

พันธุ์กล้วยหอมเขียว (พันธุ์ Pisang Masak Hijiau) กล้วยพันธุ์นี้มักอ่อนแอและทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่ดีและโรคใบจุดได้น้อยกว่ากล้วยหอมพันธุ์หอมทอง แต่มีความต้านทานต่อโรคตายพรายเครือบอบช้ำได้ง่าย ผลมีสีไม่สวยและไม่ค่อยสม่ำเสมอ ปลายผลไม่เป็นคอขวด (blunt-ended) แต่มีรสชาติดี

พันธุ์กล้วยหอมค่อม (พันธุ์ Dwarf Cavendish) ต้นมีลักษณะเตี้ย ซึ่งจะช่วยลดความเสียหาย อันเกิดจากลมแรงมากกว่าพันธุ์อื่น เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคใบจุด แต่ต้านทานต่อโรคตายพราย

พันธุ์กล้วยหอมพจมาน (พันธุ์ Gaint Cavindish) ทรงต้นของพันธุ์นี้ใหญ่กว่ากล้วยหอมค่อมและสูงกว่าเพียงเล็กน้อย

แหล่งปลูกกล้วยหอมมีปลูกทั่วไป แต่ที่ปลูกมากเพื่อจำหน่ายในลักษณะผลิตผลทางการเกษตรได้แก่ จังหวัดนครปฐม กรุงเทพฯ ปทุมธานี ราชบุรี เพชรบุรี สมุทรสงคราม สมุทรสาคร (วิจิตร วังใน, 2530)

กล้วยหอมจัดเป็นผลไม้ประเภท climacteric fruit กล่าวคือ กล้วยเป็นผลไม้ที่มีอัตราการหายใจต่ำสุดเมื่อผลแก่ ซึ่งเรียกช่วงนี้ว่า ช่วงพรีไคลเมคเทอริก (preclimacteric) และหลังจากการเก็บเกี่ยว อัตราการหายใจจะค่อนข้างคงที่อยู่ระยะหนึ่ง จากนั้น เมื่อกล้วยหอมเริ่มสุก อัตราการหายใจจะค่อย ๆ สูงขึ้นจนถึงจุดสูงสุดที่เรียกว่า จุด climacteric หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ มีอัตราการหายใจสูงขึ้นพร้อม ๆ กับการสุก หลังจากนั้นอัตราการหายใจจะลดลง ซึ่งเป็นช่วงโพสไคลเมคเทอริก (postclimacteric) หรือ senscence ดังนั้นผลไม้ประเภทนี้หลังจากการเก็บจากต้นแล้วสามารถนำมาบ่มให้สุกได้ (Palmer, 1971)

การจัดระดับความสุกของกล้วย สามารถแบ่งเป็น 8 ระดับโดยใช้สีของเปลือกกล้วยเป็นเกณฑ์ (Gous, van Wyk และ McGill, 1987) ดังนี้คือ

ระดับความสุก	สี
1	เขียว (green)
2	เขียวมีเหลืองเล็กน้อย (green with a trace of yellow)
3	เขียวมากกว่าเหลือง (more green than yellow)
4	เหลืองมากกว่าเขียว (more yellow than green)
5	เหลืองมีเขียวเล็กน้อย (yellow with green trips)
6	เหลือง (completely yellow)
7	เหลืองมีจุดด่างสีน้ำตาล (yellow with brown flecks)
8	เหลืองมีจุดด่างสีน้ำตาลมาก (yellow extensively speckled with brown)

ในระหว่างกระบวนการสุกของกล้วย จะมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบต่าง ๆ ในกล้วย ดังนี้

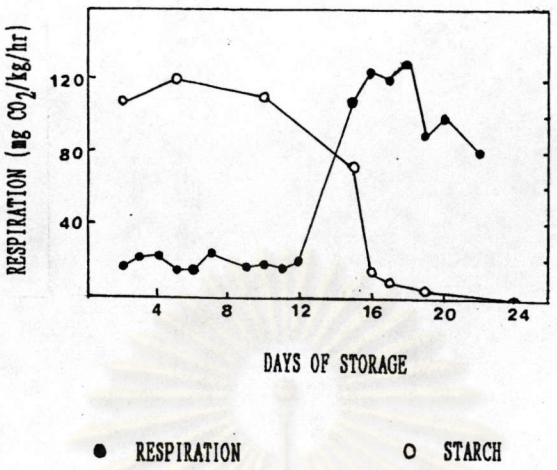
2.1.1 ความชื้น

ความชื้นของเนื้อกล้วย (banana pulp) จะเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการสุก จากร้อยละ 69(±4) ไปเป็นร้อยละ 74(±3) โดยมีสาเหตุมาจาก 2 ปัจจัย คือ ความชื้นที่เพิ่มขึ้น มาจากการสลายโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตในกระบวนการหายใจ และ ความชื้นซึ่งมีผลมาจากการออสโมซิสจากเปลือกมายังเนื้อผล โดยความแตกต่างของความดันออสโมติกระหว่างเปลือก และเนื้อจะมีมากขึ้นในระหว่างกระบวนการสุก เนื่องมาจากปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในเนื้อผลไม้ ซึ่งมีรายงานว่า ค่าความดันออสโมติกของเปลือกและเนื้อกล้วยในช่วงพรี-ไคลเมคเทอริก มีค่าประมาณ 6 บรรยากาศ หลังจากเข้าสู่ช่วงไคลเมคเทอริก ความดันออส--โมติกที่เปลือกจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และจะเพิ่มขึ้นจนถึงประมาณ 11.5 บรรยากาศเมื่อกล้วยสุกเต็มที่ ส่วนความดันออสโมติกของเนื้อกล้วยเพิ่มขึ้นประมาณ 6.5 บรรยากาศ ในระหว่างช่วงไคลเมคเทอริก และจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงประมาณ 25-27 บรรยากาศ เมื่อกล้วยสุกเต็มที่ ดังนั้น จึงทำให้อัตราส่วนของน้ำหนักเนื้อต่อเปลือก (pulp to peel ratio) ซึ่งจากเดิมมีค่าประมาณ 1.2-1.6 ในกล้วยดิบ จะเพิ่มขึ้นเป็น 2.0-2.7 เมื่อกล้วยสุกเต็มที่ อัตราส่วนของน้ำหนักเนื้อต่อเปลือกนี้ จะใช้เป็นค่าแสดง "สัมประสิทธิ์ของความสุก" (coefficient of ripeness) (Palmer, 1971)

2.1.2 คาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรตที่พบในกล้วยดิบส่วนมากอยู่ในรูปของแป้ง และเมื่อกล้วยสุก แป้งเหล่านี้จะถูกไฮโดรไลซ์เปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจาก การทำงานของอะมัยเลส ซึ่งอาจมีมากกว่า 1 ชนิด Garcia และ Lajolo (1988) พบว่า แป้งเริ่มเปลี่ยนเป็นน้ำตาลตั้งแต่ในช่วงพรีไคลเมคเทอริกเพียงไม่กี่วัน ก่อนที่จะเข้าสู่ช่วงไคลเมคเทอริก ดังแสดงในรูปที่ 2.1 และพบว่า ผลจากการไฮโดร์ไลซ์นี้จะทำให้แป้งมีขนาดโมเลกุลเล็กลง และพื้นผิวชั้นนอกมีความขรุขระมากขึ้น พิจารณาจากภาพถ่ายจากกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอน ซึ่งผลงานวิจัยนี้ Kayisu, Hood และ Vansoest (1981) ก็ได้รายงานไว้สอดคล้องกันดังแสดงในรูปที่

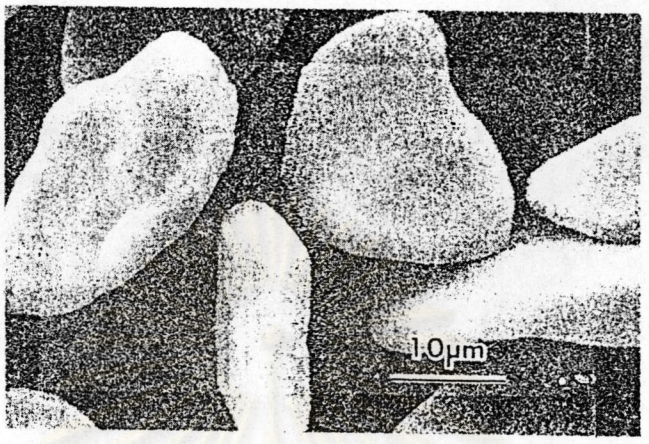
2.2 และ 2.3 ตามลำดับ



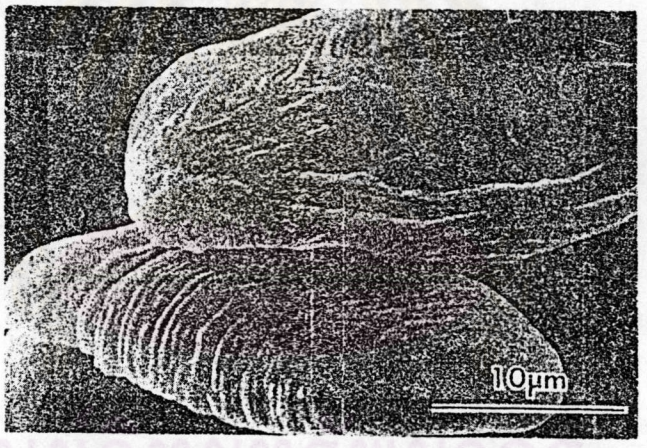
รูปที่ 2.1 ลักษณะการสลายของแป้งในกล้วยระหว่างกระบวนการสุก (Garcia และLajola, 1988)

(1) (2)

รูปที่ 2.2 การเปลี่ยนแปลงของเม็ดแป้งในระหว่างกระบวนการสุกจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน : เม็ดแป้งของกล้วยดิบ ที่มีปริมาณแป้งร้อยละ 18.4 (1) และเม็ดแป้งของกล้วยสุก ที่มีปริมาณแป้งร้อยละ 3.2 (2) (Garcia และ Lajola, 1988)



(1)



(2)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.3 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเม็ดแป้งของกล้วย : เม็ดแป้งของกล้วยดิบ (1) และ เม็ดแป้งของกล้วยสุก (2) (Kayisu และคณะ, 1981)

Lii, Chang และ Young (1982) รายงานว่า ปริมาณแป้งในกล้วยจะลดลงอย่างรวดเร็วจากร้อยละ 62 เมื่อกล้วยมีความสุกระดับ 0 และลดลงไปเป็นร้อยละ 2.6 เมื่อกล้วยมีความสุกระดับ 8 ในขณะที่น้ำตาลรีดิวซ์และซูโครสเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.24 และ 1.23 ที่ความสุกระดับ 0 ไปเป็นร้อยละ 33.57 และ 53.22 ที่ความสุกระดับ 8 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kawabata และ Sawayama (1974) ได้รายงานไว้เช่นเดียวกัน

ข้อมูลการวิเคราะห์ปริมาณของแป้งและน้ำตาลของกล้วยพันธุ์ Musa sp. ที่ได้จากแหล่งข้อมูลต่าง ๆ สรุปไว้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปริมาณของแป้งและน้ำตาลของกล้วยดิบและกล้วยสุกพันธุ์ Musa sp. ที่ความสุกระดับเดียวกัน ที่วิเคราะห์ได้จากแหล่งข้อมูลต่าง ๆ

แหล่งข้อมูล	กล้วยดิบ		กล้วยสุก	
	แป้ง (%)	น้ำตาล (%)	แป้ง (%)	น้ำตาล (%)
Von Loesecke (1950)	20-25	0.8-2	1-2	17-20
Southgate (1976)	20.7	0.8	3.02	16.2
Kayisu, Hood and Vansoest (1981)	20.7	0.8	4	14.1

โดยทั่วไปแล้วปริมาณแป้งและน้ำตาลในกล้วยจะแตกต่างกันไปบ้างตามระดับความสุกและพันธุ์ของกล้วย จากตารางที่ 2.1 สรุปได้ว่า แป้งในกล้วยดิบมีประมาณร้อยละ 20-25 และพบว่าจะมีปริมาณลดลงเมื่อกล้วยสุก โดยจะเหลือประมาณร้อยละ 1-4 ในขณะที่น้ำตาลในกล้วยดิบซึ่งมีอยู่ร้อยละ 0.8-2 จะเพิ่มเป็นร้อยละ 14-20 ในกล้วยสุก

2.1.3 สารประกอบเพคติน (Pectic substances) เซลลูโลส (Cellulose) เฮมิเซลลูโลส (Hemicelluloses)

Kayisu, Hood และ Vansoest (1981) พบว่า กล้วยดิบมีปริมาณเซลลู-โลส สูงกว่าในกล้วยสุกเพียงเล็กน้อย กล่าวคือ ในกล้วยดิบมีเซลลูโลสร้อยละ 0.38 และในกล้วยสุกมีเซลลูโลสร้อยละ 0.28 ซึ่งค่าความแตกต่างนี้จะเห็นได้ชัดเมื่อวิเคราะห์ปริมาณเฮมิ-เซลลูโลส โดยกล้วยดิบมีเฮมิเซลลูโลสร้อยละ 1.61 เมื่อกล้วยสุกเฮมิเซลลูโลสจะลดลงเหลือร้อยละ 0.96 ซึ่งแนวโน้มดังกล่าวนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Barnell (1943) ซึ่งรายงานว่า ในเนื้อกล้วยดิบจะมีเฮมิเซลลูโลสอยู่ร้อยละ 8-10 และจะลดลงเหลือประมาณร้อยละ 1 เมื่อกล้วยสุก ส่วนเซลลูโลสในกล้วยดิบมีค่าค่อนข้างสม่ำเสมอประมาณร้อยละ 2-3 และจะลดลงน้อยมากเมื่อกล้วยสุก

เพคตินจะมีปริมาณมากขึ้นเมื่อกล้วยสุก ทั้งนี้เพคตินเป็นผลผลิตที่เกิดจากการย่อยสลายของโปรโตเพคติน (protopectin) ซึ่งไม่ละลายน้ำ มีผลให้โปรโตเพคตินซึ่งเดิมมีอยู่ร้อยละ 0.5 ลดลงเหลือร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก (Palmer, 1971) ปริมาณเพคตินในกล้วยสุกโดยทั่วไปจะมีประมาณ 0.7-1.1 (วิจิตร วังใน , 2530) ซึ่งการที่กล้วยมีเพคตินมากขึ้น ในขณะที่มีปริมาณโปรโตเพคตินลดลงนี้จะเป็นผลให้เนื้อเยื่อของกล้วยนิ่มและอ่อนตัวมากขึ้น

2.1.4 ความเป็นกรดด่าง (pH)

กล้วยดิบจะมี pH ประมาณ 5.5 และจะลดลงเหลือประมาณ 4.5 เมื่อกล้วยสุก (Von Loesecke, 1950)

2.1.5 สารประกอบฟีนอล (Phenolic compounds) และแทนนิน (Tannins)

มีการศึกษาเกี่ยวกับสารประกอบฟีนอลและแทนนินในกล้วยค่อนข้างน้อย อย่างไรก็ตามพอจะสรุปได้ว่า แทนนินในกล้วยประกอบด้วยสารที่สำคัญคือ leuco-anthocycanidin, leuco-delphanidine และ leuco-cyanide ในกล้วยดิบจะมีพอลีฟีนอลและแทนนินอยู่ในปริมาณสูง ซึ่งแทนนินนี้จะเป็นตัวทำให้เกิดรสฝาด ส่วนสารประกอบพวกพอลีฟีนอลจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการเกิดเป็นสีน้ำตาลในกล้วย นอกจากนี้พบว่า พอลีฟีนอลมีบทบาทในการยับยั้ง

การทำงานของเอนไซม์กลุ่มเพคติเนสด้วย (Gous และคณะ, 1987) ซึ่งทั้งสารประกอบฟีนอลและแทนนินนี้ จะมีปริมาณลดลงเมื่อกล้วยสุก

2.1.6 โปรตีน

ในกล้วยสุกจะมีปริมาณโปรตีนอยู่ร้อยละ 0.5-1.5 โดยน้ำหนัก และจะมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนในระหว่างการสุกน้อยมาก กรดอะมิโนที่สำคัญที่พบในกล้วยได้แก่ กลูตามีน แอสปาราจีน ฮีสติดีน เซรีน อาร์จินิน และ ลูซีน (Palmer, 1971)

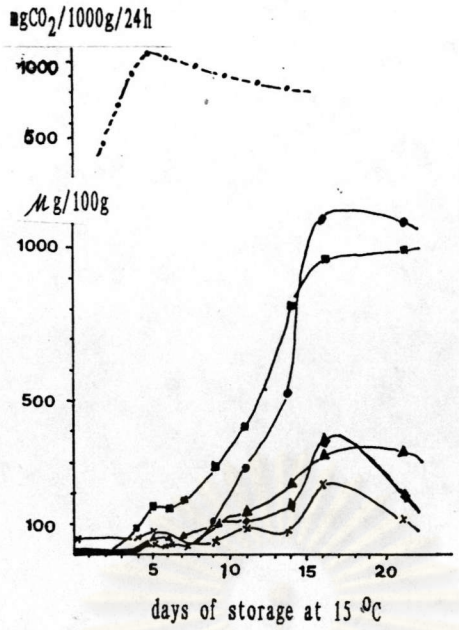
2.1.7 ไขมัน

ปริมาณไขมันในกล้วยสุกมีอยู่ประมาณร้อยละ 0.2-0.5 กรดไขมันที่พบส่วนใหญ่ในกล้วยสุกได้แก่ กรดพาลมิติก (palmitic acid) กรดโอเลอิก (oleic acid) และ กรดลิโนเลอิก (linoleic acid) เป็นต้น ในระหว่างกระบวนการสุก อัตราส่วนของกรดไขมันในเปลือกจะเพิ่มขึ้นและอัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเนื้อกล้วยจะลดลง โดยเฉพาะกรดพาลมิติก (Palmer, 1971)

2.1.8 การเกิดกลิ่น

องค์ประกอบของกลิ่นของกล้วยไม่ได้ถูกสร้างขึ้นในระหว่างการเจริญ หรือมีอยู่ในระหว่างการเก็บเกี่ยว แต่กลิ่นเหล่านี้ถูกสร้างขึ้นในช่วงการสุกสั้น ๆ สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงในกล้วยหลังการเก็บเกี่ยวในลักษณะที่เกิดคู่กับการเพิ่มอัตราหายใจจนถึงการหายใจสูงสุด (climacteric rise)

Tressel และ Jennings (1972) พบว่า กล้วยมีองค์ประกอบของกลิ่นส่วนใหญ่เป็นอะซิเตต เอสเทอร์ (acetate ester) และบิวทีเรต เอสเทอร์ (butyrate ester) ซึ่ง Tressel และ Drawert (1973) พบว่า เอสเทอร์ที่เป็นสารให้กลิ่นกล้วยเหล่านี้ถูกสร้างขึ้นในช่วงโพสไคลเมคเทอริก ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 การพัฒนาของสารให้กลิ่นในกล้วยพันธุ์ Gros Michel ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส โดยอัตราการหายใจสูงสุดเกิดภายหลังการเก็บ 5 วัน (Tressl และ Drawert, 1973)

(–●–●–) อัตราการหายใจ

(–●–●–) 3-Methylbutyl acetate

(–■–■–) n-Hexyl acetate

(–♦–♦–) Pentanol-2-acetate

(–▲–▲–) n-Butyl alcohol

(–x–x–) 3-Methyl-1-butanol

อย่างไรก็ตาม McCarthy และคณะ (1963) รายงานถึงความแตกต่างของกลิ่นในกล้วยที่มีความสุกระดับต่าง ๆ กัน โดยวิธีทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่า สารที่ให้กลิ่นเหมือนกลิ่นกล้วย (banana-like) ประกอบด้วย isoamyl acetate, amyl acetate, amyl propionate และ amyl butyrate และสารที่ให้กลิ่นกล้วยแบบกลิ่นผลไม้ (fruity) ประกอบด้วย butyl acetate, butyl butyrate, hexyl acetate และ amyl butyrate และสารที่ให้กลิ่นของกล้วยดิบ ซึ่งมีลักษณะของกลิ่นไม้ (woody) หรือ กลิ่นของพืช--สีเขียว (green) หรือกลิ่นดิน (musty) และกลิ่นเหล่านี้ประกอบด้วย methyl acetate, pentanone, butyl alcohol, amyl alcohol และ hexyl alcohol

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาและวิเคราะห์กลิ่นของกล้วยจากพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า ผลกล้วยประกอบด้วยองค์ประกอบของสารที่ระเหยง่ายอย่างน้อย 200 ชนิด และปริมาณองค์ประกอบเหล่านี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ องค์ประกอบของกลิ่น (aroma) ของกล้วยสุกพันธุ์ Gros Michel พบว่าประกอบด้วยสารระเหยง่ายได้แก่ amyl acetate, n-hexyl acetate, 1-butanol, isoamyl acetate, 2-butanol, isoamyl alcohol, n-butyl acetate, isoamyl butyrate, ethanol, isobutyl acetate, ethyl acetate, 2-pentanone, 1-hexanol, 2-pentyl acetate, trans-2-hexenal, 2-pentyl butyrate, 1-hexyl acetate และ 1-propanol เป็นต้น

2.1.9 <u>รงควัตถุ</u>

กล้วยดิบประกอบด้วยรงควัตถุต่าง ๆ เช่น คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) 50-100 ไมโครกรัมต่อกรัม แซนโธฟิลล์ (xanthophyll) 5-7 ไมโครกรัมต่อกรัม คาโรทีน (carotene) 1.5-3.5 ไมโครกรัมต่อกรัม เมื่อกล้วยสุก คลอโรฟิลล์จะหมดไป ในขณะที่แซนโธฟิลล์และคาโรทีนจะเหลืออยู่ในปริมาณที่คงที่เท่าเดิม (Palmer, 1971)

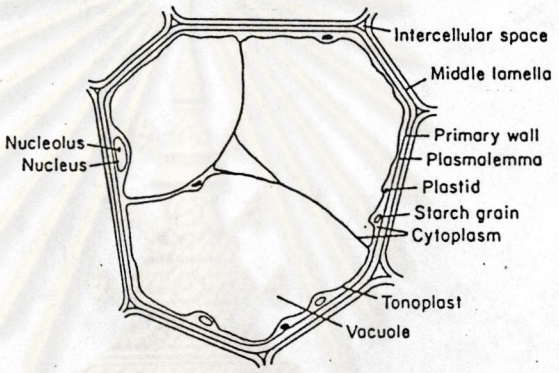
2.2 <u>องค์ประกอบทางเคมีของพอลีแซคคาไรด์ในเซลล์พืช</u>

ผลไม้มีพอลีแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบอยู่หลายชนิด เช่น แป้ง เซลลูโลส เฮมิ-เซลลูโลส สารประกอบเพคติน ทั้งนี้นอกจากแป้งแล้ว พอลีแซคคาไรด์อื่น ๆ จะมีบทบาทเป็นส่วนประกอบของโครงสร้างที่ให้ความแข็งแรงกับเนื้อเยื่อพืชรวมทั้งลิกนิน

2.2.1 <u>สารประกอบเพคติน</u> (Whitaker, 1984)

สารประกอบเพคตินพบอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อของพืชโดยเฉพาะส่วนของผล ซึ่งมักอยู่รวมกับเซลลูโลสบริเวณผนังเซลล์ส่วนนอก หรือบริเวณเนื้อเยื่อชั้นกลาง (middle lamella) ดังรูปที่ 2.5 สารประกอบเพคตินในผลไม้ดิบจะอยู่ในรูปโปรโตเพคตินซึ่งไม่ละลายน้ำ เมื่อผลไม้สุก จะมีโปรโตเพคติเนสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนโปรโตเพคตินไปเป็นสารประกอบเพคตินที่ละลายน้ำได้

สารประกอบเพคตินเป็นพอลีเมอร์ของน้ำตาลเชิงเดี่ยว 3 ชนิดคือ กรดกาแลคทูโรนิก (D-galacturonic acid), กาแลคโตส (D-galactose) และ อะราบิโนส (L-arabinose) ดังแสดงในรูปที่ 2.6 และมีชื่อเรียกต่าง ๆ กันดังนี้คือ



รูปที่ 2.5 ลักษณะทั่วไปของเซลล์พาเรนไคมาของเซลล์พืชในผักและผลไม้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(1) Rhamnogalacturonans

Main chain in pectins

-[→4)-α-D-Gal*p*A-(1-]$_n$→2)-L-Rha*p*-(1→4)-α-D-Gal*p*A-(1→2)-L-Rha*p*-(1-[→4)-α-D-Gal*p*A-(1-]$_n$-

Short side chains in pectins

β-D-Xyl*p*-(1→3)-
β-D-Gal*p*-(1→2)-D-Xyl*p*-(1-
α-L-Fuc*p*-(1→2)-D-Xyl*p*-(1-
L-Ara*f*-(1→3)-
D-Api*f*-(1→3)-D-Api*f*-(1-

Extended side chains in pectins

→4)-β-D-Gal*p*-(1→4)-β-D-Gal*p*-(1-

→5)-α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1-
3
↑
1
α-L-Ara*f*

(2) Arabinogalactans I

→4)-β-D-Gal*p*-(1→4)-β-D-Gal*p*-(1→4)-β-D-Gal*p*-(1→4)-β-D Gal*p*-(1-
3
↑
1
α-L-Ara*f*
5
↑
1
α-L-Ara*f*

(3) Arabinogalactans II

→3)-β-D-Gal*p*-(1→3)-β-D-Gal*p*-(1→3)-β-D-Gal*p*-(1→3)-β-D-Gal*p*-(1→3)-β-D-Gal*p*-(1-
6 6 6 6
↑ ↑ ↑ ↑
1 R 1 1
R→3)-β-D-Gal*p* β-D-Gal*p* β-D-Gal*p*
6 6 6
↑ ↑ ↑
1 1 1
β-D-Gal*p* β-D-Gal*p* β-D-Gal*p*

where R = L-Ara*f*-(1- or β-L-Ara*p*-(1→3)-L-Ara*f*-(1-

(4) Arabinans

→5)-α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1-
3 3 3
↑ ↑ ↑
1 1 1
α-L-Ara*f* α-L-Ara*f* α-L-Ara*f*

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.6 โครงสร้างปฐมภูมิของสารประกอบเพคติน

(1) แรมโนกาแลคทูโรแนน (2) อะราบิโนกาแลคแทน I

(3) อะราบิโนกาแลคแทน II (4) อะราบิแนน

2.2.1.1 แรมโนกาแลคทูโรแนน (rhamogalacturonans) เป็นพอลีเมอร์ผสมระหว่างแรมโนส (rhamnose) และกรดกาแลคทูโรนิก โดยสายหลักของพอลิเมอร์ประกอบด้วย D-galacturonopyranose unit เชื่อมต่อกับคาร์บอนตำแหน่งที่สองของแรมโนสด้วยพันธะ α-1,4 และมีสายข้างเคียง (side chains) ที่มีขนาดสายและองค์ประกอบต่าง ๆ กัน ทั้งนี้สายข้างเคียงมักจะเป็นพอลีเมอร์ของ D-galacturonic unit หรือของ L-arabinose unit ล้วน ๆ แรมโนกาแลคทูโรแนนมีประจุลบที่ pH ≥ 5 กล่าวคือ หมู่คาร์บอกซิลตำแหน่งที่ 6 ของ D-galacturonic acid units ประมาณร้อยละ 75 ของสายพอลีเมอร์เปลี่ยนเป็นเอสเธอร์ด้วยเมธิลแอลกอฮอล์ ดังรูปที่ 2.6 (1)

2.2.1.2 อะราบิโนกาแลคแทน (arabinogalactans) เป็นพอลีเมอร์ผสมของอะราบิโนสและกาแลคโตส แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

2.2.1.2.1 อะราบิโนกาแลคแทน I (arabinogalactans I) สายหลักของพอลีเมอร์ประกอบด้วย D-galactose unit จับกันด้วยพันธะ β-1,4 มีสายข้างเคียงคือ D-galactose จับกับ L-arabinose ด้วยพันธะ α-1,5 ซึ่งเชื่อมต่อกับสายหลักด้วยพันธะ α-1,3 ดังรูปที่ 2.6 (2)

2.2.1.2.2 อะราบิโนกาแลคแทน II (arabiongalactans II) สายหลักของพอลีเมอร์ประกอบด้วย D-galacturonic unit ที่จับกันด้วยพันธะ β-1,3 มีสายข้างเคียงประกอบด้วยสายของ D-galacturonic unit ที่จับกันด้วยพันธะ β-1,6 และจับกับสายหลักของพอลีเมอร์ด้วยพันธะ β-1,6 ด้วย ส่วนสายข้างเคียงบางสายจะประกอบด้วย L-arabinose unit จับกันด้วยพันธะ α-1,3 หรือพันธะ β-1,3 และจับกับสายหลักด้วยพันธะ α-1,6 ดังรูปที่ 2.6 (3) อะราบิโนกาแลคแทนเป็นพอลีแซคคาไรด์ที่มีสมบัติเป็นกลาง

2.2.1.3 อะราบิแนน (arabinans) เป็นพอลีเมอร์ของอะราบิโนส โดยมีสายหลักประกอบด้วย L-arabinose unit ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,5 และสายข้างเคียงเป็นสายเดี่ยวของอะราบิโนสที่เชื่อมต่อกับสายหลักด้วยพันธะ α-1,3 ดังรูปที่ 2.6 (4) อะราบิ-
-แนน เป็นพอลีแซคคาไรด์ที่มีสมบัติเป็นกลาง

2.2.1.4 กาแลคแทน (galactans) ซึ่งสายหลักของพอลีเมอร์ประกอบด้วย D-galactose unit จับกันด้วยพันธะ β-1,4

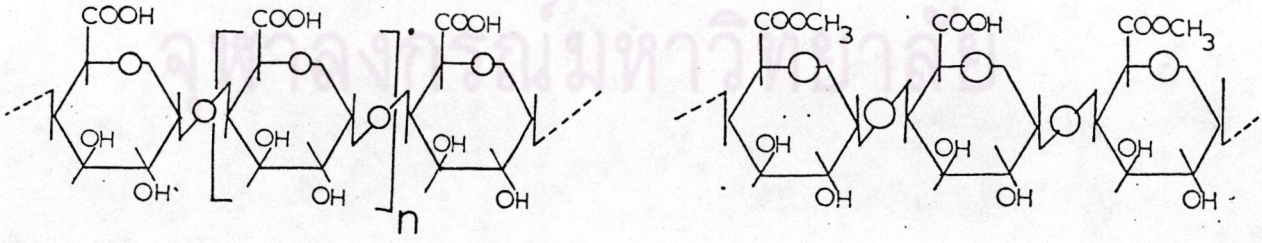
2.2.1.5 กาแลคทูโรแนน (galacturonans) เป็นพอลีเมอร์ของ α-1,4 D-galacturonopyranose units ซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารประกอบต่าง ๆ ดังนี้

2.2.1.5.1 โปรโตเพคติน (protopectin) ในผลไม้ดิบ สารประกอบเพคตินมักอยู่ในรูปของโปรโตเพคติน ที่ละลายน้ำไม่ได้

2.2.1.5.2 เพคติน (pectin) เป็นเทอมทั่วไปสำหรับเรียกสารประกอบเพคติน ที่มีหมู่คาร์บอกซิลถูกทำให้เป็นกลางหรือถูกทำให้กลายเป็นเอสเธอร์ในปริมาณที่ต่าง ๆ กัน กล่าวคือถ้าหมู่คาร์บอกซิถูกทำให้เป็นเอสเธอร์ด้วยเมธานอล มากกว่าร้อยละ 50 ของหมู่คาร์บอกซิลทั้งหมด จะเรียกว่า high methoxyl pectin ถ้าน้อยกว่าร้อยละ 10 ของหมู่คาร์บอกซิลทั้งหมดจะเรียกว่า กรดเพคตินิค และ ถ้าอยู่ระหว่างร้อยละ 10-50 จะเรียกว่า low methoxyl pectin

2.2.1.5.3 กรดเพตตินิค (pectinic acid) เป็นสารที่รวมหมายถึงเพคตินซึ่งมีหมู่เมธิลเอสเธอร์เล็กน้อย ดังรูปที่ 2.7 (2)

2.2.1.5.4 กรดเพคติก (pectic acid) เป็นพอลิเมอร์ของ anhydrogalacturonic acid units มีหมู่คาร์บอกซิลอิสระ ดังรูปที่ 2.7 (1)



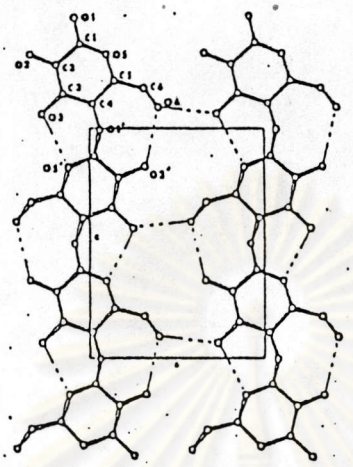
รูปที่ 2.7 (1) โครงสร้างของกรดเพคติก (2) โครงสร้างของกรดเพคตินิก

2.2.2 <u>เซลลูโลส</u> (Cowling และ Brown, 1969)

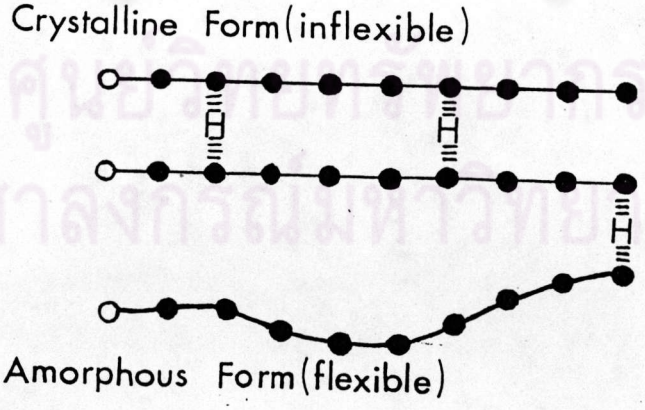
เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่ให้ความแข็งแรงแก่ผนังเซลล์ของพืชโดยโมเลกุลของเซลลูโลสประกอบด้วยหน่วยเล็กที่สุดคือ β-D-glucopyranose residues ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิล β-1,4 โมเลกุลของเซลลูโลสขนาดยาวตั้งแต่ น้อยกว่า 15 หน่วยต่อโมเลกุลในเซลลูโลส (gamma-cellulose) จนถึง 10,000-14,000 หน่วยต่อโมเลกุลในเซลลูโลส (alpha-cellulose) ความยาวของเซลลูโลสวัดโดยใช้ค่า degree of polymerization (DP) โมเลกุลของเซลลูโลสที่อยู่ติดกันจะเชื่อมต่อกับสายข้างเคียงได้ด้วยพันธะไฮโดรเจน ดังแสดงในรูปที่ 2.8 เรียกกลุ่มของโมเลกุลเซลลูโลสนี้ว่า elementary fibril การเชื่อมต่อกันของสายโมเลกุลเซลลูโลสจะมีค่า degree of parallelism ต่างกัน ทำให้เกิดบริเวณ crystalline ซึ่งโมเลกุลของเซลลูโลสจะเรียงตัวอย่างมีระเบียบขนานกันไป และเกิดบริเวณ amorphous หรือ paracrystalline ซึ่งโมเลกุลจะเรียงตัวอย่างมีระเบียบน้อยกว่า ดังแสดงในรูปที่ 2.9 กลุ่มของ elementary fibril จำนวนหนึ่งเมื่อเกิดการรวมตัวกันจะเรียกว่า microfibril ซึ่งเมื่อ microfibril เชื่อมต่อกับสายข้างเคียงจะเรียกว่า macrofibril โดยลิกนินจะช่วยห่อหุ้มให้ microfibril รวมกันเป็นกลุ่มได้ในผนังเซลล์โดยที่ เฮมิเซลลูโลส และสารอื่น ๆ ยังคงอยู่ภายในช่องว่างระหว่าง microfibrial แต่ละกลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 2.10 ดังนั้นเซลลูโลสในธรรมชาติจะมีระบบป้องกันการย่อยสลายจากเอนไซม์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

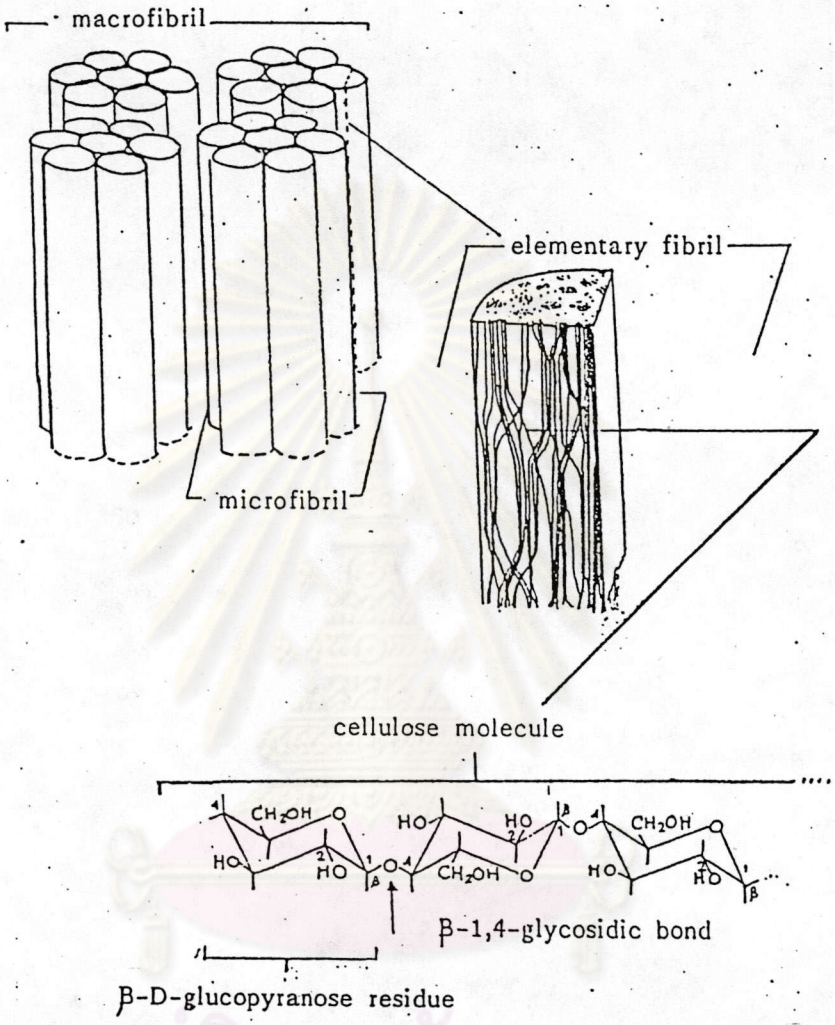
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.8 พันธะไฮโดรเจนในเซลลูโลส โดยกลูโคสแต่ละหน่วยจะเกิดพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลของเซลลูโลส 2 พันธะคือ 03–H 05′ และ 06–H 02′ และ พันธะไฮโดรเจนระหว่างสายเซลลูโลสโมเลกุลคือ 06–H 03′



รูปที่ 2.9 แผนภาพจำลองบริเวณ crystalline และ amorphous ในโมเลกุลของเซลลูโลส (Boyce, 1986)

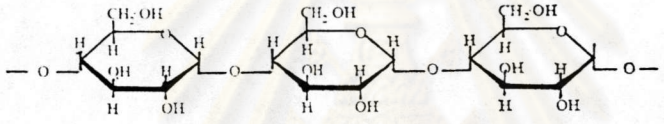


รูปที่ 2.10 ลำดับการรวมกลุ่มและโครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช

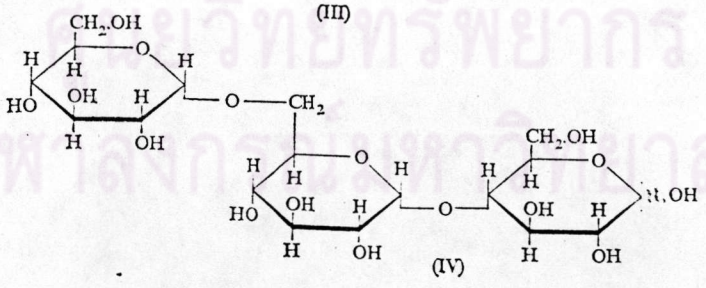
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.3 <u>แป้ง</u> (Aspinall, 1970)

แป้งประกอบด้วยอะมัยโลส (amylose) และอะมัยโลเพคติน (amylopectin) โดยอัตราส่วนของอะมัยโลสต่ออะมัยโลเพคตินจะแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด อะมัยโลสเป็นพอลี--เมอร์สายตรงของกลูโคส ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิล α-1,4 ดังแสดงในรูปที่ 2.11 ส่วนอะมัยโลเพคตินประกอบด้วยสายหลักของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคสซิล α-1,4 และมีสายข้างเดียงเป็นพอลีเมอร์ของกลูโคส ที่เชื่อมต่อกับสายหลักด้วยพันธะกลูโคซิล α-1,6 ดังแสดงในรูปที่ 2.12 ซึ่งลักษณะความแตกต่างของอะมัยโลสและ อะมัยโลเพคตินพอสรุปได้ดังตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.11 โครงสร้างของโมเลกุลอะมัยโลส



รูปที่ 2.12 โครงสร้างของโมเลกุลอะมัยโลเพคติน

ตารางที่ 2.2 ลักษณะของอะมัยโลส และอะมัยโลเพคติน (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2533)

ลักษณะ	อะมัยโลส	อะมัยโลเพคติน
โครงสร้างทั่วไป	เป็นสายตรงแต่อาจไม่ตลอดทั้งสาย แต่ช่วงที่เป็นสายตรงยาวมาก จึงไม่ค่อยพบส่วนที่เป็นสาขามากนัก	สายสาขา
ความยาวของสายตรงโดยเฉลี่ย (คิดเป็นจำนวนกลูโคส)	10^3	25-30
อัตราการพอลีเมอร์ไรเซชันของกลูโคส	10^3	10^4-10^5
การเกิดสีกับ I_2	สีน้ำเงินเข้ม	สีม่วงถึงน้ำตาล
% การเปลี่ยนเป็นมอลโตส (เฉพาะ β-amylase)	70-80%	50-60%

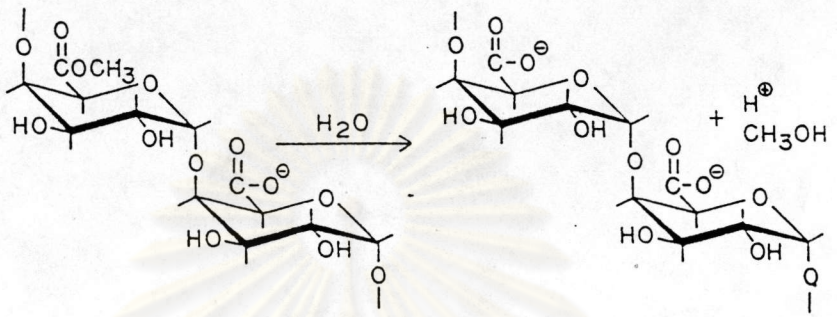
2.3 เอนไซม์ย่อยสลายพอลีแซคคาไรด์

2.3.1 เพคติเนส (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

เพคติเนสพบทั่วไปในพืชชั้นสูง ที่มีสารประเภทเพคตินเป็นองค์ประกอบ แต่อยู่คนละชั้นของเซล เมื่อเซลพืชฉีกขาดหรือได้รับความกระทบกระเทือน เอนไซม์และเพคตินจะเคลื่อนเข้าใกล้กัน ทำให้เกิดการย่อยสลาย มีผลให้ลักษณะความคงตัวของเนื้อสัมผัสของผักผลไม้เสียไป ผักผลไม้จึงนิ่มลง แบ่งชนิดของเพคติเนสเป็น 3 ชนิดคือ

2.3.1.1 เพคตินเอสเธอเรส (Pectinesterase)

ลักษณะของปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 ปฏิกิริยาการย่อยสลายของเพคตินเอสเธอเรส

ตามปฏิกิริยาที่ 2.13 เอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาการแยกหมู่เมธิลจากสารประเภทเพคตินที่มีการเติมหมู่เมธิลที่หมู่คาร์บอกซิล ทั้งนี้ไม่ย่อยสลายพันธะไกลโคซิล และยังคงจัดอยู่ในกลุ่มย่อยของไฮโดรเลสที่ย่อยสลายพันธะเอสเธอร์เหมือนเช่นลิปิด ดังนั้นชื่อสามัญจึงเป็นไปได้หลายชื่อ ล้วนแต่มีความสัมพันธ์กับลักษณะปฏิกิริยาทั้งสิ้น คือ pectolipase, pectin methylesterase, pectin demethoxylase, pectin methoxylase และ pectase (EC 3.1.1.11)

ปฏิกิริยาของเพคตินเอสเธอเรส มีลักษณะสำคัญที่น่าสังเกตได้ดังนี้

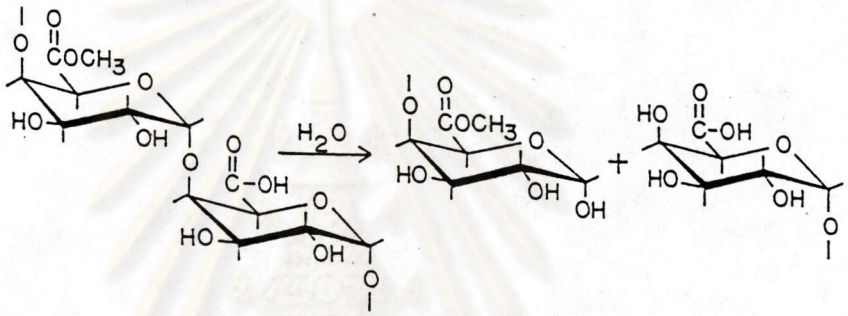
(1) มีความจำเพาะต่อพันธะเอสเธอร์ ที่อยู่สลับที่กับหมู่คาร์บอกซิลของ anhydrogalacturonic unit

(2) มีความจำเพาะต่อส่วนของเอสเธอร์ที่มาจากอัลกอฮอล์ที่เป็นเมธานอล ยกเว้น เอธานอล จะให้ความเร็วปฏิกิริยาลดลงเหลือร้อยละ 3-13 สำหรับไกลคอล กลีเซอรอล และ บิวทานอล เอนไซม์ไม่สามารถไฮโดรไลซ์เอสเธอร์ที่มาจากกลุ่มสารเหล่านี้ได้

(3) ผลผลิตจากปฏิกิริยาได้กรดเพคติก กรดเพคตินิค และเมธานอล ดังนั้นการติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์จึงใช้วิธีวัดปริมาณสารดังกล่าวนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมธานอล

2.3.1.2 พอลีกาแลคทูโรเนส (Polygalacturonase)

ลักษณะปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 ปฏิกิริยาการย่อยสลายของพอลีกาแลคทูโรเนส

เอนไซม์นี้มีชื่อตามระบบว่า poly α-1,4 galacturonide glyconohydrolase, EC 3.2.1.16 ทำหน้าที่ไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคซิลในสารประเภทเพคติน และมีชื่อสามัญว่า polygalacturonases แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย ตามชนิดสับสเตรท คือ polymethy galacturonase (ชื่อเดียวกับชื่อกลุ่ม) และแบ่งย่อยลงไปตามลักษณะการย่อยสลาย คือ endo-splitting และ exo-splitting ดังนั้นการแบ่งกลุ่มย่อยเป็นดังนี้

2.3.1.2.1 Random mechanism of hydrolysis

(1) Endo-polymethylgalacturonases

จะไฮโดรไลซ์สับสเตรทที่เป็นเพคตินได้ดีกว่ากรดเพคติค และมีลักษณะการย่อยแบบไม่เป็นระเบียบ (endo splitting) ในสายพอลิเมอร์

(2) Endo-polygalacturonases

จะไฮโดรไลซ์สับสเตรทที่เป็นกรดเพคติดได้ดีกว่าเพคตินและมีลักษณะการย่อยแบบไม่เป็นระเบียบในสายพอลีเมอร์

2.3.1.2.2 Terminal mechanism of hydrolysis

(1) Exo-polymethylgalacturonases

จะไฮโดรไลซ์สับสเตรทที่เป็นเพคตินได้ดีกว่ากรดเพคติดและมีลักษณะการย่อยแบบเป็นระเบียบจากปลายสายพอลีเมอร์ (exo-splitting)

(2) Exo-polygalacutronases

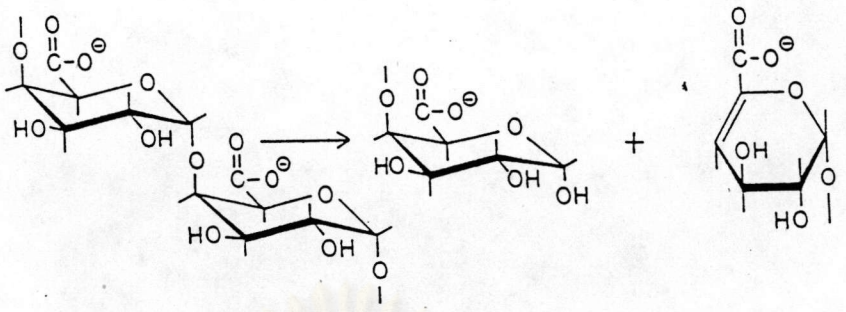
จะไฮโดรไลซ์สับสเตรทที่เป็นกรดเพคติดได้ดีกว่าเพคตินและมีลักษณะการย่อยสลายแบบเป็นระเบียบจากปลายสายพอลีเมอร์

จากการเปรียบเทียบค่าความหนืดที่ลดลง กับ อัตราการเกิดหมู่รีดิวซ์โดยเอนไซม์พวก endo- และ exo-splitting พบว่า endo-splitting สามารถลดความหนืดได้ร้อยละ 50 เมื่อไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคซิลร้อยละ 3-5 ขณะที่ exo-splitting จะไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคซิลร้อยละ 10-15 และความหนืดของสับสเตรทลดลงร้อยละ 50 เท่ากัน

ข้อควรสังเกตมีดังนี้ คือ ต้องไม่มีเพคเตท ไลเอส ปนอยู่กับพอลีกาแลคทูโรเนส เนื่องจากใช้สับสเตรทเดียวกัน และมีปฏิกิริยาการย่อยสลายที่พันธะไกลโคซิลเช่นเดียวกัน แต่กลไกต่างกัน

2.3.1.3 เพคเตท ไลเอส (Pectate lyases)

เป็นเพคติเนสที่อยู่ในกลุ่มไลเอส มีลักษณะปฏิกิริยาของการย่อยสลายพันธะไกลโคซิลในเพคติน หรือ กรดเพคติด แล้วได้สารพอลีเมอร์สายสั้นที่สายหนึ่งมีปลายรีดิวซ์ และอีกสายพอลีเมอร์มีพันธะคู่ ปฏิกิริยาดังรูปที่ 2.15



รูปที่ 2.15 ปฏิกิริยาการย่อยสลายของเพคเตท ไลเอส

เพคเตท ไลเอส มีชื่อสามัญว่า pectate lyases และมีชื่อตามระบบว่า poly-α-1,4-D-galacturonide lyase (EC 4.2.99.3) ไม่ควรเรียกชื่อว่า trans-eliminase แม้ว่าปฏิกิริยาจะอยู่ในลักษณะการ trans elimination ของ H^+ จาก C(4) และ C(5) ของส่วน aglycone ของสับสเตรท แล้วได้เพคตินที่มีพันธะคู่ที่ปลายเอนไซม์นี้มี Ca^{++} เป็นตัวกระตุ้น การแบ่งกลุ่มของเพคเตท ไลเอส จะใช้หลักเกณฑ์เดียวกับพอลีกาแลคทูโรเนส คือตามชนิดของสับสเตรทและลักษณะการตัดสายพอลีเมอร์ ดังนี้

2.3.1.3.1 Random mechanism of trans-eliminative degradation

(1) Endo-pectin methyl-trans-eliminase (Endo-PMTE) สับสเตรทเป็น เพคติน และการย่อยสลายแบบ endo-splitting

(2) Endo-polygalacturonate-trans-eliminase (Endo-PGTE) สับสเตรทเป็นกรดเพคติค และการย่อยสลายแบบ endo-splitting

2.3.1.3.2 Terminal mechanism of trans-eliminative degradation

(1) Exo-pectin methyl-trans-eliminase (Exo-PMTE) สับสเตรทเป็นเพคติน และการย่อยสลายแบบ exo-splitting

(2) Exo-polygalacturonate-trans-eliminase (Exo-PGTE) สับสเตรทเป็นกรดเพคติค และการย่อยสลายแบบ exo-splitting

เนื่องจากผลิตผลของการย่อยสลายคล้ายกับกรณีของพอลีกาแลคทู--โรเนส ฉะนั้นพอจะแยกความแตกต่างได้ดังนี้ คือ ถ้ามีเฉพาะเพคเตท ไลเอส จะพบว่าในผลผลิตของการย่อยสลายจะมีจำนวนหมู่รีดิวซ์เท่ากับจำนวนสารพันธะคู่พอดี หรือถ้ามีเอนไซม์ 2 ชนิด (พอลีกาแลคทูโรเนส และ เพคเตท ไลเอส) ทั้งในภาวะบริสุทธิ์บางส่วนจะพบว่ามีจำนวนหมู่รีดิวซ์ที่เกิดจะมากกว่า จำนวนพันธะคู่

2.3.2 <u>เซลลูเลส</u> (Cowling และ Brown, 1969)

เซลลูเลสเป็นระบบของเอนไซม์หลายชนิด (multicomponent enzyme system) โดยพบว่าเซลลูเลสประกอบด้วยเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด และสามารถจำแนกเซลลูเลส เป็นส่วนประกอบย่อย ๆ ได้ดังต่อไปนี้

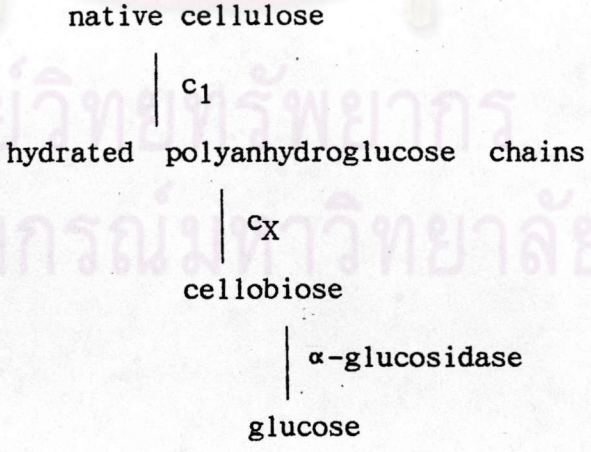
2.3.2.1 ส่วนประกอบ C_1 (C_1 component) ตามสมมติฐานของ Reese และ คณะ (1950) พบว่า ส่วนประกอบ C_1 มีส่วนช่วยกระตุ้นหรือแยกสายของเซลลูโลสเพื่อเตรียมสภาพให้เหมาะสำหรับการเข้าทำงานของเอนไซม์อื่น ๆ ต่อไป นอกจากนี้ยังพบอีกว่าส่วนประกอบ C_1 นี้ จำเป็นอย่างยิ่งในกรณีที่มีการใช้สารตั้งต้นที่มีความซับซ้อนมาก ๆ

2.3.2.2 β-1,4 Glucanases หรือ เอนไซม์ C_x มีความสามารถในการย่อยสลายอนุพันธ์ของเซลลูโลสที่สามารถละลายได้ (soluble derivatives) แต่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์นี้ไม่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นที่มีความซับซ้อนมาก ๆ ได้ การตรวจสอบแอคติ--วิตีของเอนไซม์นี้ทำได้โดยใช้ carboxymethyl cellulose (CMC) หรือ hydroxyethyl cellulose เป็นสารตั้งต้น และวัดค่าความหนืดที่ลดลง หรือวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปล่อย

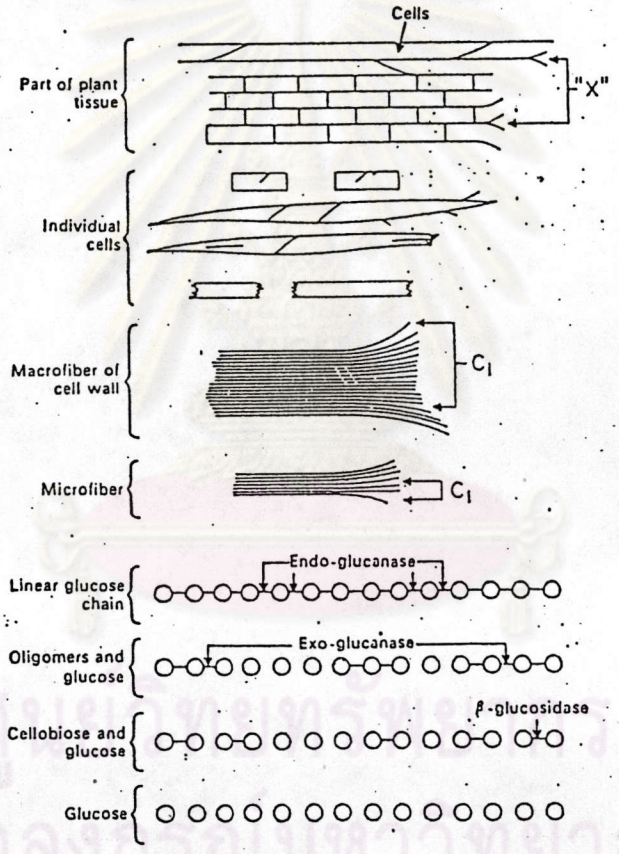
ออกมาจากปฏิกิริยาการย่อยสลาย โดยทั่วไป β-1,4 glucanases ประกอบด้วย endo-β-1,4 glucanases ซึ่งทำหน้าที่ตัดสายเซลลูโลสแบบสุ่มเป็น oligomers และได้กลูโคสบางส่วน และ exo-β-1,4 glucanases โดยทำหน้าที่ตัดสาย oligomers จากปลายสายเข้ามาทำให้ได้เซลโลบิโอส (cellobiose) และกลูโคส

2.3.2.3 β-Glucosidases ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลบิโอสและเซลโล--โอลิโกแซคคาไรด์ (cellooligasaccharides) สายสั้น ๆ ให้เป็นกลูโคส โดยสามารถย่อยสลายเซลโลบิโอสและเซลโลไทรโอส (cellotriose) ได้อย่างรวดเร็ว และอัตราการย่อยสลายจะลดลงเมื่อ degree of polymerization เพิ่มขึ้น

สมมติฐานเกี่ยวกับการทำงานของเซลลูเลส คือ Reese และ คณะ (1950) ได้ตั้งสมมติฐานการทำงานของเซลลูเลส ดังแสดงในรูปที่ 2.16 ซึ่งคล้ายคลึงกับสมมติฐานของ Cowling (1958) ที่กล่าวว่า เอนไซม์ "x" ที่มักพบอยู่รวมกับเซลลูเลสจะเข้าทำงานในบริเวณ middle lamella ทำให้เซลล์ของพืชแยกจากลิกนินออกเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ และเกิดการแตกของผนังเซลล์ จากนั้นเซลลูเลสจึงจะเข้าทำงานต่อ ดังแสดงในรูปที่ 2.17



รูปที่ 2.16 การทำงานของเซลลูเลสตามสมมติฐานของ Reese และคณะ (1950)



รูปที่ 2.17 การทำงานของเซลลูเลสตามสมมติฐานของ Cowling (1958)

2.3.3 <u>อะมัยเลส</u> (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายสับสเตรทจำพวกแป้ง ไกลโคเจน แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ซึ่งผลผลิตของการย่อยสลายด้วยอะมัยเลสทั้งสามชนิดที่จะกล่าวต่อไปนี้ แสดงดังรูปที่ 2.18

2.3.3.1 อัลฟาอะมัยเลส (α-amylase)

มีชื่อสามัญว่า diastase และมีชื่อตามระบบว่า α-1,4-glucan 4-glucanohydrolase (EC 3.2.1.1) พบทั่วไปทั้งในอาณาจักรพืช และสัตว์ ตลอดทั้งในคน จะพบในส่วนของน้ำลาย ตับอ่อน ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายแป้ง เป็นโอลิโก- และ ไดแซคคาไรด์ ซึ่งจะถูกย่อยต่อในลำไส้เล็กก่อนที่จะซึมผ่านผนังลำไส้สู่ร่างกายเป็นเอนไซม์ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 50,000 มี Ca^{++} 1 ตัว ต่อเอนไซม์ 1 โมเลกุล จะถูกกระตุ้นด้วยฮาโลเจนอิออน เช่น Cl, Br, F มีค่า pK ของหมู่ที่แตกอิออนได้ในบริเวณเร่งอยู่ที่ 6.5-8.0 ซึ่งหมู่ที่ว่านี้อาจเป็นหมู่อิมิดาโซล หรือ หมู่อะมิโน แต่เมื่อพิจารณาจากค่า ΔH_{ion} เป็น 4 kcal/mole ดังนั้นน่าจะเป็นหมู่อิมิดาโซล ลักษณะที่สำคัญของเอนไซม์ในการย่อยสลายก็คือ เจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ α-1,4 ในลักษณะตัดภายในสายพอลิเมอร์อย่างอิสระ (endosplitting amylase) ได้ผลผลิตเป็นกลูแคน (glucan) และลิมิตเดกซ์ตริน (limit dextrin) ที่มีหน่วยกลูโคสประมาณ 2-6 หน่วย และยังคงมีโครงแบบ (configuration) เดิมคือ แบบอัลฟา

2.3.3.2 เบต้าอะมัยเลส (β-amylase)

มีชื่อเรียกตามระบบว่า α-1,4-glucan maltohydrolase, (EC 3.2.1.2) ซึ่งพบทั่วไปในพืชชั้นสูง เช่น ข้าวบาร์เลย์ในลักษณะกำลังงอกเป็นข้าวมอลท์, ข้าวสาลี, ข้าวไรย์, ถั่วเหลือง และมันเทศ และมักพบร่วมกับอัลฟาอะมัยเลส มีมวลโมเลกุล 152,000 (กรณีจากมันเทศ) ซึ่งโดยทั่วไปจะมีค่าสูงกว่าอัลฟาอะมัยเลส มี pH ที่เหมาะสมในการทำงาน ที่ 5.6 จากการพิจารณาจาก pH activity profile มีลักษณะแบบรูประฆังคว่ำที่มีหมู่ที่แตกอิออนได้ที่บริเวณเร่งอยู่ 2 หมู่ คือ ที่ pK_1 = 2.5-3.5 และ pK_2 = 8.0-8.5 นอกจากนี้มีสารพวกซัลไฟดริล (sulfhydryl reagents) เป็นตัวยับยั้ง หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือ

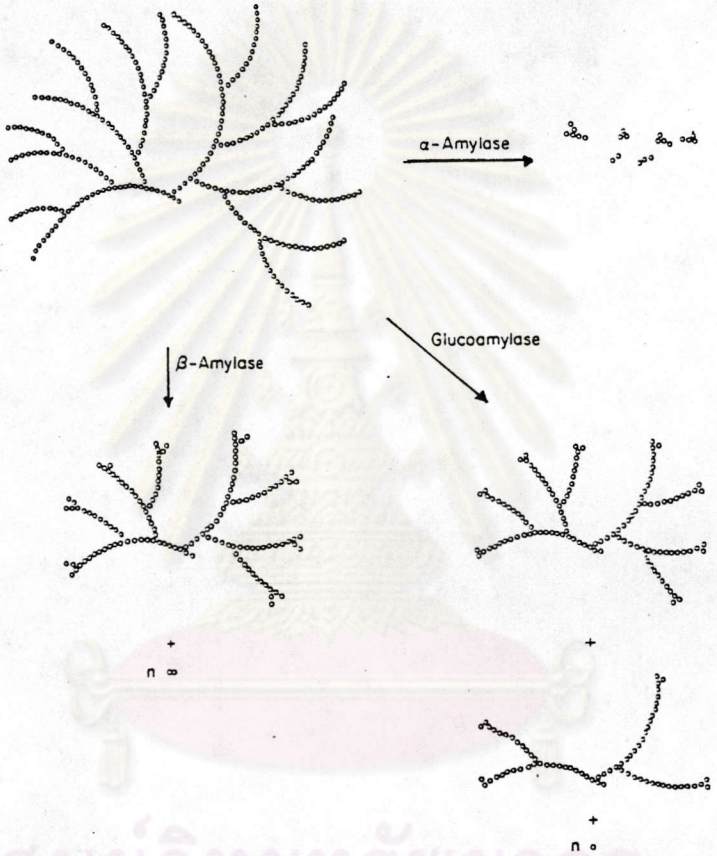
มีหมู่ซัลไฟดริลอยู่ในบริเวณเร่ง ปฏิกิริยาการย่อยสลายของเบต้าอะมัยเลสจะเจาะจงต่อพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ α-1,4 ในลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสายด้านไม่มีหมู่รีดิวซ์เข้าสู่ภายในสายไปทีละ 1 หน่วยของมอลโตส หรือ ทีละ 2 หน่วยของกลูโคส และจะหยุดปฏิกิริยาที่พันธะไกลโคซิลที่ α-1,6 ดังนั้นผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาย่อยสลายแป้งหรือไกลโคเจนจะเป็น กลูแคน ลิมิตเดกซ์ตริน และ ส่วนใหญ่เป็นมอลโตสที่มีโครงแบบที่ต่างไปจากเดิม คือ ได้ โครงแบบเบต้า (β-configuration)

2.3.3.3 แกมมาอะมัยเลส (γ-amylase)

มีชื่อเรียกตามระบบว่า α-1,4-glucan glucohydrolase, (EC 3.2.1.3) เป็นเอนไซม์ที่พบทั่วไปในจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา มี pH ที่เหมาะสมในการทำงาน ที่ pH 4.0-4.4 และมีหมู่ไวปฏิกิริยา 2 หมู่คือ ที่ pK_1 = 2.9 และ pK_2 = 5.90 รวมทั้งมี ΔH_1^o = 0, ΔH_2^o = -0.8 kcal/moles จากค่า pK และ ΔH^o ที่ปรากฏนี้คาดว่าน่าจะมีหมู่ไวปฏิกิริยาทั้ง 2 หมู่เป็นหมู่คาร์บอกซิลในลักษณะที่หมู่ที่ 1 เป็น COO^- (เกลือ) และหมู่ที่ 2 เป็น COOH (กรด)

ลักษณะที่สำคัญของปฏิกิริยาการย่อยสลายแป้ง ก็คือ สามารถย่อยสลายได้หลายพันธะ ไม่ว่าจะเป็นพันธะไกลโคซิลที่เป็น α-1,4, α-1,6 และ α-1,3 แต่ช้ากว่า α-1,4 การตัดสายพอลิเมอร์จะเหมือนกับเบต้าอะมัยเลส แต่ตัดปลายสายเข้าไปทีละ 1 หน่วยของกลูโคส ดังนั้นผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นกลูโคสที่มี โครงแบบต่างไปจากเดิม คือได้ โครงแบบเบต้า หรือ β-D-glucose และส่วนของกลูแคน และลิมิตเดกซ์ตริน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.18 ผลผลิตการย่อยสลายแป้งด้วยอะมัยเลสทั้ง 3 ชนิด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 การใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมแปรรูปน้ำผลไม้

เอนไซม์ชนิดแรกที่นำมาใช้กับอุตสาหกรรมน้ำผลไม้ คือ เพคติเนส โดยใช้สำหรับการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใส ซึ่งใช้ครั้งแรกเมื่อปี 1930 ในประเทศสหรัฐอเมริกา และ ในประเทศเยอรมัน ต่อมามีการพัฒนาการผลิตน้ำผลไม้ขึ้นทั้งด้านเทคโนโลยีการผลิต และการนำผลไม้ชนิดต่าง ๆ มาแปรรูปเป็นน้ำผลไม้มากขึ้น เนื่องจากผลไม้ต่าง ๆ มีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน ทำให้มีความยากง่ายในการสกัดต่างกัน ดังนั้นบทบาทของเพคติเนสจึงกลายเป็นสิ่งที่ต้องการมากขึ้น เช่นเดียวกับเอนไซม์อื่น ๆ เช่น อะมัยเลส และเซลลูเลส ก็กลายเป็นส่วนหนึ่งของเทคโนโลยีการผลิตน้ำผลไม้ในปัจจุบัน (Janda, 1983)

2.4.1 บทบาทของเอนไซม์ในอุตสาหกรรมแปรรูปน้ำผลไม้

2.4.1.1 เพคติเนส

เพคติเนสเป็นเอนไซม์ที่รู้จักกันดีที่สุดในอุตสาหกรรมน้ำผลไม้ เนื่องจากในผลไม้มีองค์ประกอบสำคัญที่ต้องคำนึงถึงในกระบวนการผลิต คือ สารประกอบเพคติน ซึ่งพบทั่วไปทั้งในผักและผลไม้ โดยพบในปริมาณร้อยละ 0.5-4 โดยน้ำหนัก เมื่อเนื้อเยื่อของผักหรือผลไม้ถูกทำลาย จะทำให้สารประกอบเพคตินบางส่วนละลายออกมาสู่ส่วนที่เป็นของเหลวทำให้น้ำผักหรือผลไม้นั้นมีความหนืดมากขึ้น นอกจากนี้ยังทำหน้าที่รักษาเสถียรภาพของระบบคอลลอยด์ในน้ำผลไม้โดยป้องกันการตกตะกอนหรือแยกชั้นของสารแขวนลอยต่าง ๆ เช่น โปรตีน เป็นต้น ทำให้น้ำผลไม้มีลักษณะขุ่น ซึ่งลักษณะปรากฏดังกล่าวเป็นลักษณะที่ต้องการในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้บางชนิด เช่น น้ำส้ม แต่ในขณะเดียวกันน้ำผลไม้บางชนิดต้องการลักษณะปรากฏที่ใส เช่น น้ำแอปเปิ้ล น้ำแอปปริคอต หรือ น้ำองุ่น เป็นต้น ซึ่งการผลิตผลิตภัณฑ์กลุ่มหลังนี้จำเป็นต้องแยกสารประกอบเพคตินออกไปให้หมด ทั้งนี้บทบาทของเพคติเนสจึงต่างไปจากกรณีน้ำผลไม้ขุ่น นอกจากนี้สำหรับสารประกอบเพคตินบางส่วนที่เหลืออยู่ในเนื้อเยื่อผลไม้ จะอยู่ในลักษณะที่จับกับเส้นใยของเซลลูโลส โดยเฉพาะสายข้างของเฮมิเซลลูโลสทำให้จับกับน้ำได้ดี เป็นผลให้ไม่สามารถสกัดน้ำผลไม้โดยวิธีทางกลออกมาได้ทั้งหมด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เพคติเนสเข้าช่วยเพื่อเปลี่ยนสารประกอบเพคตินบางส่วนหรือทั้งหมด ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (Janda, 1983)

I21709890

2.4.1.2 อะมัยเลส

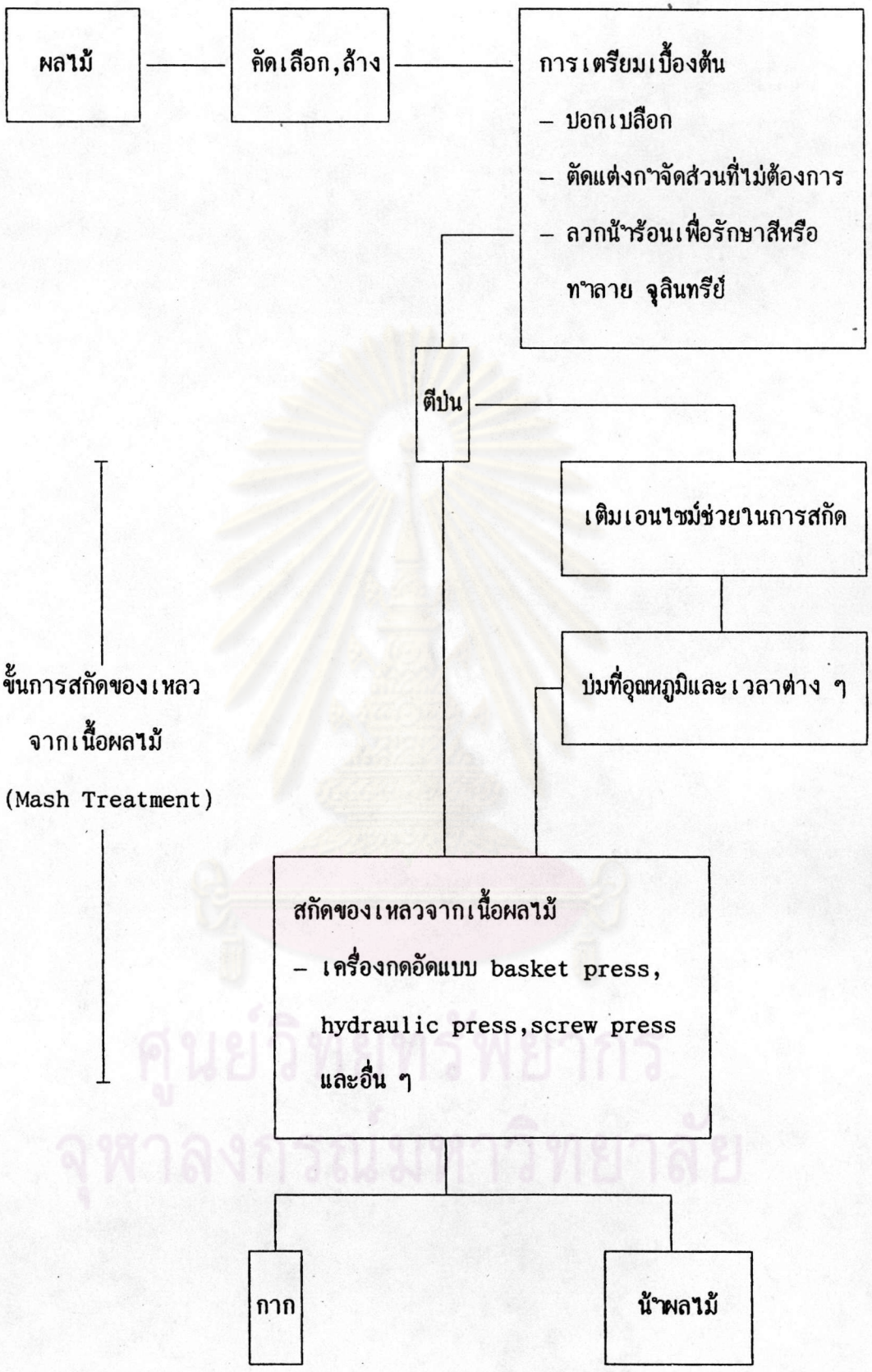
เนื่องจากปัจจุบัน อุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้ได้ขยายตัวมากขึ้น ทำให้ต้องมีผลไม้ที่เป็นวัตถุดิบสะสมไว้สำหรับการผลิตเป็นจำนวนมากให้เพียงพอต่อกระบวนการผลิต เป็นผลให้ต้องมีการเก็บรักษาในห้องเย็น ซึ่งโดยปกติจะเก็บเกี่ยวผลไม้ในขณะที่ผลไม้ยังไม่โตเต็มที่ เพื่อให้มีความมั่นใจในเรื่องความแน่นเนื้อ (firmness) และจะนำมาทำให้สุกภายใต้ภาวะที่มีการควบคุมบรรยากาศ (controlled atmosphere) ภายในห้องเย็น แต่เนื่องจากผลไม้เหล่านี้ยังไม่โตเต็มที่ ดังนั้นจะมีองค์ประกอบที่เป็นแป้งอยู่ในปริมาณสูง จะเกิดเป็นเจลเมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนในระหว่างการผลิตน้ำผลไม้ ทำให้เป็นปัญหาในระหว่างการกรอง หรืออาจเกิดการกลับมาขุ่นอีกครั้งในระหว่างการเก็บ การใช้อะมัยเลสโดยเฉพาะอะมัยโลกลู--โคซิเดส เป็นวิธีที่เข้ามาใช้แก้ปัญหาต่าง ๆ เหล่านี้ในระบบอุตสาหกรรม (Janda, 1983)

2.4.1.3 เซลลูเลส

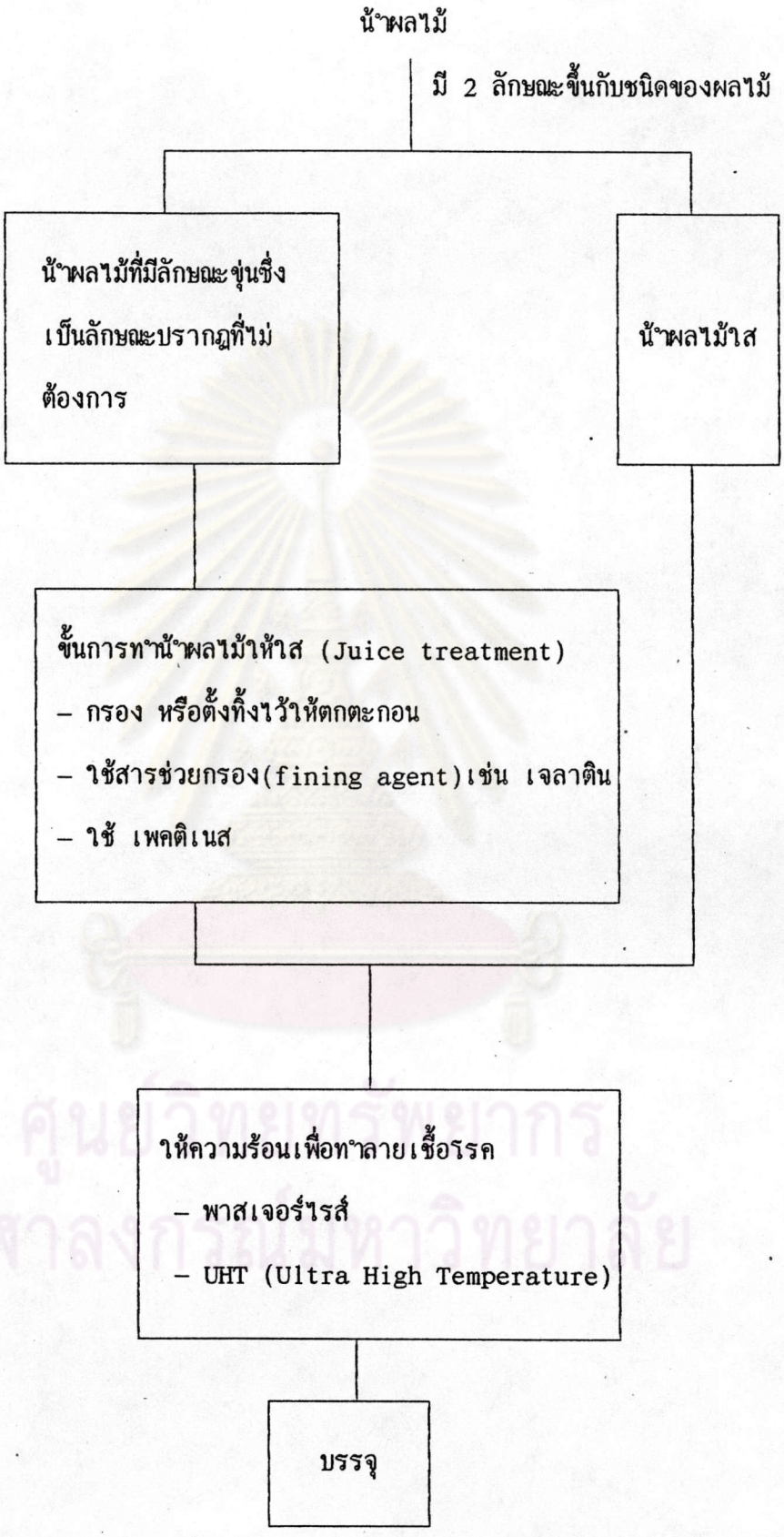
ในอุตสาหกรรมน้ำผลไม้ ไม่ว่าจะเป็นการใช้เซลลูเลสโดยตรง หรือ เป็นส่วนหนึ่งในเพคติเนสที่เตรียมได้ เซลลูเลสมีประโยชน์อย่างมากในการช่วยเร่งปฏิกิริยาการสกัดสีจากผลไม้หรือเร่งการทำให้เนื้อเยื่อของพืชเป็นของเหลว (Janda, 1983)

2.4.2 <u>ลักษณะของการใช้เอนไซม์ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้</u>

โดยทั่วไปการใช้เอนไซม์ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ทำได้ 2 ลักษณะ คือ เติมเอนไซม์ลงในเนื้อผลไม้บด (mash treatment) และบ่มไว้ก่อนที่จะนำมาสกัดน้ำ หรือเติมเอนไซม์ลงในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่สกัดได้ (juice treatment) เพื่อทำให้กรองได้ง่ายขึ้นและมีความใสมากขึ้น หรืออาจใช้ร่วมกันทั้งสองลักษณะ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของผลไม้ที่จะนำมาสกัดและลักษณะปรากฏสุดท้ายของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่ต้องการ ขั้นตอนการผลิตผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้และการใช้เอนไซม์ในการกระบวนการผลิตสรุปได้ดังแผนภูมิรูปที่ 2.19



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



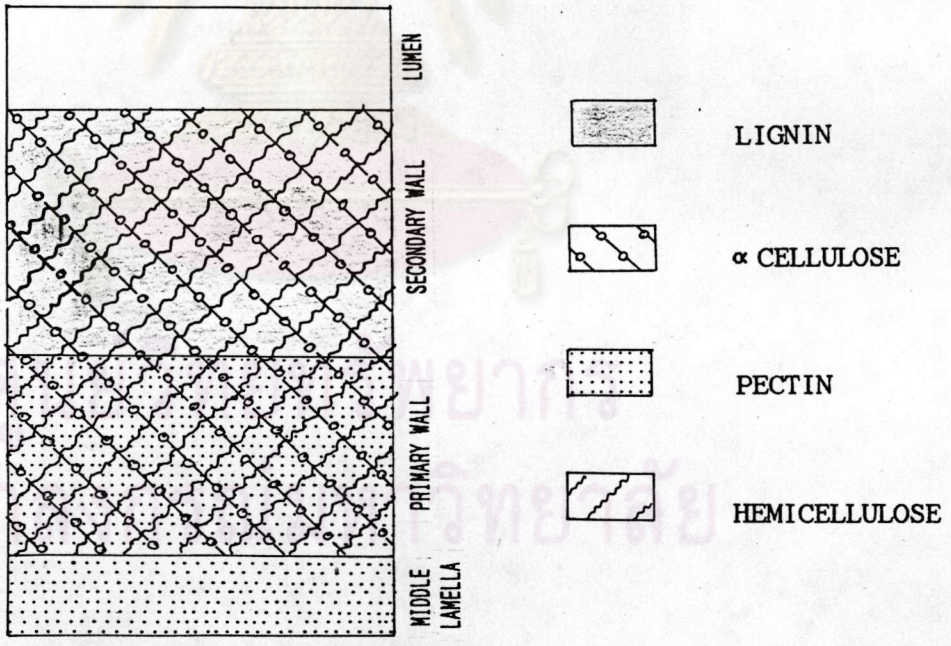
รูปที่ 2.19 ขั้นตอนทั่วไปของการผลิตน้ำผลไม้ที่มีลักษณะปรากฏใส

2.4.2.1 การสกัดของเหลวจากเนื้อผลไม้โดยเติมเอนไซม์ในเนื้อผลไม้บด (Mash tratment)

การเติมเอนไซม์ในเนื้อผลไม้บดจุดประสงค์เพื่อเพิ่มผลผลิตของน้ำผลไม้และทำให้การสกัดเป็นไปได้ง่ายขึ้น เช่นการประยุกต์ใช้เพคติเนสร่วมกับเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสในการผลิตเนคต้า (nectar) หรือ ผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้จากแอปเปิ้ล ผักต่าง ๆ และ โดยเฉพาะผลไม้ประเภทที่มีเนื้อมาก เช่น กล้วย มะม่วง หรือขนุน ซึ่งการสกัดด้วยวิธีเชิงกลไม่สามารถสกัดน้ำผลไม้ออกมาได้ หรือสกัดได้ในปริมาณต่ำ รายละเอียดของความเป็นไปได้ในเรื่องนี้ พอจะกล่าวโดยหลักการได้ดังนี้ คือ เนื้อผลไม้บด โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นน้ำผลไม้ (juice) ซึ่งเป็นส่วนของน้ำผลไม้ที่เป็นอิสระจากโครงสร้างของเซลล์ในระหว่างการบีบหรือคั้น ส่วนที่สองคือส่วนของชั้นกลาง (intermediary layer) ซึ่งเป็นชั้นที่มีลักษณะคล้ายเจลมีความหนืด ซึ่งเป็นผลมาจากโปรโตเพคตินที่มีเป็นจำนวนมากจะอุ้มน้ำไว้ภายใน ทำให้มีผลเสียในขณะที่มีการบีบหรือคั้นคือ น้ำส่วนที่อยู่ภายในโครงร่างตาข่ายของโปรโต--เพคติน (protopectinic network) จะไม่ถูกปลดปล่อยออกมาทำให้มีการสูญเสียปริมาณผลผลิตไป และส่วนสุดท้าย คือ ส่วนของของแข็ง (solid) ไม่ละลายน้ำ จะเป็นส่วนที่เป็นโครงสร้างแข็งของผลไม้ สารประกอบเหล่านี้ได้แก่ เซลลูโลส เส้นใย เป็นต้น รวมทั้งสารประกอบของกลิ่นรสต่าง ๆ

การใช้เอนไซม์จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงส่วนต่าง ๆ ของระบบดังนี้ คือ ส่วนของน้ำผลไม้ จะมีความหนืดลดลง กล่าวคือช่วงแรกที่โปรโตเพคตินเริ่มละลายความหนืดจะสูงขึ้น แต่เมื่อผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ ความหนืดสุดท้ายจะลดลง ในขณะที่ส่วนของชั้นกลาง คล้ายเจล ซึ่งเป็นชั้นที่มีโปรโตเพคติน จะอุ้มน้ำไว้ในโครงสร้าง ทำให้น้ำไม่ถูกปลดปล่อยออกมา การใช้เอนไซม์จะลดปริมาณของโปรโตเพคตินที่ไม่ละลาย ซึ่งจะไปมีส่วนในการทำลายโครงสร้างเจล และปลดปล่อยน้ำออกมา ในขณะเดียวกันจะเพิ่มสมบัติการซึมผ่านของของแข็ง สำหรับส่วนที่สามคือ ส่วนของของแข็ง หลังจากถูกย่อยสลายแล้ว จะปลดปล่อยองค์--ประกอบที่สำคัญ เช่น สารที่ให้กลิ่นรส ดังนั้นของเหลวที่ได้ออกมาจะมีทั้งกลิ่นและรสเดิมของผลไม้นั้น ซึ่งอาจจะมีมากพอที่จะใช้เป็นหัวน้ำเชื้อผลไม้ได้ (Novo, Enzyme Information)

ในส่วนบน สารประกอบเพคตินที่อยู่ในโครงสร้างของผนังเซลล์ผลไม้มักอยู่ในลักษณะที่จับกับเส้นใยของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส จากการวิจัยเกี่ยวกับเรื่องนี้ "ทฤษฎีที่เสนอโดย Albersheim และคณะ (1972) เริ่มเป็นสิ่งที่ถูกต้องและซับซ้อนมากขึ้น ซึ่งภายหลังได้รับการยืนยันโดย Albersheim (1975) Pfister (1977) และ Chesson (1980) โดยทฤษฎีนี้เสนอโครงสร้างทางเคมีของผนังเซลล์พืชว่า ประกอบด้วยสารประกอบเพคตินพวกแรม--โนกาแลคทูโรแนน และสารประกอบนี้มีพันธะกับไซโลกลูแคน (xyloglucan) มีอะราบิแนน หรือกาแลคแทน เป็นตัวกลาง หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ เกิดพันธะไฮโดรเจนกับเส้นใยเซลลูโลสมีกาแลคแทน เป็นตัวกลาง และอาจจะจับโปรตีนเป็นสารประกอบพวก ไกลโคโปรตีน" (อ้างถึงใน Baumann, 1981) ทั้งนี้เกี่ยวกับเรื่องนี้ Fogarth และ Ward (1972) ได้สรุปความเกี่ยว--โยงของสารประกอบเพคตินและสารประกอบอื่น ๆ ในผนังเซลล์พืชไว้ ในรูปแบบความสัมพันธ์อย่างง่ายดังรูปที่ 2.20



รูปที่ 2.20 ความเกี่ยวโยงของสารประกอบเพคติกและสารประกอบอื่น ๆ ในผนังเซลล์พืช (Fogarth และ Ward, 1972)

จากองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชและบทบาทของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพอลีแซคคาไรด์ในผนังเซลล์พืช นำไปสู่พัฒนาการใช้เอนไซม์ที่เหมาะสมตามธรรมชาติของเอนไซม์นั้น ๆ ซึ่งจุดประสงค์การใช้งานของเอนไซม์เหล่านี้ขึ้นกับลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและบทบาทของเอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังเซลล์พืชได้รวบรวมแสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 บทบาทของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพอลีแซคคาไรด์ในผนังเซลล์พืช (Voragen และคณะ, 1986)

จุดประสงค์ของการใช้เอนไซม์	**การเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์**	**เอนไซม์ที่มีบทบาท** (ชื่อย่อเหล่านี้มีรายละเอียดไว้ตอนต้น)
การทำให้เนื้อผลไม้มีความแน่นเนื้อลดลง (firming)	เกิดปฏิกิริยา Saponification ของเพคตินที่ผนังเซลล์	PE ($+Ca^{++}$)
การทำให้เนื้อผลไม้อ่อนตัว (softening)	สลายเพคตินที่ผนังเซลล์บางส่วน	PG,PL,PAL
การทำให้เนื้อผลไม้นิ่มหรือเปื่อยยุ่ย (maceration)	สลายเพคตินที่ middle lamella บางส่วน ทำให้เนื้อเยื่อที่อยู่รวมกันแยกออกเป็นเซลล์ที่กระจัดกระจาย	PG หรือ PL

(ต่อ)

(ต่อ)

จุดประสงค์ของการใช้เอนไซม์	การเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์	เอนไซม์ที่มีบทบาท (ชื่อย่อเหล่านี้มีรายละเอียดไว้ตอนต้น)
การทำลายเนื้อเยื่อเซลล์ (disintegration) ทำให้มีการปลดปล่อยน้ำผลไม้ และทำให้มีระบบคอลลอยด์ที่เสถียร	ทำให้เพคตินรวมถึงอะราบิแนนกาแลคแทน ที่ผนังเซลล์ละลายสู่ส่วนที่เป็นของเหลว	PG+PE และ/หรือ PL + hemicellulases (arabanases, galactanases)
การทำให้เป็นของเหลว (liquefaction)	ทำให้เกิดการละลายของพอลี-แซคคาไรด์ทั้งหมดของผนังเซลล์พืช	C+PE+PG และ/หรือ PL
การเกิดน้ำตาลเชิงเดี่ยว (saccharification)	สลายโมเลกุลของพอลีแซคคาไรด์ให้เป็นโมโนแซคคาไรด์	Hemicellulases Oligomerases Exo-carbohydrases Glycosidases

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้เอนไซม์ในการสกัดของเหลวจากผลไม้บด เพื่อวัตถุประสงค์ต่าง ๆ กันดังนี้

Sreenkantiah, Jaleel และ Ramanchandra Rao (1968) ศึกษาการสกัดน้ำฝรั่งโดยใช้ Enzyme Liquid Concentrate (ELC) พบว่า ภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคือ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เข้มข้นร้อยละ 0.5 อุณหภูมิในช่วง 30-40 องศา--เซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งสามารถสกัดได้น้ำฝรั่งร้อยละ 85 โดยน้ำหนัก

Sreenath, Nanjundaswamy และ Sreekantaih (1987) ศึกษาผลของเซลลูเลส และเพคติเนสที่ใช้ในทางการค้า ต่อการลดความหนืดของเนื้อมะม่วงบด พบว่า เซลลูเลสและเพคติเนส ที่มาจากแหล่งผลิตต่างกันจะแสดงแอคติวิตีต่างกัน โดยพบว่า Ultrazym 100 ที่ผลิตโดยบริษัท Novo Industri A/S ซึ่งมีเพคติเนสเป็นองค์ประกอบหลัก สามารถลดความหนืดของเนื้อมะม่วงได้เร็วที่สุด และลดได้มากกว่าร้อยละ 82 โดยใช้ที่ความ--เข้มข้นของเอนไซม์ 0.05 กรัมต่อเนื้อมะม่วงบด 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และสามารถกรองหรือเซนติฟิวก์แยกเอาน้ำมะม่วงออกมาได้ง่าย ซึ่งตามภาวะดังกล่าวเมื่อสกัดแล้วจะได้ผลผลิตของน้ำมะม่วง 21 กิโลกรัมจากเนื้อมะม่วง 30 กิโลกรัม

Sreenath และ Santhanam (1992) ศึกษาการเพิ่มผลผลิตของน้ำผลไม้ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แคนตาลูป แตงโม ขนุน มะละกอ และ มะขาม โดยใช้เพคติเนส (Pectinex Ultra SP-L) หรือ เซลลูเลส (Celluclast) ซึ่งผลิตโดยบริษัท Novo Industri A/S พบว่า เอนไซม์แต่ละชนิดสามารถเพิ่มผลผลิตของน้ำมะละกอ แคนตาลูป และ แตงโม ได้เพียงเล็กน้อยคือ ประมาณร้อยละ 6-10 ในขณะที่จะเพิ่มผลผลิตของน้ำมะขามได้ร้อยละ 10-15 สำหรับขนุนพบว่าไม่สามารถสกัดน้ำออกมาได้เลย แม้ว่าความหนืดของเนื้อผลไม้จะลดลง ดังนั้นความสามารถของเพคติเนสหรือเซลลูเลสในการย่อยสลายเนื้อเยื่อผลไม้จึงขึ้นอยู่กับพันธุ์ของผลไม้ธรรมชาติของเนื้อผลไม้องค์ประกอบ และระดับความสุกของเนื้อผลไม้นั้น ๆ

ในการสกัดน้ำผักหรือผลไม้ จำเป็นต้องมีการทำลายพอลี-แซคคาไรด์ที่ผนังเซลล์พืชหรือกล่าวอีกนัยหนึ่ง คือ ทำเนื้อเยื่อผักผลไม้ให้เป็นของเหลว (lique--faction) ซึ่งเกี่ยวกับเรื่องนี้ มีงานวิจัยมากมายที่สนับสนุนถึงผลการเสริมกันของการใช้เพคติเนสร่วมกับเซลลูเลส อาทิเช่น

Voragen, Heutink และ Pilnik (1980) ศึกษาการทำงานของเพคติเนสบริสุทธิ์ได้แก่ endo-polygalacturonase (PG), endo-pectin lyase (PL) และ pectinesterase (PE) และ เซลลูเลสบริสุทธิ์ชนิด C-1 ที่มีต่อการย่อยสลายผนังเซลล์ของแอปเปิ้ล ซึ่งในการทดลองนี้เตรียมตัวอย่างเนื้อแอปเปิ้ลเป็น 2 ลักษณะ คือ ตัวอย่างแรกประกอบด้วยส่วนของแข็งที่ไม่ละลายในน้ำเรียกว่า WIS (water-insoluble solid) ซึ่งเตรียมจากเนื้อเยื่อผนังเซลล์ในส่วน cortical ซึ่งผนังเซลล์ส่วนนี้ประกอบด้วยเพคตินที่มีจำนวนหมู่คาร์บอกซิลที่ถูกแทนที่ด้วยแอลกอฮอล์ต่ำ (low-esterified pectin) ตัวอย่างที่สองประกอบด้วยส่วนของของแข็งที่ไม่ละลายในแอลกอฮอล์ เรียกว่า AIS (alcohol-insoluble solid) เตรียมจากเนื้อเยื่อผนังเซลล์ส่วน cortical ที่ผ่านการทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งเนื้อเยื่อนี้ประกอบด้วยเพคตินที่มีจำนวนหมู่คาร์บอกซิลที่ถูกแทนที่ด้วยแอลกอฮอล์สูง (highly esterified pectin) นำผลผลิตจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลที่เป็นกลาง (neutral sugar) โดยวิธี gas-chromatography และวิเคราะห์หากรดกาแลคทูโรนิก โดยวิธี colorimetry จากการทดลองพบว่า เพคตินเอสเธอเรส (PE) ตามลำพังไม่สามารถปลดปล่อยน้ำตาลออกมาจากเพคตินได้ แต่เมื่อใช้ร่วมกับ พอลีกาแลคทูโรเนส (PG) พบว่า สารประกอบที่เป็นกาแลคทูโรแนน ใน AIS ทั้งหมดจะถูกละลายออกมา สำหรับเซลลูเลส C-1 จะจำเพาะต่อเซลลูโลส และปลดปล่อยเซลโลไบโอสออกมา นอกจากนี้พบว่าเมื่อใช้กาแลคทูโรเนสร่วมกับเซลลูเลส C-1 ย่อยสลาย WIS พบว่า มีการปลดปล่อยพอลิแซค--คาไรด์ที่ผนังเซลล์ในส่วนของ WIS ออกมาร้อยละ 63 และเมื่อใช้เซลลูเลส C-1 ร่วมกับเพคตินไลเอส จะปลดปล่อยพอลีแซคคาไรด์ที่ผนังเซลล์ในส่วน AIS ออกมาร้อยละ 77.5 และเมื่อรวมการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดคือ เซลลูเลส C-1 พอลีกาแลคทูโรเนส และเพคตินเอสเธอเรส จะปลดปล่อยพอลีแซคคาไรด์ที่ผนังเซลล์ในส่วนของ AIS ออกมาถึงร้อยละ

90 ซึ่งจากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า เซลลูเลส C-1 มีบทบาทสำคัญในการเสริมการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายเพคตินในผนังเซลล์แอปเปิ้ล

Kilara (1982) ได้รายงานผลจากการศึกษาการลดความหนืดของน้ำแอปเปิ้ลโดยใช้เอนไซม์ และพบว่าการใช้เพคติเนสเข้มข้นร้อยละ 0.01 ร่วมกับเซลลูเลสเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถลดความหนืดได้ดีกว่าการใช้เพคติเนสเข้มข้นร้อยละ 0.1 หรือเซลลูเลสเข้มข้นร้อยละ 0.1 อย่างใดอย่างหนึ่ง

Sreenath, Frey และ Radola (1984) ศึกษาการย่อยสลายแครอทโดยใช้เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* และใช้เพคติเนส (Rohament P) ซึ่งผลิตโดยของบริษัท Rohm GmbH พบว่า เมื่ออุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเป็น 50 องศาเซลเซียส และใช้เวลา 30 นาที ผลของการใช้เอนไซม์แต่ละชนิดตามลำพัง สามารถย่อยสลายเนื้อเยื่อของแครอทได้ประมาณร้อยละ 60 ในขณะที่เมื่อใช้เอนไซม์ทั้งสองร่วมกันทำให้การย่อยสลายเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 80 นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้เอนไซม์ทั้งสองร่วมกันในลักษณะให้ทำงานพร้อมกันอย่างต่อเนื่อง (simultanous) จะมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ร่วมกันในลักษณะเรียงกันตามลำดับก่อนหลัง (sequence)

Noach (1986) ศึกษาถึงผลของสารประกอบเพคตินต่อการทำงานของเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ตามลำดับ โดยทดลองกับเนื้อเยื่อของส้มโอ พบว่า การใช้เพคติเนสและเซลลูเลสร่วมกันจะทำให้น้ำตาลไซโลสและกลูโคสที่เนื้อเยื่อของส้มโอลดลงมากกว่ากรณีใช้เอนไซม์แต่ละชนิดตามลำพัง ผลของการทำงานเสริมกันนี้ แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างของผนังเซลล์ ที่มีลักษณะของการบดบังเซลลูโลสโดยสารประกอบเพคติน การทำลายการบดบังของสารประกอบเพคตินโดยใช้เพคติเนส จะทำให้การย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบอีกว่าการทำลายการบดบังโดยการสกัดสารประกอบเพคตินออก โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์จะทำให้มีเซลลูเลสย่อยสลายเซลลูโลสได้มากขึ้น จึงสรุปได้ว่า สารประกอบเพคตินขัดขวางการทำปฏิกิริยาของเซลลูเลสและเฮมิเซลลู-

-เลส ในการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสตามลำดับ

Massiot, Thibault และ Rouau (1989) ศึกษาการย่อยสลายเส้นใยแครอทพันธุ์ *Daucus carota* โดยใช้เพคติเนส (SP 249) และเซลลูเลส (celluclast) ซึ่งผลิตโดยบริษัท Novo Industri A/S พบว่า การใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดร่วมกันจะทำให้การสลายของเส้นใยแบบเสริมกัน และทำให้พอลีแซคคาไรด์ละลายออกจากผนังเซลล์ร้อยละ 95 ซึ่งจากการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการละลายของน้ำตาลและการวิเคราะห์โดยวิธี gel-permeation chromatography ของผลิตภัณฑ์ที่ละลายได้ พบว่า พอลิเมอร์ของเพคตินจะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็ว ในขณะที่เซลลูโลสจะถูกย่อยสลายไปเป็นเซลโลไบโอสและกลูโคสในอัตราที่ช้ากว่า

สำหรับงานวิจัยที่ทำการศึกษาการใช้เอนไซม์ในการสกัดของเหลวจากกล้วยเพื่อวัตถุประสงค์ต่าง ๆ กัน ได้มีผู้ทำการศึกษากล่าวไว้ดังนี้

Sreekantiah และคณะ (1971) ศึกษาการใช้เพคติเนสเข้มข้น (PEC) ที่ได้จาก *Aspergillus niger* ในการสกัดน้ำกล้วย โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.5-0.6 โดยน้ำหนัก ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นกรองน้ำกล้วยที่ได้ผ่านผ้ากรอง ซึ่งพบว่า ได้ผลผลิตออกมาประมาณร้อยละ 60 โดยน้ำหนัก

Jaleel และคณะ (1978) ศึกษาการใช้เพคติเนสเข้มข้น (PEC) ในการสกัดน้ำกล้วยโดยแปรความเข้มข้นของ PEC ในช่วงร้อยละ 0.5-2.0 โดยปริมาตรเอนไซม์ต่อน้ำหนักเนื้อกล้วยบด ในช่วงเวลา 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส พบว่า ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 0.75-1.0 เป็นปริมาณสูงสุดที่จะให้น้ำกล้วยออกมามากที่สุด นอกจากนี้การให้ความร้อนแก่เนื้อผลไม้และการเติม SO_2 จะช่วยทำให้คุณภาพของน้ำกล้วยดีขึ้น และในปีถัดมา (1979) Jaleel พร้อมทั้งคณะชุดเดิม ได้ศึกษาการผลิตน้ำกล้วยโดยผลิตเป็นระดับอุตสาหกรรมขนาดขั้นทดลอง (pilot scale) ซึ่งขั้นตอนการผลิตสรุปได้ดังนี้ คือ

(1) การปอกเปลือก (peeling) โดยใช้แรงงานคนในการปอกเปลือก และมีอัตราความเร็วในการปอกเปลือกโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 56-57 กิโลกรัมต่อชั่วโมงต่อคน จะได้เนื้อกล้วยคิดเป็นร้อยละ 63-68 โดยน้ำหนักเทียบกับกล้วยทั้งผล

(2) การบดให้ละเอียด (pulping) เป็นการทำให้ผลไม้มีขนาดเล็กลงซึ่งเท่ากับเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับทำปฏิกิริยาย่อยสลายด้วยเอนไซม์ให้มากขึ้น ส่งผลให้สามารถสกัดผลิตภัณฑ์น้ำกล้วยได้มากขึ้น โดยไม่ต้องสิ้นเปลืองพลังงานมากนัก สำหรับในกระบวนการผลิตที่มีกำลังการผลิตสูงสามารถบดเนื้อกล้วยโดยใช้เครื่องบด (APV pulper) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของตะแกรง (sieve) 250 มิลลิเมตร และมีความยาวของตัวเครื่อง 833 มิลลิเมตร โดยมีอัตราการบด 420 กิโลกรัมต่อชั่วโมง และอัตราการสูญเสีย (handling loss) อยู่ในช่วงร้อยละ 2-4 โดยน้ำหนัก

(3) การให้ความร้อน (blanching) โดยใช้อุณหภูมิในช่วง 65-70 องศาเซลเซียส เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในผลไม้ รวมทั้งทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (pathogen) พบว่า มีความเป็นไปได้ในการให้ความร้อนแก่กล้วยในระบบต่อเนื่องในอัตราของปริมาณกล้วย 84 และ 108 กิโลกรัมต่อชั่วโมงโดยใช้เครื่องแลกเปลี่ยนความร้อนแบบท่อ (tubular heat exchanger) ที่มีความยาวของท่อ 245 เซนติเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์-
-กลางท่อ 15 มิลลิเมตร และใช้เครื่องสูบ (pump) ในการหมุนเวียนวัตถุดิบ

(4) การทำให้เนื้อผลไม้เย็นลง (cooling) โดยใช้เครื่องแลกเปลี่ยนความร้อนแบบท่อ เครื่องเดียวกับที่ใช้ในการให้ความร้อน ใช้น้ำเย็น (cooling water) ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส โดยพบว่า สามารถทำให้เนื้อกล้วยบดที่มีอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ลดลงเหลือ 40 องศาเซลเซียส ได้ภายในเวลา 30-35 นาทีต่อเนื้อกล้วยหอมบด 99-100 กิโลกรัม

(5) การเติมเอนไซม์ (mash treatment) และคนให้เข้ากัน โดยใช้เพคติเนสเข้มข้น (PEC) เข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักของกล้วย และคนให้เข้ากันโดยใช้ความเร็ว 1400 รอบต่อนาที เวลาในการทำปฏิกิริยา 4 ชั่วโมง

(6) การสกัดน้ำกล้วย พบว่า สามารถใช้เครื่องกรองแบบแผ่นอัดความดัน (plate and frame filter press)ในการสกัดน้ำกล้วยได้ โดยเครื่องกรอง

ประกอบด้วยแผ่นโลหะที่มีรูตะแกรงและมีผ้าหนา ๆ ซ้อนอยู่ระหว่างแผ่นโลหะและใช้แรงดันจากสกรู ดันให้แผ่นโลหะอัดกันแน่น อาจใช้สารที่ช่วยในการกรอง (filter aid) พวก Hyflo Supercel ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก โรยให้ทั่วผ้าก่อนที่จะกรอง สารช่วยกรองนี้ไม่ละลายน้ำและไม่ทำให้ส่วนประกอบของน้ำผลไม้สูญเสียไป ซึ่งจะทำให้ได้น้ำผลไม้ที่ใสและมีปริมาณมากขึ้น ซึ่งพบว่าการสกัดโดยวิธีนี้สามารถสกัดน้ำกล้วยได้ร้อยละ 55 ที่ความดันในการอัด 60 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และส่วนที่เป็นกากก็จะไม่ติดเนื้อผ้า

(7) การเก็บถนอมรักษาผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ โดยการพาสเจอไรส์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(8) การบรรจุและปิดฝา

Viquez, Lastreto และ Cooke (1981) ทดลองใช้เพคติเนสทางการค้า 6 ชนิด แต่ละชนิดจะแตกต่างกันตามระดับปริมาณเพคติเนส ได้แก่ Pectinol และ Pectinol D จากบริษัท Rohm Gohm Pectinase PV 8 จากบริษัท Mile MKC Ultrazyme 100 และ Ultrazyme 100 special จากบริษัท Ciba-Geigy และ Clarifine Super จากบริษัท Sturge Chemicals ในการสกัดน้ำกล้วยจากกล้วยที่ความสุกระดับต่าง ๆ กัน และพบว่า กล้วยซึ่งมีลักษณะของเปลือกมีสีเหลืองสม่ำเสมอทั่วทั้งผลและมีรอยด่างสีน้ำตาลเป็นแถบกว้างจะให้ผลผลิตของน้ำกล้วยมากที่สุด และเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการใช้สกัดน้ำกล้วย คือ Ultrazyme 100 special และ Clarifine Super โดยมีภาวะที่เหมาะสมคือ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 0.01-0.025 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH 4.4-4.6

Gous, van Wyk และ McGill (1987) พบว่า จากการแบ่งกล้วยตามระดับความสุกออกเป็น 8 ระดับ ในระหว่างกระบวนการสุกของกล้วยจากที่ความสุกระดับ 3 ไปจนถึงที่ความสุกระดับ 8 พบว่าจะมีการสูญเสียคาร์โบไฮเดรตไปประมาณ 2 กรัม ส่วนสารประกอบพอลิฟีนอลและแทนนินจะมีปริมาณลดลงเมื่อกล้วยมีระดับความสุกมากขึ้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่าไม่สามารถนำกล้วยดิบมาใช้เป็นวัตถุดิบได้ แม้ว่า ในกล้วยดิบจะมีปริมาณน้ำตาลมากก็ตาม แต่

ในขณะเดียวกันก็มีปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลและแทนนินอยู่มากเช่นเดียวกัน ซึ่งสารประกอบพอลิฟีนอลสามารถยับยั้งการทำงานของเพคติเนสได้ และแทนนินก็เป็นสารที่ให้รสฝาดในกล้วย สำหรับผลของการใช้เอนไซม์ทางการค้าซึ่งผลิตโดยบริษัท Novo Industri A/S ในการสกัดน้ำกล้วย พบว่า Pectinex Ultra SP-L ให้ผลในการลดความหนืดได้ดีกว่า Ultrazyme 100 G และ Pectinex 3XL นอกจากนี้ ยังพบว่า การใช้เฮมิเซลลูเลส และเซลลูเลส (Celluclast 1.5L) ตามลำพัง จะมีผลต่อการลดความหนืดน้อยมาก

2.4.2.2 การบำบัดน้ำผลไม้ (Juice treatment)

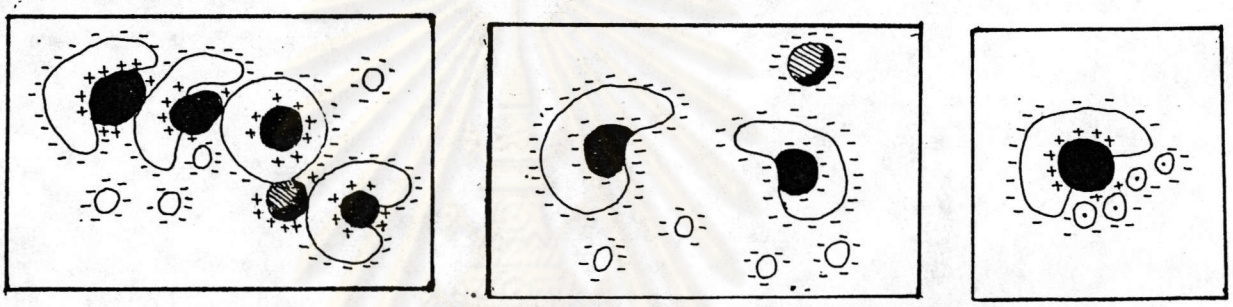
น้ำผลไม้หรือของเหลวจากผลไม้ที่สกัดได้โดยการใช้เอนไซม์อาจจะยังมีความขุ่น ความหนืด ที่ยังไม่เป็นที่ต้องการจึงต้องผ่านขั้นตอนนี้ ซึ่งเป็นขั้นตอนอีกขั้นตอนหนึ่งที่มีการใช้เพคติเนส ร่วมกับ อะมัยเลสและโปรติเนส (proteinase) โดยมีจุดประสงค์เพื่อลดความหนืดของน้ำผลไม้ ก่อนการทำน้ำผลไม้ที่มีความขุ่นให้เข้มข้นขึ้น และ/หรือ เพื่อช่วยทำให้น้ำผลไม้ที่ขุ่นซึ่งเป็นลักษณะปรากฏที่ไม่ต้องการให้มีลักษณะใสขึ้น ดังอธิบายแยกไว้เป็น 2 ประการ คือ

2.4.2.2.1 กรณีการทำน้ำผลไม้ที่มีความขุ่นให้เข้มข้นขึ้น ได้ของเหลวจากผลไม้หรือ น้ำผลไม้เข้มข้นมีลักษณะขุ่นซึ่งผลผลิตที่ได้อาจจะนำไปแปรรูปเป็นส่วนหัว--น้ำเชื้อของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม และ ประกอบเป็นสารปรุงแต่งรสผลไม้ต่อไป เช่น การผลิตหัวเชื้อส้มขุ่นเข้มข้น (cloudy orange concentrate) ซึ่งการผลิตหัวน้ำเชื้อผลไม้เข้มข้นนี้ จำเป็นต้องมีการทำลายเพคตินที่เพียงพอที่ให้ความหนืดของน้ำผลไม้มีค่าต่ำสุด ทั้งนี้ต้องควบคุมการทำลายพันธะไกลโคซิลของเพคตินไม่เกินร้อยละ 5-10 ซึ่งถ้ามีการทำลายเพคตินมากเกินไป จะเกิดผลเสียต่อการนำหัวน้ำเชื้อดังกล่าวมาเจือจาง โดยจะทำให้ความเสถียรของความขุ่น (cloud stability) เสียไป ซึ่งการควบคุมสามารถทำได้โดยใช้เอนโดพอลีกาแลคทูโรเนส (PG) ที่ไม่มีเพคตินเอสเธอเรส (PE) ปนอยู่ เนื่องจากไม่ต้องการให้มีจำนวนหมู่คาร์บอกซิลอิสระมากเกินไป หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ PE จะเปลี่ยนเพคตินไปเป็นกรดเพคติค และ PG จะจำเพาะต่อกรดเพคติคได้ดีกว่าเพคติน ดังนั้น อาจทำให้มีการทำลายพันธะไกลโคซิลเกินกว่าร้อยละ 5-10 ได้

2.4.2.2.2 กรณีการทำน้ำผลไม้ให้ใส พบว่า เพคติเนสได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านนี้มานานและกว้างขวางที่สุด โดยทั่วไปน้ำผลไม้ที่ได้จากการสกัดใหม่ ๆ จะขุ่นและมีความหนืด เพคติเนสจะมีบทบาทในการทำให้ความหนืดลดลงอย่างรวดเร็ว และกำจัดความขุ่น โดยเพคติเนสจะไปย่อยสลายเพคตินเป็นโมเลกุลเล็กซึ่งโมเลกุลเล็ก ๆ เหล่านี้จะจับกับอนุภาคสารประกอบอื่น ๆ รวมกันเป็นกลุ่มก้อนแล้วตกตะกอนลงมา ทั้งนี้ถ้าต้องการทำให้เกิดการตกตะกอนอย่างสมบูรณ์จะต้องประกอบด้วยขั้นตอน 2 ขั้นตอนคือ การทำลายเพคตินซึ่งเป็นสารแขวนลอยในน้ำผลไม้ และขั้นตอนการสะเทินประจุไฟฟ้าสถิตของอนุภาคสารแขวนลอยอื่น ๆ ในน้ำด้วย

Yamasaki และคณะ (1964) อธิบายกลไกการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสโดยใช้เอนไซม์ และพบว่า ความขุ่นในน้ำแอปเปิ้ลเกิดจากสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนและ คาร์โบไฮเดรต ซึ่งเหตุผลที่เป็นเช่นนี้ สังเกตได้จากผลการทดลอง 2 ประการ คือ เมื่อเติมเพคติเนสเพื่อย่อยสลายเพคตินในน้ำผลไม้ขุ่น จะทำให้น้ำผลไม้ใสขึ้นหลังจากมีการตกตะกอนของสารประกอบเชิงซ้อนนั้น และพบว่า ส่วนของตะกอนที่เหลือจะไม่ถูกย่อยสลายด้วยโปรติเนสที่มีความจำเพาะช่วงกว้าง ประการที่สอง จากการนำตะกอนที่ได้มาวิเคราะห์พบว่า มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอย่างน้อย 3 ชนิดรวมทั้งกรดกาแลคทูโรนิค และเมื่อพิจารณาจากการทำปฏิกิริยากับคอลลอยด์ชนิดต่าง ๆ และผลของอิเลคโทรฟอเรซีส พบว่า พื้นผิวของสารประกอบมีประจุลบแสดงว่า โปรตีนถูกล้อมรอบด้วยประจุลบของเพคติน ดังนั้นเมื่อเพคตินบางส่วนที่ล้อมรอบโปรตีนถูกย่อยสลายโดยเพคติเนส จะทำให้ประจุของโปรตีนแสดงออกมา โดยที่ pH 3.5 โปรตีนจะแสดงประจุสุทธิเป็นบวก ดังนั้นจึงจับกับประจุลบของเพคตินข้างเคียงที่ไม่ถูกย่อยสลายโดยเพคติเนสและเป็นผลทำให้เกิดการตกตะกอน ดังรูปที่ 2.21(1) แต่กรณีเช่นนี้จะไม่เกิดในระบบที่มี pH 4.75 แม้จะลดความหนืดลงจนถึงจุดที่สามารถตกตะกอนได้เช่นเดียวกับที่ pH 3.5 แล้วก็ตามแต่ก็จะไม่มีการตกตะกอนเกิดขึ้น ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากที่ pH 4.75 โปรตีนแสดงประจุสุทธิเป็นลบจึงไม่สามารถจับกับประจุลบของเพคตินแล้วรวมตัวตกตะกอนได้ ดังรูปที่ 2.21(2) อย่างไรก็ตามเมื่อมีการปรับ pH ให้ได้ 3.5 โดยใช้บัฟเฟอร์ จะมีการตะกอนตกลงมาอย่างรวดเร็ว หรือกล่าวอีกนัยหนึ่ง คือการตกตะกอนจะเกิดขึ้นได้ต้องมีการสะเทินของประจุไฟฟ้าสถิตของอนุภาคแขวนลอย

ต่าง ๆ ในระบบ นอกจากนี้ยังพบว่า การเติมโปรตีน เช่น เจลาติน เพียงเล็กน้อย จะช่วยเร่งการตกตะกอนโดยเพคติเนสได้เร็วขึ้น เนื่องจากโปรตีนจะช่วยในการเกาะตัวซึ่งกันและกัน แต่อย่างไรก็ตาม การมีคอลลอยด์ที่มีจุดประจุลบบางชนิดเช่น โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) หรือ คาร์บอกซี่เมทธิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose) จะมีผลยับยั้งปฏิกิริยาการทำให้ใสได้ เนื่องจากจะเกิดปรากฏการณ์ blocking effect โดยประจุบวกของโปรตีนจะถูกบดบังหรือจับกับประจุลบของคอลลอยด์เหล่านี้ ทำให้ไม่สามารถจับกับเพคตินได้ การตกตะกอนจึงไม่เกิดขึ้น ดังรูปที่ 2.21(3)

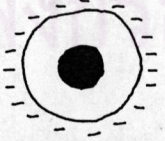


รูปที่ 2.21 ผลของประจุไฟฟ้าสถิตของสารประกอบเชิงซ้อนโปรตีนและเพคติน และ อนุภาคสารแขวนลอยอื่น ๆ ต่อการตกตะกอน หลังจากย่อยสลายเพคตินด้วยเพคติเนส

(1) ลักษณะประจุของสารประกอบเชิงซ้อนโปรตีนและเพคตินที่ pH ต่ำกว่า 4.0

(2) ลักษณะของประจุของสารประกอบเชิงซ้อนโปรตีนและเพคตินที่ pH สูงกว่า 5.0

(3) ลักษณะของการบดบัง (blocking effect) สารประกอบเชิงซ้อนโปรตีนและเพคตินจากคอลลอยด์ที่มีประจุลบบางชนิด

เมื่อ  : สารประกอบเชิงซ้อนโปรตีนและเพคติน

: เอนไซม์ หรือ โปรตีน

: เพคติน

: คอยลอยด์ที่มีประจุลบอื่น ๆ ที่เพคติเนสไม่สามารถย่อยสลายได้

Yamasaki และคณะ (1967) พบว่า การทำงานร่วมกันของเพคตินเอสเธอเรส และ เอนโดพอลีกาแลคทูโรเนส เป็นสิ่งจำเป็นในการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสอย่างสมบูรณ์ และ การใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ตัวใดตัวหนึ่งตามลำพังมีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสได้น้อยมาก ในระหว่างกระบวนการทำให้ใสด้วยเอนไซม์ ความหนืดจะลดลงอย่างรวดเร็ว ขณะเดียวกันสารแขวนลอยในน้ำแอปเปิ้ลจะตกตะกอนลงมาอย่างช้า ๆ

Yamasaki และคณะ (1971) ศึกษาการทำน้ำผลไม้ให้ใสโดยเพคติเนสที่สกัดได้จาก *Aspergillus sojae* ซึ่งประกอบด้วยเพคตินเอสเธอเรส พอลีกาแลคทู--โรเนส ซึ่งเป็นเพคติเนสในกลุ่มไฮโดรเลส และ pectin trans-eliminase ซึ่งเป็นเพคติเนสในกลุ่มไลเอส โดยพบว่า ประสิทธิภาพในการทำน้ำผลไม้ใสโดยเอนไซม์ดังกล่าวเป็นผลสืบเนื่องมาจากการทำงานของเพคตินไลเอส ต่อมาในปี ค.ศ. 1972 Ishii และ Yokotsuka ได้ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับน้ำแอปเปิ้ลให้ใสโดย ใช้ pectin trans-eliminase บริสุทธิ์ ที่สกัดได้จาก *Aspergillus sojae* ซึ่งมีแอคติวิตี 76.5 ยูนิตต่อมิลลิกรัม พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์เข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สามารถทำน้ำแอปเปิ้ลจำนวน 30-40 ลิตร ให้ใสได้ภายในเวลา 1 ชั่วโมง แต่สามารถทำน้ำองุ่นให้ใสได้เพียง 1 ส่วนใน 5 ส่วน ภายใต้ภาวะเดียวกัน นอกจากนี้พบว่า เอนไซม์มี pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง pH 3-4 และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 45-50 องศาเซลเซียส และมีรายงานว่า จุดที่น้ำแอปเปิ้ลถูกทำให้ใสอย่างสมบูรณ์ ปริมาณเพคตินครึ่งหนึ่งจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ละลายได้ในเอธานอลเข้มข้นร้อยละ 75 และต่อมาในปี ค.ศ. 1973 Ishii และ Yokotsuka (1973) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการทำน้ำแอปเปิ้ลและน้ำองุ่นให้ใสโดยใช้เพคตินไลเอส และ เอนโดพอลีกาแลคทูโรเนสบริสุทธิ์ที่สกัดได้จาก *Aspergillus japonicus* และพบว่า เพคตินไลเอส มีประสิทธิภาพในการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสเกือบเท่ากับเอนไซม์ที่ไม่บริสุทธิ์ (crude enzyme) ในขณะที่ เอนโดพอลีกาแลคทูโรเนส ไม่มีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใส สำหรับในกรณีน้ำองุ่น เอนไซม์ทั้งสองมีผลในการทำน้ำองุ่นให้ใสโดยบทบาทของเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่มีต่อกระบวนการทำน้ำองุ่นให้ใส จะแตกต่างไปตามพันธุ์และระดับความสุก และการใช้เอนไซม์ทั้งสองร่วมกันจะช่วยเสริมการทำน้ำองุ่นให้ใสให้ดีขึ้นและเร็วขึ้น

2.5 การตรึงรูปเอนไซม์

2.5.1 นิยามของเอนไซม์ตรึงรูป (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

เอนไซม์ตรึงรูป หมายถึง เอนไซม์ที่ถูกกำหนด หรือ ทำให้มาอยู่ในขอบเขตที่จัดไว้ อาจมีโมเลกุลใหญ่ขึ้นด้วยการเชื่อมพันธะเคมี หรือ ไม่มีพันธะเคมี ละลายน้ำได้ยากขึ้นหรือไม่ได้เลย มีผลให้เอนไซม์เปลี่ยนจากสถานะตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลว กลายเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งขณะทำปฏิกิริยา (solid catalysis)

ประโยชน์ของเอนไซม์ตรึงรูป มีดังนี้คือ

(1) มีโอกาสเพิ่มแอคติวิตีและเสถียรภาพของเอนไซม์ได้ ถ้าวิธีเหมาะสม

(2) ใช้กับระบบ multi-enzymes ในลักษณะ *in vitro* ได้

(3) ใช้ซ้ำ ใช้ต่อเนื่อง ใช้เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ได้

(4) ใช้ภาวะการทำปฏิกิริยาที่ต่างไปจากเอนไซม์อิสระ หรือ เอนไซม์เดิมได้

(5) ใช้ให้เหมาะสมกับเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ได้ ทั้งนี้ขึ้นกับรูปร่างตัวพยุงและลักษณะสับสเตรท

(6) เอนไซม์ที่นำมาตรึงรูป ไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ก็สามารถทำงานได้ดี เหมือนเอนไซม์บริสุทธิ์ ทั้งนี้ขึ้นกับวิธีการตรึงรูป

สำหรับผลกระทบของการทำเอนไซม์ตรึงรูปนั้นได้แก่

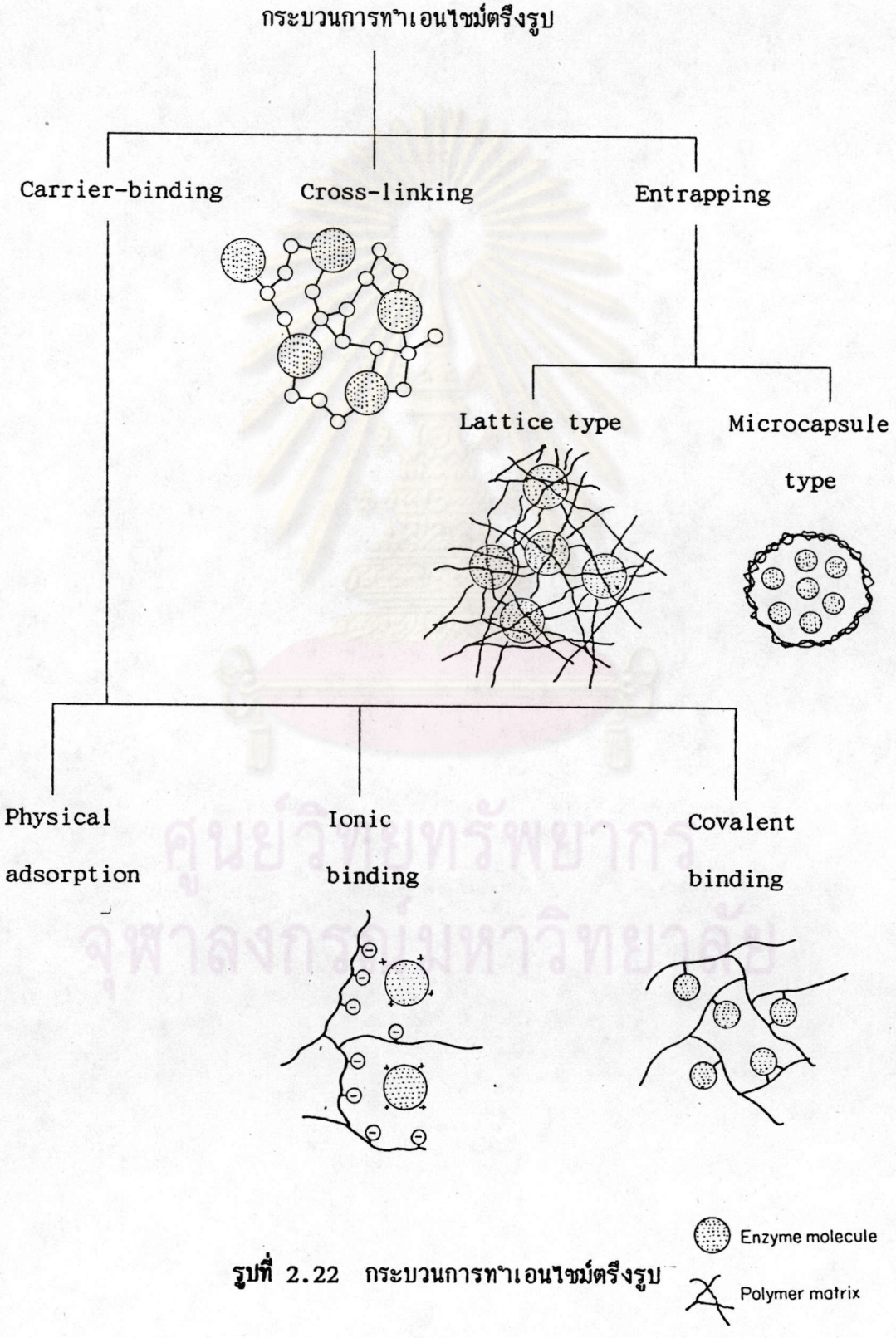
(1) แอคติวิตีอาจจะถูกกระทบกระเทือน เนื่องจากการยึดโมเลกุลของเอนไซม์กับตัวพยุงมีผลให้โครงรูปสามมิติ (conformation) เปลี่ยนไป และอาจมีผลต่อหมู่ที่อยู่ในบริเวณเร่งด้วย

(2) มีปัญหากับสับสเตรทที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน หรือ มีลักษณะแขวนลอย (suspension) ด้านการถ่ายเทมวล (mass transfer)

(3) ชนิดของตัวพยุงอาจจะมีผลกระทบต่อผลผลิตเช่น การปนเปื้อน หรือทำปฏิกิริยากับผลผลิต

2.5.2 <u>กระบวนการทำเอนไซม์ตรึงรูป</u> (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2533)

แบ่งกระบวนการทำเอนไซม์ตรึงรูปตามแผนภาพในรูปที่ 2.22



รูปที่ 2.22 กระบวนการทำเอนไซม์ตรึงรูป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรึงรูปเอนไซม์แบ่งเป็น 3 วิธีใหญ่ ๆ ซึ่งมีรายละเอียดของวิธีการดังนี้

2.5.2.1 การเชื่อมกับตัวพยุง (Carrier-binding method) โดยวิธีนี้โมเลกุลของเอนไซม์จะเชื่อมติดกับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งอาจทำได้ 3 วิธีคือ การดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) การเชื่อมด้วยพันธะไอออนิก (ionic binding) และการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ (covalent binding)

2.5.2.2 การเชื่อมข้าม (Cross-linking method) วิธีนี้จะอาศัยตัวกลางที่ทำหน้าที่เชื่อมโมเลกุลของเอนไซม์เข้าด้วยกัน ซึ่งตัวกลางอาจทำหน้าที่เชื่อมระหว่าง 2 โมเลกุล (bifunctional reagent) หรือเชื่อมระหว่างหลายโม่เลกุล (multifunctional reagent)

2.5.2.3 การห่อหุ้ม (Entrapping method) เป็นการบรรจุเอนไซม์ลงในช่องว่างหรือโพรง (lattice) ของเจลที่ยอมให้สารซึมผ่านได้บางส่วน หรือ ห่อหุ้มเอนไซม์ด้วยเมมเบรนพอลิเมอร์ที่ยอมให้สารซึ่งผ่านได้บางส่วน (encapsulation)

2.6 การตรึงรูปเพคติเนสและเซลลูเลสบนตัวพยุงต่าง ๆ

Romero, Monjon และ Iborra (1988) ศึกษาการตรึงรูปเพคตินเอสเธอเรส (PE) ร่วมกับ พอลีกาแลคทูโรเนส (PG) บนแก้วพรุนที่ควบคุมขนาดของรู ซึ่งกระตุ้นตัวพยุงให้มีหมู่ที่ไวปฏิกิริยากับโมเลกุลของเอนไซม์โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกรดพีริออดิก (periodic acid) และอนุพันธ์ ได้เป็น acylamine-glass จากนั้นจึงกระตุ้นด้วยกรดไนตรัสก่อนนำเอนไซม์มาตรึงรูป พบว่าเมื่อตรึงรูป PE ร่วมกับ PG พบว่าค่าแอคติวิตีของ PE จะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งเป็นเพราะ PE ตรึงรูปที่ได้ จะไม่ถูกยับยั้งโดยกรดพอลีกาแลคทูโรนิก เหมือนในกรณีของ PE อิสระ นับได้ว่าเป็นข้อได้เปรียบของ PE ตรึงรูป นอกจากนี้พบว่า อนุพันธ์เอนไซม์ตรึงรูปของ aminoaryl-glass-PE ที่ได้ยังคงไวต่อปฏิกิริยา อาจเนื่องมาจากการตรึงรูปดังกล่าวไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่ปลายไทโรซิล (tyrosyl residues) ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ เหมือนกับกรณีที่เกิดกับการตรึงรูปเอนไซม์บนอนุพันธ์อื่น กล่าวคือ โดย PE ตรึงรูปโดยวิธีดังกล่าวมีแอคติวิตีในการกำจัดหมู่เมธิลเอสเทอร์ออกจากโมเลกุลเพคตินซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 290,000 ได้ร้อยละ 45 ในขณะที่มีแอคติวิตีกับโมเลกุลเพคตินสังเคราะห์ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 34,000 ได้ร้อยละ

94 นอกจากนี้พบว่า การตรึงรูปเอนไซม์ทั้งสองร่วมกันจะให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่าการตรึงรูปแยกกันแล้วนำมาใช้ร่วมกัน แต่มีข้อจำกัดทางการแพร่ภายใน (Internal diffusion limitation) ซึ่งจะทำให้มีความเข้มข้นของกรดเพคติกรอบ PG สูงขึ้น ซึ่งทำให้ช่วยลดเวลาในการสัมผัสของ PG และ สับสเตรท เป็นผลให้แอคติวิตีของ PG เมื่อตรึงรูปร่วมกับ PE สูงกว่ากรณีที่ตรึง PG โดยลำพัง แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์ทั้งสองร่วมกันในลักษณะของเอนไซม์อิสระ พบว่าการใช้ในรูปเอนไซม์อิสระมีความสามารถในการลดความหนืดได้ดีที่สุด ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการตรึงรูปเพคติเนสจะทำให้เอนไซม์มีกลไกการตัดสายพอลีเมอร์ในลักษณะตัดปลาย--สาย (exo-form) ซึ่งทำให้จำเป็นต้องมีการไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคซิลในเพคตินมากกว่าในกรณีของเอนไซม์อิสระ เพื่อที่จะให้มีการลดลงของความหนืดอยู่ที่ระดับเดียวกัน

Fadda และ คณะ (1984) ศึกษาการตรึงเซลลูเลสที่สกัดได้ จาก *Trichoderma viride* บนตัวพยุง 3 ชนิดคือ CN-Br sepharose, Concanavalin-A-sepharose 4B (ConA-sepharose) และ CN-Br glass-beads พบว่า การตรึงรูปเซลลูเลสบนตัวพยุง ConA-sepharose จะให้ผลดีที่สุด เนื่องจากแอคติวิตีโดยรวมและแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เป็นองค์ประกอบย่อยในเซลลูเลส ยกเว้นไซลาเนส (β-xylanase) จะมีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับการตรึงรูปบนตัวพยุงอื่น นอกจากนี้พบว่าค่า K_m ของเซลลูเลสตรึงรูปบน ConA-sepharose มีค่าต่ำกว่าเซลลูเลสอิสระเล็กน้อย นั้นหมายความว่าการตรึงรูปดังกล่าวจะช่วยให้เซลลูเลสตรึงรูปมีความจำเพาะต่อสับสเตรทมากกว่าเซลลูเลสอิสระ นอกจากนี้พบว่าเซลลูเลสตรึงรูปบนตัวพยุงทั้งสาม มีความต้านทานต่อการยับยั้งการทำงานโดยน้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบรอสได้ดีกว่าเซลลูเลสอิสระ และยังสามารถย่อยสลายสารประกอบของลิกนินและเซลลูโลส (lignocellulose) ในธรรมชาติ 3 ชนิด ได้แก่ หญ้า (alfa-alfa), เปลือกข้าวสาลี (wheat straw) และ ใบสน (pine needles) ได้ดีกว่าเซลลูเลสอิสระด้วย สำหรับเซลลูเลสตรึงรูปบน ConA-sepharose หลังจากการนำมาใช้งานซ้ำเป็นจำนวน 5 ครั้ง พบว่าเซลลูเลสตรึงรูปสูญเสียแอคติวิตีไป 30-50 %

Roy, Roy และ Dube (1984) ศึกษาการตรึงรูปเซลลูเลสที่สกัดจาก *Macrophomina phaseolina* บนตัวพยุงประเภท acrylamide polymer พบว่าเซลลูเลสตรึงรูปที่ได้ มีแอคติวิตี

ต่อเซลลูโลสที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น เส้นใยฝ้าย ค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ และจากการศึกษาด้านจลน์ศาสตร์ของเอนไซม์พบว่า เซลลูเลสตรึงรูป ดังกล่าวมีค่า K_m สูงกว่าเอนไซม์อิสระ ค่า K_m ที่เพิ่มขึ้นนี้อาจเนื่องมาจากข้อจำกัดทางด้านการแพร่ของเซลลูเลสตรึงรูป แต่อย่างไรก็ตามเซลลูเลสตรึงรูปดังกล่าวมีเสถียรภาพของการใช้งานดีมาก โดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีเมื่อผ่านการใช้ซ้ำ 25-29 ครั้ง

Wongkhalaung และ คณะ (1985) ศึกษาการตรึงรูปเซลลูเลสที่สกัดจาก *Aspergillus niger* บนเดกซ์เตรน ที่กระตุ้นให้มีหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยากับโมเลกุลของโปรตีนด้วยไซยาโนเจนโบรไมด์ พบว่า ระดับของไซยาโนเจนโบรไมด์ในการกระตุ้นเดกซ์เตรนที่เหมาะสม คือ 25 มิลลิกรัมต่อเดกซ์เตรน (น้ำหนักโมเลกุล $1.7x10^5$-$2x10^5$) 370 มิลลิกรัม ที่ภาวะดังกล่าว มีการจับกันระหว่างเซลลูเลสกับตัวพยุงร้อยละ 50 และมีแอคติวิตีเทียบเป็นร้อยละ 70 ของเซลลูเลสอิสระ โดยเซลลูเลสตรึงรูปที่ได้มี pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.0-4.5 ในขณะที่เซลลูเลสอิสระมี pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาอยู่ที่ pH 4 และจะสูญเสียแอคติวิตีไปร้อยละ 10 เมื่อ pH เท่ากับ 4.5 นอกจากนี้พบว่าเซลลูเลสตรึงรูปมีความเสถียรต่อการเปลี่ยนแปลง pH ในช่วง pH 4.0-5.0 มากกว่าเซลลูเลสอิสระ ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเซลลูเลสตรึงรูปและเซลลูเลสอิสระเท่ากันคือที่ 60 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามพบว่าเซลลูเลสตรึงรูปดังกล่าวมีความเสถียรต่อความร้อนในช่วงอุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส มากกว่าเซลลูเลสอิสระ และทนต่อการทำให้เสียสภาพโดยความร้อนได้ดีกว่า แม้ว่าเซลลูเลสทั้งสองจะมีแนวโน้มของการเสียสภาพต่อความร้อนในลักษณะเดียวกัน แต่เซลลูเลสตรึงรูปยังคงมีแอคติวิตีสูงกว่าเซลลูเลสอิสระร้อยละ 20

Rogalski และ คณะ (1985) ศึกษาการตรึงรูปเซลลูเลสที่สกัดจาก *Aspergillus terreus* F-413 บนแก้วพรุน โดยใช้ 3-aminopropyltriethoxysilane เป็นตัวกระตุ้น และใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะเชื่อมขวางระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุง พบว่าเซลลูเลสตรึงรูปมีปริมาณโปรตีนโดยเฉลี่ย 23 มิลลิกรัมต่อแก้วพรุน 1 กรัม โดยเซลลูเลสตรึงรูปที่ได้มีแอคติวิตีเทียบเป็นร้อยละ 71.6-98.1 ของเซลลูเลสอิสระ มี pH ที่เหมาะสมในทางานเท่ากันคือ pH 5

สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเซลลูเลสตรึงรูปและเซลลูเลสอิสระเท่ากับ 45 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Sriputtirut และ Anprung (1989) ศึกษาการเตรียมเซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปบนทราย พบว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเซลลูเลสและเซลโลบิโอสตรึงรูปแบบเชื่อมพันธะโคเวเลนต์โดยใช้ทรายแม่น้ำขนาด 60-80 เมช เป็นตัวพยุง มีสารละลาย APTS ร้อยละ 5 โดยปริมาตร เป็นสารกระตุ้นตัวพยุง และมีกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร เป็นสารสร้างพันธะร่วม สัดส่วนโดยน้ำหนักของเซลลูเลส : เซลโลไบเอส ในเซลลูเลสเชิงซ้อนเป็น 2:1 จากการเตรียมภายใต้ภาวะดังกล่าว หลังจากนำมาย่อยสลายสับสเตรทที่เป็นเซลลูโลสพบว่า ไม่มีเอนไซม์หลุดออกจากตัวพยุง สมบัติทางจลนพลศาสตร์ของเซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป พบว่ามีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานที่อุณหภูมิเดียวกับเซลลูเลสเชิงซ้อนอิสระ คือที่ 50 องศาเซลเซียส มี pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ที่ pH 6.0 ในขณะที่เอนไซม์อิสระมี pH ที่เหมาะสมอยู่ที่ pH 5.0 นอกจากนี้ เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปยังมีความเสถียรต่อการเก็บที่อุณหภูมิห้องมากกว่าเซลลูเลสเชิงซ้อนอิสระ ซึ่งพบว่า เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปไม่สูญเสียแอคติวิตีเลยจากการเก็บที่อุณหภูมิห้องที่ pH 4.0 เป็นเวลา 34 วัน ในขณะที่เซลลูเลสเชิงซ้อนอิสระสูญเสียแอคติวิตีไปเกือบหมดที่ภาวะการเก็บเดียวกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.7 การตรึงรูปเอนไซม์บนตัวพยุงประเภทไนลอน

ไนลอนเป็นพอลีเมอร์สังเคราะห์ประเภทพอลิเอไมด์ แบ่งออกได้หลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดต่างกันตรงองค์ประกอบที่เป็นโมโนเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ไนลอน ตัวอย่างเช่น

1. ไนลอน 6,6 เตรียมจาก Hexamethylenediamine และ adipic acid ปฏิกิริยาแสดงดังสมการ :

$$NH_2(CH_2)_6NH_2 + HOOC(CH_2)_4COOH \longrightarrow [NH(CH_2)_6NHCO(CH_2)_4CO]_n + H_2O$$

Hexamethylenediamine Adipic acid Polyhexamethylenedipamide

2. ไนลอน 6 เป็นพอลิเมอร์ของ ϵ-Caprolactam ปฏิกิริยาแสดงดังสมการ :

$$NH(CH_2)_5CO \longrightarrow [NH(CH_2)_5CO]_n$$

ϵ-Caprolactam Polycaprolactam

3. ไนลอน 6,10 เตรียมจาก Hexamethylenediamine และ sebacic acid ปฏิกิริยาแสดงดังสมการ :

$$NH_2(CH_2)_6NH_2 + HOOC(CH_2)_8COOH \longrightarrow [NH(CH_2)_6NHCO(CH_2)_8CO]_n + H_2O$$

Hexamethylenediamine Sebacic acid Polyhexamethylenesebacamide

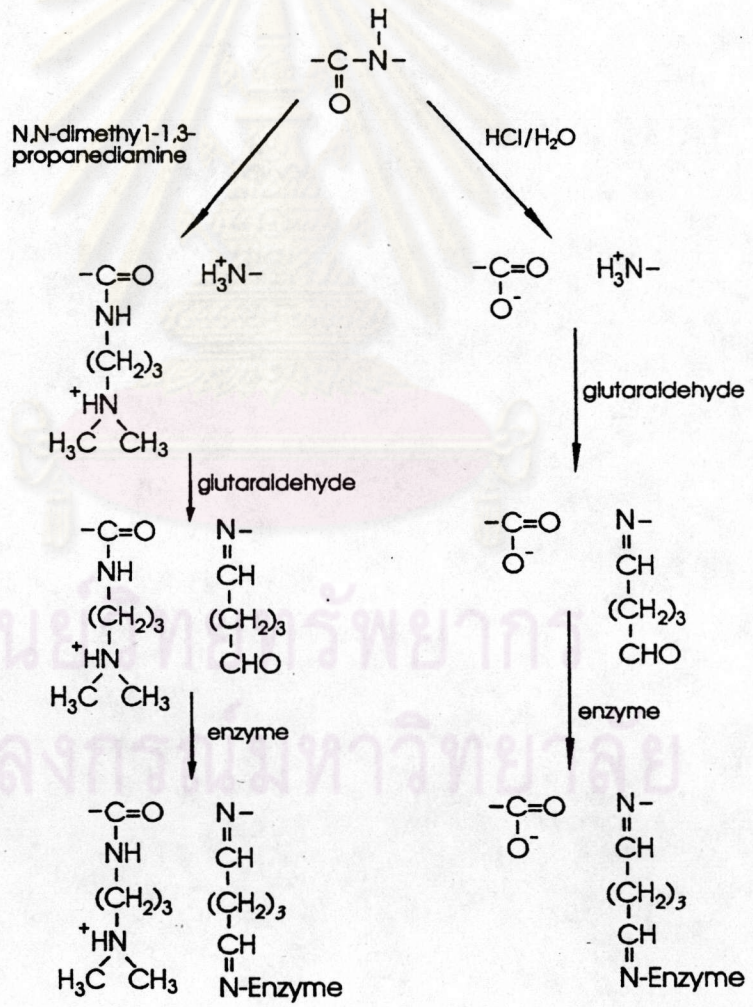
4. ไนลอน 11 เป็นพอลิเมอร์ของ Aminoundecanoic acid ปฏิกิริยาแสดงดังสมการ:

$$NH_2(CH_2)_{10}COOH \longrightarrow [NH(CH_2)_{10}CO]_n + H_2O$$

Aminoundecanoic acid Polyamionundecanamide

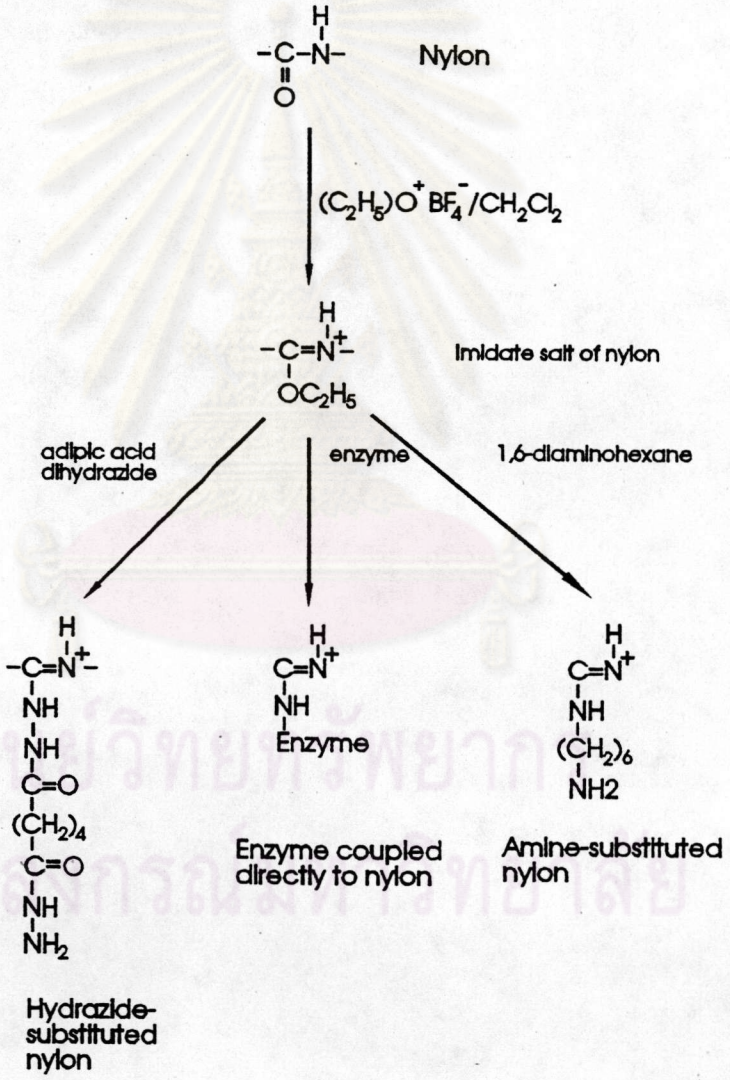
Hornby และ Goldstein (1976) ได้กล่าวถึงวิธีการตรึงรูปเอนไซม์บนตัวพยุงประเภทไนลอน โดยพันธะโคเวเลนต์ แบ่งเป็น 3 วิธีดังนี้ คือ

2.7.1 <u>สลายพันธะเอไมด์บางส่วนในสายพอลิเมอร์ของไนลอน</u> ด้วยกรด หรือ N,N-dimethyl-1,3-propanediamine ทำให้เกิดหมู่อะมิโน หรือ/และ หมู่คาร์บอกซิลอิสระ จากนั้นจึงกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลหรือหมู่อะมิโนอิสระดังกล่าวด้วยสารเคมีต่าง ๆ เช่น กลูตารัลดีไฮด์ สำหรับกระตุ้นหมู่อะมิโนอิสระ และ คาร์โบไดอิไมด์ (carbodiimide) สำหรับกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลอิสระ เป็นต้น ก่อนที่จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ซึ่งตัวอย่างกลไกการตรึงรูปโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารกระตุ้นหมู่อะมิโนอิสระ แสดงดังรูปที่ 2.23



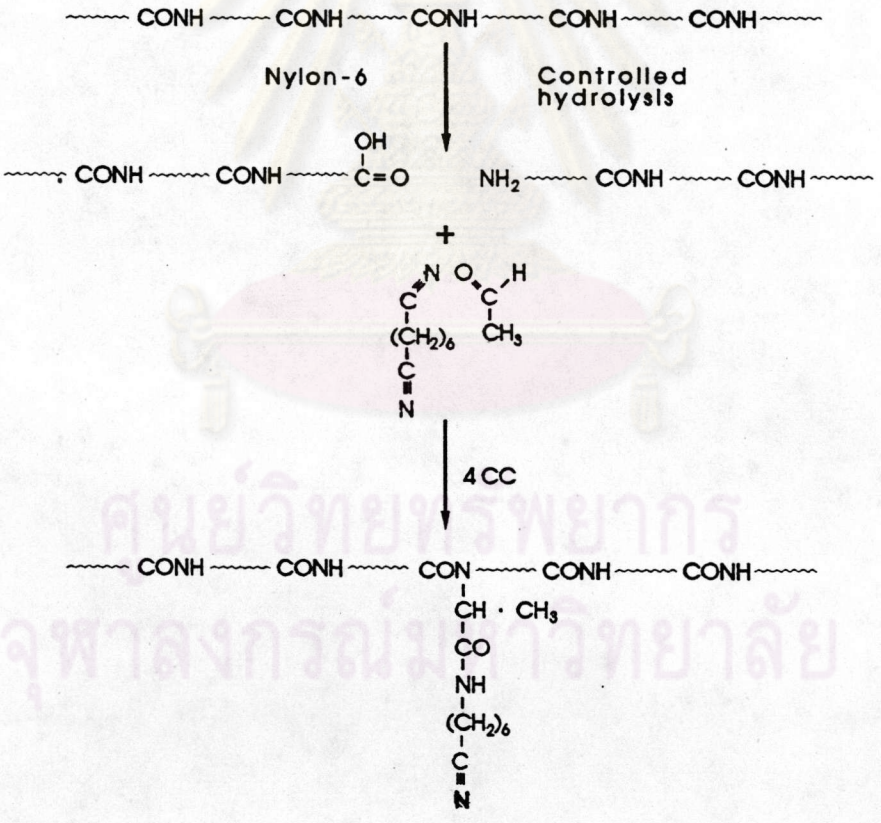
รูปที่ 2.23 ปฏิกิริยาการตรึงรูปเอนไซม์บนไนลอนด้วยวิธีการสลายพันธะเอไมด์บางส่วน

2.7.2 <u>การทำปฏิกิริยา O-alkylation</u> ให้กับพอลีเมอร์ของไนลอนด้วยสารที่มีสมบัติในการเติมหมู่อัลคิล เช่น ไดเมธิลซัลเฟต (dimethylsulfate) ทำให้เกิดเกลืออิมิเดทขึ้น (imidate salt) ซึ่งเป็นหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยา สามารถทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้โดยตรง หรืออาจแทนที่ด้วยสารประกอบประเภทเอมีน (amine) หรือ กรดไฮดราซีน (acid hydrazides) ก่อนที่จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ต่อไป กลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 2.24



รูปที่ 2.24 ปฏิกิริยาการตรึงรูปเอนไซม์บนไนลอนโดยวิธี O-alkylation

2.7.3 <u>การทำปฏิกิริยา N-alkylation</u> โดยสลายพันธะเอไมด์บางส่วนด้วยกรด เพื่อให้เกิดหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลอิสระบนพื้นผิวของไนลอน หลังจากนั้นเชื่อมหมู่อะมิโนและหมู่คาร์-
-บอกซิลกลับคืนโดยอาศัยการทำปฏิกิริยาควบแน่นของ 4 องค์ประกอบ (four-component condensation reactions : 4CC) ได้แก่ หมู่อะมิโน และคาร์บอกซิลอิสระที่อยู่ใกล้กัน สารประกอบประเภทอัลดีไฮด์ และ ไฮโซไซยาไนด์ ซึ่งจากปฏิกิริยา 4CC นี้จะทำให้ได้พอลีไอโซ-
-ไนไทรล์ไนลอน (polyisonitrile-nylon) ดังแสดงในรูป 2.25 ซึ่งพอลีไอโซไนไทรล์ไนลอนนี้มีหมู่ไซยาไนด์ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้



รูปที่ 2.25 ขั้นตอนการสังเคราะห์พอลีไอโซไนไทรล์

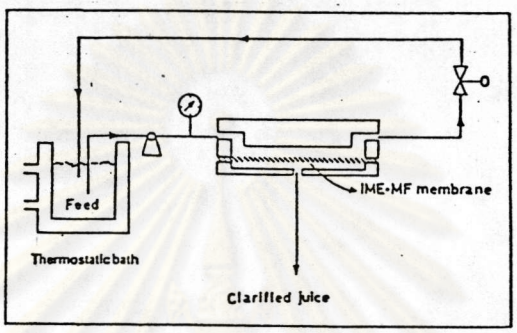
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประพันธ์ ปิ่นศิริรดม และ ปราณี อ่านเปรื่อง (2535) ศึกษาการตรึงรูปโปรติเอสบนผ้าไนลอน โดยใช้สารละลาย APTS เป็นสารกระตุ้นตัวพยุง และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะเชื่อมขวาง โดยพบว่า Neutrase ที่เตรียมได้ แสดงแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และที่ pH 6.6 ในขณะที่ Neutrase อิสระ แสดงแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และที่ pH 7.1 ค่าคงที่ไมเคิลลิส K_m ของ Neutrase ตรึงรูปเท่ากับ 9.7×10^{-4} มิลลิโมลาร์ ซึ่งต่ำกว่าของ Neutrase อิสระ 6.9 เท่า แอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 611.8 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งต่ำกว่า Neutrase อิสระ 0.9 เท่า นอกจากนี้ Neutrase ตรึงรูปมีเสถียรภาพเมื่อเก็บในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.1 ที่อุณหภูมิ 8-10 และ 30-33 องศาเซลเซียส ดีกว่า Neutrase อิสระ โดยมีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า 80 วัน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ด้วย Neutrase ตรึงรูป คือ 30 องศาเซลเซียส

Jain และคณะ (1987) ศึกษาการตรึงรูปเซลลูเลส (Celluclast 200L) บนไนลอน โดยวิธีแตกพันธะเปปไทด์ด้วยกรดไฮโดรคลอริค และ N,N-dimethylaminopropylamine และใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะเชื่อมขวางระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุง ซึ่งพบว่าเซลลูเลสตรึงรูปบนไนลอนที่แตกพันธะเปปไทด์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกและเอมีน จะมีแอคติวิตีสูงกว่าเมื่อแตกพันธะด้วยกรดไฮโดรคลอริกอย่างเดียว สำหรับภาวะที่เหมาะสมสำหรับเซลลูเลสตรึงรูปเมื่อใช้ ขี้เลื่อย (untreat sawdust) เป็นสารตั้งต้นพบว่า pH 4.8 เป็น pH ที่เหมาะสมในการปฏิกิริยา อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 58 องศาเซลเซียส อายุการใช้งานของเซลลูเลสตรึงรูปบนไนลอน พบว่าจะมีแอคติวิตีในการทำงานลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยหลังจากการใช้ซ้ำเป็นครั้งที่ 5 แอคติวิตีของเซลลูเลสตรึงรูปมีแนวโน้มที่จะเสถียร ซึ่งจากการที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ทำให้ผลผลิตโดยรวมมากกว่าแม้ว่าเซลลูเลสอิสระจะให้ผลผลิตในครั้งแรกสูงกว่าก็ตาม ซึ่งพบว่าเซลลูเลสตรึงรูปบนไนลอนโดยวิธีนี้จะมีแอคติวิตีประมาณร้อยละ 60 ของเอนไซม์อิสระและจะมีแอคติวิตีลดลงเมื่ออายุการใช้งานมากขึ้น

นอกจากนี้ รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรึงรูปเพคติเนสบนไนลอน เพื่อจุดประสงค์ในการแปรรูปน้ำผลไม้ ซึ่งเพิ่งจะเริ่มมีการวิจัยในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา พอจะเสนอเป็นแนวคิดได้ดังนี้

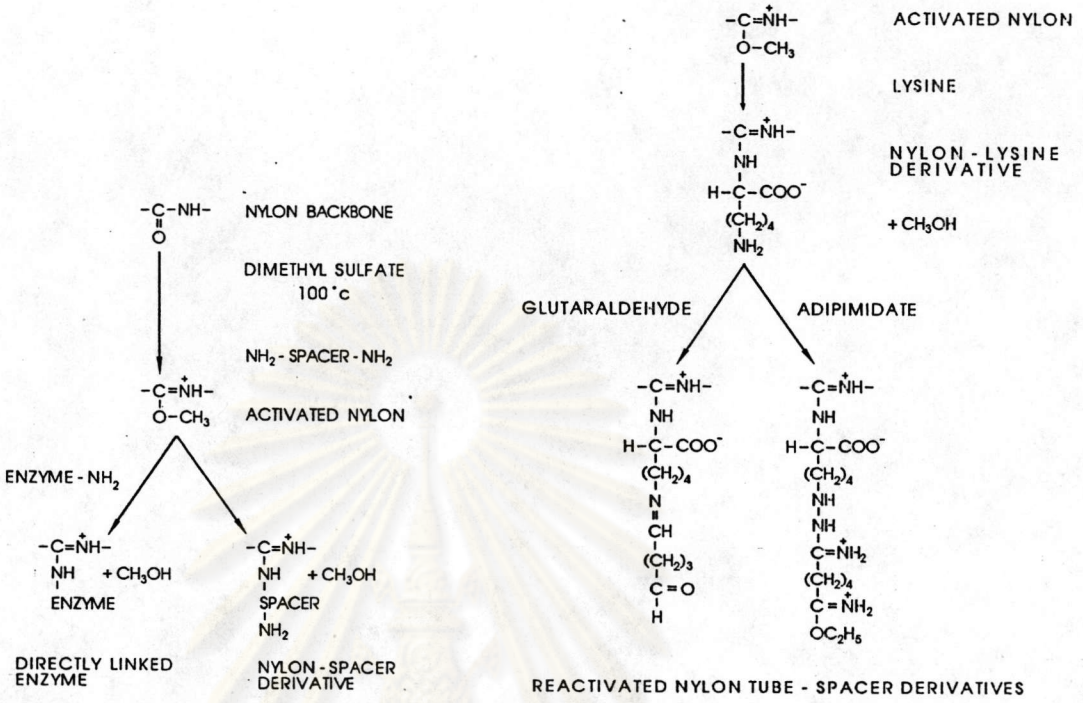
Lozano และคณะ (1987) ศึกษาการนำเพคติเนสตรึงรูปบนเยื่ออนุพันธ์ไนลอน (derivatized nylon membrane) มาประยุกต์ใช้ร่วมกับระบบไมโครฟิลเตรชั่น ในการทำน้ำแอปปริคอตให้ใส โดยออกแบบเครื่องปฏิกรณ์เป็นระบบต่อเนื่อง ซึ่งมีลักษณะแผนภาพแสดงดังรูปที่ 2.26



รูปที่ 2.26 แผนภาพเครื่องปฏิกรณ์สำหรับการทำน้ำแอปปริคอตให้ใส

กรรมวิธีการตรึงรูปเพคติเนสบนเยื่ออนุพันธ์ไนลอน จะกระตุ้นไนลอนโดยอาศัยปฏิกิริยา O-alkylation ซึ่งมีกลไกแสดงดังรูปที่ 2.27

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.27 กลไกการตรึงรูปเพคติเนสบนไนลอน โดยอาศัยปฏิกิริยา O-alkylation

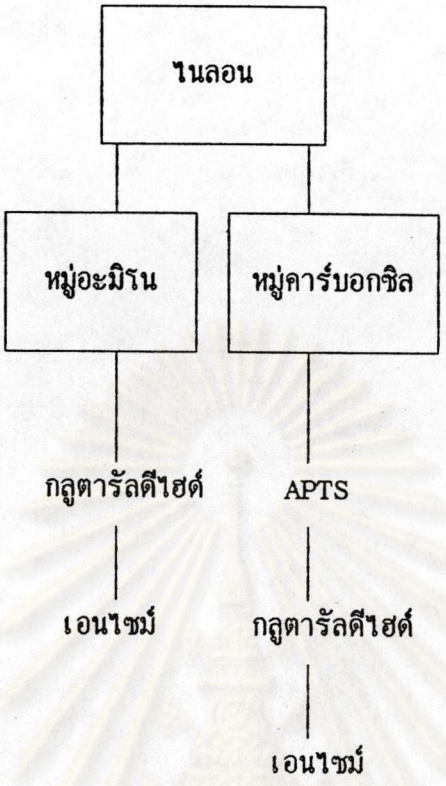
ในการทำน้ำแอปปริคอตให้ใส จะให้อัตราเร็วในการหมุนเวียนของน้ำผลไม้เท่ากับ 2.4 ลิตรต่อชั่วโมง ความดันของเครื่องปฏิกรณ์เมมเบรนเท่ากับ 1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ซึ่งพบว่า การใช้เพคติเนสตรึงรูปร่วมกับระบบไมโครฟิวเตรชั่นจะช่วยพัฒนาประสิทธิภาพของการทำน้ำแอปปริคอตให้ใสแบบต่อเนื่องได้ และยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกรองได้ดีกว่าการใช้ระบบไมโครฟิวเตรชั่นเพียงอย่างเดียว เนื่องจากเพคติเนสจะไฮโดรไลซ์เพคติน ที่บริเวณเมมเบรน (microfiltration membrane) ทำให้เกิดการแตกตัวของระบบคอลลอยด์ของน้ำผลไม้ นอกจากนี้น้ำผลไม้ที่ได้จากเครื่องปฏิกรณ์เมมเบรนที่ประกอบด้วยเพคติเนสตรึงรูปดังกล่าว จะมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้สูงกว่า อีกทั้งยังมีสีและกลิ่นรสมากกว่าที่ได้จากเครื่องปฏิกรณ์ที่มีระบบไมโครฟิวเตรชั่นเพียงอย่างเดียว

Lozano และ คณะ(1987) พัฒนาวิธีการตรึงรูปเพคติเนสเพื่อทำน้ำแอปปริคอตให้ใส โดยตรึงบนไนลอนพอลีเอธีลีนไอมีนโคพอลีเมอร์ (nylon polyethleneimine copolymer) โดยใช้เม็ดไนลอน 6 (nylon-6-pillets) เป็นตัวพยุง นำมาเคลือบด้วยพอลีเอธีลีนไอมีน (PEI) ซึ่ง PEI เป็นโคพอลีเมอร์ที่เสถียรมากและมีบริเวณจับกับหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยาของโปรตีนมากกว่าตัวพยุงที่มีรูพรุน (porous support) อื่น ๆ ทั้งนี้ในกระบวนการตรึงจะใช้ triethyl--oxonium tetrafluoroborate (TOTFB) เป็นตัวกระตุ้นให้เม็ดไนลอนไวต่อปฏิกิริยาแล้วจึงเคลือบด้วยพอลีเอธิลีนไอมีน จากนั้นทำให้อนุพันธ์ของไนลอน-PEI ไวต่อปฏิกิริยา โดยใช้กลูตา--รัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะเชื่อมขวางระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุง พบว่า เพคติเนสตรึงรูปที่ได้มีประสิทธิภาพในการทำงานค่อนข้างต่ำ เนื่องจากมีข้อจำกัดในการเข้าย่อยสลายสับสเตรทซึ่งจะย่อยสลายเฉพาะพื้นผิวภายนอกของสับสเตรทที่เอนไซม์สามารถเข้าถึงได้ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปนี้มี pH ที่เหมาะสมในการทำงานใกล้เคียงกับ pH ของน้ำแอปปริคอต และมีความเสถียรต่อการเสียสภาพธรรมชาติที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดวิกฤตได้ เอนไซม์ตรึงรูปนี้มีค่าครึ่งชีวิตในการใช้งาน 8 วัน และพบว่าค่าแอคติวิตีที่เหลืออยู่ (remaining activity) หลังจาก 8 วันนั้นเมื่อนำมาใช้ในระบบการทำงานแบบต่อเนื่องพบว่ามีแอคติวิตีเพียงพอที่จะทำน้ำแอปปริคอตให้ใสได้ ดังนั้นประสิทธิภาพของระบบจึงค่อนข้างสูง นอกจากนี้ ค่าแอคติวิตีที่เหลืออยู่ของเพคติเนสตรึงรูปบนไนลอนนี้มีแนวโน้มที่เสถียรเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งเป็นข้อที่ได้เปรียบคือ อายุการใช้งานของเพคติเนสตรึงรูปจะยาวนานกว่าอายุที่ได้จากการเทียบกับครึ่งชีวิตที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากวารสารปริทัศน์ต่าง ๆ ที่ได้กล่าวถึง ได้นำไปสู่งานวิจัยเรื่องนี้ด้วยเหตุปัจจัย และประสิทธิผลที่ประเมินไว้เบื้องต้นดังนี้

การผลิตหัวน้ำเชื้อกล้วยน่าจะเป็นอุตสาหกรรมที่นักลงทุนในประเทศน่าให้ความสนใจและเกิดขึ้นโดยอาศัยพื้นฐานข้อมูลจากการวิจัยในประเทศได้ ซึ่งปัจจัยต่าง ๆ ในประเทศเอื้ออำนวยต่อการลงทุนไม่ว่าจะเป็นปริมาณของวัตถุดิบที่สามารถผลิตได้ในปริมาณมากและผลิตได้ตลอดปี และอาศัยกระบวนการผลิตที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน นอกจากนี้ กล้วยหอมยังเป็นผลไม้ที่ตลาดในต่าง--ประเทศให้ความสนใจ เช่น เกาหลีใต้ ประเทศในแถบยุโรป และโดยเฉพาะประเทศญี่ปุ่น ที่ส่งเสริมให้ประชาชนบริโภคกล้วยหอมในรูปแบบต่าง ๆ ผลิตภัณฑ์จากกล้วยหอมจึงเป็นที่ยอมรับในหมู่ประชาชนมากขึ้น ซึ่งนอกจากจะผลิตหัวน้ำเชื้อกล้วยหอมโดยอาศัยเอนไซม์อิสระแล้ว ยังเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการนำเทคโนโลยีเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้ในวัตถุประสงค์ดังกล่าวนี้ เนื่องจาก คุณสมบัติของเอนไซม์ตรึงรูปมีข้อได้เปรียบเอนไซม์อิสระหลายประการ อีกทั้งเทคโนโลยีเอนไซม์ตรึงรูปได้เข้ามามีบทบาทในการแปรรูปน้ำผลไม้บางประเภทในระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา สำหรับวิธีการตรึงรูปที่ได้กำหนดไว้ในงานวิจัยนี้ เลือกใช้ไนลอน 6 เป็นตัวพยุงเนื่องจากมีเสถียรภาพเชิงกลดี ไม่ฉีกขาดง่าย ไม่ถูกย่อยสลายโดยทางชีวภาพ นอกจากนี้ยังมีสมบัติค่อนข้างชอบน้ำ ซึ่งลักษณะนี้จะช่วยให้เอนไซม์ตรึงรูปมีเสถียรภาพดี สำหรับการตรึงรูปจะใช้ระบบของการตรึงรูปแบบเชื่อมพันธะระหว่างโมเลกุลเอนไซม์กับตัวพยุงประเภทไนลอน โดยก่อนการตรึงรูปจำเป็นปรับสภาพหรือกระตุ้นผ้าไนลอนซึ่งปกติจะมีสภาพที่เฉื่อยต่อการเกิดปฏิกิริยา ให้เกิดหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยาโดยใช้วิธีแตกพันธะเปปไทด์ทำให้เกิดหมู่คาร์บอกซิล และหมู่อะมิโน จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการตรึงรูป ซึ่งขั้นตอนประกอบด้วยการกระตุ้นปลายคาร์บอกซิลให้เป็นหมู่อนุพันธ์ของอะมิโนที่มีความไวด้วยสารประกอบ อะมิโนโพล--พิลไตรเอทอกซีไซเลน (APTS) ตามด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะเชื่อมขวางระหว่างโมเลกุลเอนไซม์กับหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยาของไนลอน ซึ่งคาดคะเนโครงสร้างของเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวพยุงประเภทไนลอน ดังรูป 2.28 ดังนี้



รูปที่ 2.28 การคาดคะเนโครงสร้างของการตรึงรูประหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงประเภทไนลอน

ลำดับต่อมาของงานวิจัย ได้ทดลองนำเอนไซม์ตรึงรูปจากภาวะที่เตรียมได้มาใช้ในการสกัดหัวน้ำเชื้อกล้วยหอม ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเอนไซม์ตรึงรูปแบบถังกวน ที่มีลักษณะที่ไม่ต่อเนื่อง เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพและความเป็นไปได้ในการใช้สกัดหัวน้ำเชื้อกล้วยหอม และในขั้นตอนสุดท้าย ทดสอบการยอมรับหัวน้ำเชื้อกล้วยหอมที่สกัดได้ โดยนำมาดัดแปลงเป็นผลิตภัณฑ์น้ำกล้วย ซึ่งขอบข่ายทั้งหมดนี้ มีรายละเอียดดังจะเสนอเป็นลำดับไป