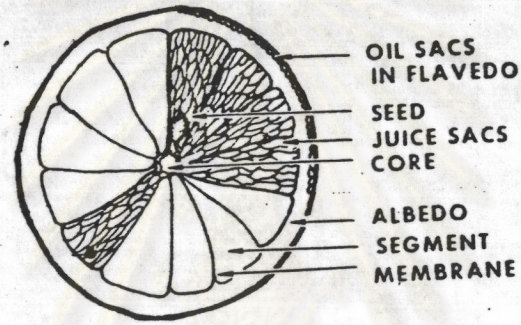
บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

ความหมายของ citrus fruit juice (Maier และคณะ, 1977, 1980)

citrus fruit juice เป็นน้ำผลไม้ที่คั้นได้จากผลไม้ตระกูลส้ม (citrus fruit) ซึ่งเป็นพืชชั้นสูง ได้แก่ orange, grapefruit, lemon, lime, mandarin พืชเหล่านี้จะมีลักษณะโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน ดังรูปที่ 1 แต่มีรูปร่างและขนาดต่างกัน



รูปที่ 1 ภาคตัดขวางของผลไม้ตระกูลส้ม

ที่มา : Maier และคณะ (1977)

citrus fruit และผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้น มีความสำคัญมาก เพราะเป็นผลไม้ที่มีวิตามินซีสูง เมื่อเทียบกับผักและผลไม้อื่น

องค์ประกอบที่สำคัญของผลไม้ตระกูลส้ม มีดังนี้คือ (Bruemmer, 1980)

1. Macronutrients : ได้แก่

1.1 คาร์โบไฮเดรท : น้ำตาลซูโครส, กลูโคส และฟรุคโตส, dietary fiber, organic acids เป็นต้น

1.2 โปรตีน

1.3 ไขมัน

2. Micronutrients

2.1 วิตามินที่ละลายในไขมัน (Fat soluble vitamin) : วิตามินอี และวิตามินเอ

2.2 วิตามินที่ละลายในน้ำ (Water soluble vitamin) : วิตามินซี

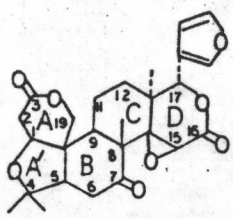
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในระหว่างการเก็บและกระบวนการผลิตน้ำผลไม้ตระกูลส้ม มักจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางฟิสิกส์ เคมี และการทำลายจากจุลินทรีย์ และปัญหาที่สำคัญมากในอุตสาหกรรมนี้คือ การเกิดรสขมเนื่องจากสารพวกลิโมนอยด์ (Limonoids)

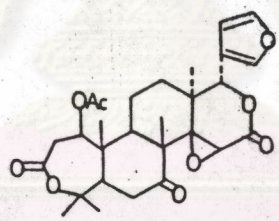
ลิโมนอยด์ (Maier และคณะ, 1977)

ลิโมนอยด์เป็นกลุ่มสารประเภท triterpene derivative ซึ่งประกอบด้วยสารสำคัญ ๆ อันเป็นสาเหตุของความขมในน้ำผลไม้ แต่ก็มีลิโมนอยด์บางตัวที่ไม่มีรสขม เช่น obacunone หรือมีรสขมแต่น้อย ตัวอย่างลิโมนอยด์ที่มีรสขมได้แก่

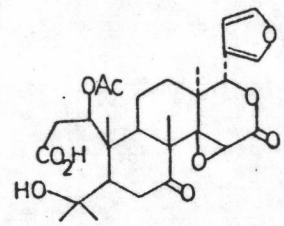
1. Limonin : เป็นสารที่พบเป็นตัวหลักในผลไม้ประเภทนี้
2. Nomilin
3. Nomilinic acid
4. Ichangin
5. Obacunoic acid



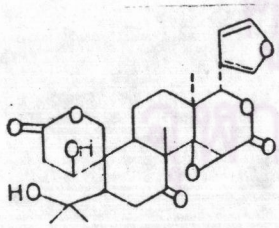
Limonin



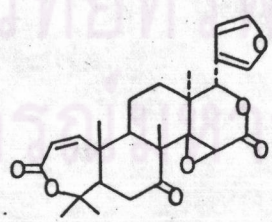
Nomilin



Nomilinic acid



Ichangin



Obacunone

รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของลิโมนอยด์บางตัวที่ทำให้เกิดรสขม

ที่มา : Maier และคณะ (1977)

ตารางที่ 1 The Taste of Citrus Limonoids and Some Derivatives (Maier และคณะ, 197

Compound	Taste
Limonin	Bitter
Deoxylimonin	Nonbitter
Obacunone	Nonbitter
Nomilin	Bitter
Limonoic acid	Nonbitter
Limonoic acid A-ring lactone	Nonbitter
Deacetylnomilin	Nonbitter
Ichangin	Bitter
Nomilinic acid	Bitter
17-Dehydrolimonoic acid A-ring lactone	Nonbitter
Limonexic acid	Nonbitter
Deoxylimonic acid	Nonbitter
Obacunoic acid	Bitter
Photolimonin I	Slightly bitter
Photolimonin II	Nonbitter
Limonilic acid	Nonbitter
Limonol	Nonbitter

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของลิโมนอยด์ในเมล็ดของผลไม้ตระกูลส้มชนิดต่าง ๆ

Seed	% distribution			
	Limonin	Nomilin	Obacunone	Deacetylnomilin
Grapefruit	76	15	1	8
	83	11	5	1
Valencia orange	50	34	1	15
	75	10	1	5
Navel orange	87	10	1	2
Sour orange	37	26	1	11
	39	21	1	17
Lemon	39	31	29	1
	40	40	20	1
Lime	70	28	1	1
Tangelo	43	43	13	1
Tangerine	63	16	1	20
	60	18	1	21

ที่มา : Maier และคณะ (1980)

จากตารางจะเห็นว่าสารลิโมนอยด์ที่พบมากที่สุดในเมล็ดคือ ลิโมนิน ซึ่งสารตัวนี้เป็นตัวทำให้รสขมในน้ำผลไม้ โดยเฉพาะ grapefruit, navel orange และ lime

การตรวจสอบโครงสร้างของลิโมนอยด์ (Maier และคณะ, 1977)

การตรวจสอบลิโมนอยด์นั้น สามารถทำได้โดยการใช้เทคนิคของ Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งต้องพ่น Chromatogram ด้วย Ehrlich's reagent (p-dimethylaminobenzaldehyde solution) แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับก๊าซไฮโดรเจน-คลอไรด์ โดยลิโมนอยด์ทั่วไปจะให้จุดสีส้ม ยกเว้น 17-dehydrolimonoid

การแยกลิโมนอยด์ จะใช้เทคนิคทาง Column chromatography สามารถตรวจสอบโครงสร้างลิโมนอยด์โดยการใช้

1. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy
2. Mass spectrometry
3. Optical rotary dispersion และ Circular dichroism

<u>ความหมายของลิโมนิน</u> (Maier และคณะ, 1977)

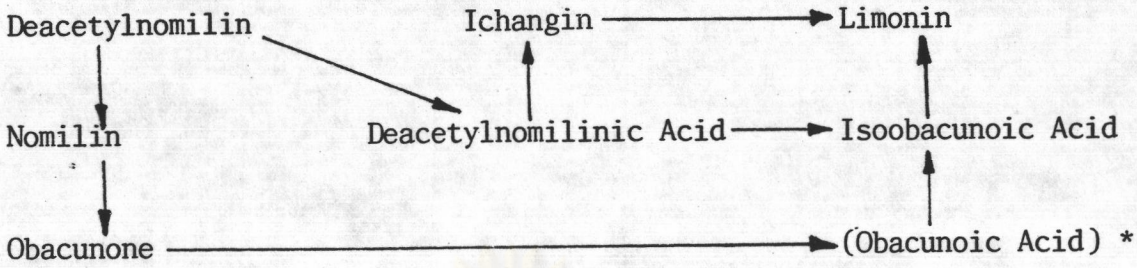
ลิโมนินถูกค้นพบว่าเป็นส่วนประกอบของผลไม้ตระกูลส้มตั้งแต่ปี 1841 ลิโมนินเป็นสารจำพวก tetranortriterpenoid ซึ่งไม่ละลายน้ำ เป็นสารตัวหนึ่งในกลุ่มสารจำพวกลิโมนอยด์ ลิโมนินถูกแยกครั้งแรกจาก Washington Navel Orange juice โดย Higby ในปี 1938 และพบว่าเป็นสารที่ให้รสขมในน้ำส้มโดย Emerson ในปี 1949 จากนั้นในปี 1960 Arigoni และคณะ ก็ได้รายงานโครงสร้างที่สมบูรณ์ของลิโมนิน และถูกแยกครั้งแรกจาก grapefruit juice โดย Maier และคณะ ในปี 1960

จากรูปที่ 2 จะเห็นว่าโมเลกุลของลิโมนินประกอบด้วย furan ring ต่อกับ D-ring ที่ C-17, ที่ C-3, C-4, C-7, C-16 และ C-17 จะมี oxygen-containing functional groups ระหว่าง C-14 และ C-15 จะเป็น epoxide group และที่ C-19 จะเป็น oxymethylene

<u>การสังเคราะห์ลิโมนิน</u> (Biosynthesis of limonin) (Maier และคณะ, 1977, 1980)

ลิโมนอยด์ถูกสังเคราะห์ขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโตของผลไม้ตระกูลส้ม โดยลิโมนินจะถูกสังเคราะห์ที่บริเวณใบ แล้วจะถูกเคลื่อนย้ายสู่เนื้อผลไม้และสู่เมล็ด

วิถีทางการสังเคราะห์ลิโมนิน



* not isolate

รูปที่ 3 The process biosynthetic pathways of limonin in citrus

ที่มา : Maier และคณะ (1977)

การสังเคราะห์ลิโมนิน คาดว่าวิถีทางที่ดำเนินผ่าน Ichangin จะเป็นวิถีทางที่รองลงมา เพราะ Ichangin เป็นลิโมนอยด์ที่พบน้อยในผลไม้ตระกูลส้ม ส่วน Nomilin และ Obacunone พบในผลไม้ตระกูลส้มเกือบทุกชนิด Kefford and Chandler (1970)

Bennett (1971) ได้แยก deacetylnomilinic acid (a) จากเมล็ดของ grapefruit เนื่องจากสารตัวนี้ในทางทฤษฎีสามารถเปลี่ยนเป็นสาร 2 ตัวคือ isoobacunoic acid (b) และ ichagin ซึ่งเป็น immediate precursor ของลิโมนิน เขากล่าวว่า deacetylnomilinic acid เป็นสาร intermediate ในกระบวนการสังเคราะห์ลิโมนินในผลไม้ การแยก isoobacunoic acid + ichangin กับ (a) จากเมล็ดของ grapefruit ยิ่งช่วยสนับสนุนความคิดนี้ เขาประสบความล้มเหลวในการตรวจสอบหา obacunoic acid แสดงว่าวิถีทางสังเคราะห์เกี่ยวข้องกับ ichangin และ (b) ทาง (a) จะเป็นไปได้มากกว่าวิถีทาง obacunone อย่างไรก็ตาม การที่ตรวจสอบพบ obacunone มากในผลไม้แสดงว่าไม่มีระบบเอนไซม์ที่จะเปลี่ยน obacunone ไปเป็น obacunoic acid

ลิโมนอยด์ที่เกี่ยวข้องในวิถีทางการสังเคราะห์จะอยู่ในลักษณะ Open D-ring form ในเนื้อเยื่อผลไม้ แสดงว่าลิโมนินที่อยู่ในเนื้อเยื่อผลไม้จะอยู่ในรูปของ limonoate A-ring lactone ยกเว้นที่เมล็ดซึ่งจะมีลิโมนินอยู่ สำหรับการสังเคราะห์ลิโมนอยด์อื่น ๆ ก็สามารถดำเนินตามวิถีทางนี้ได้ จากการค้นพบว่าลิโมนินสามารถเปลี่ยนรูปเป็น limonoate A-ring lactone โดยอาศัยเอนไซม์ limonin D-ring lactone hydrolase ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยา

แบบผันกลับได้ดังสมการ

$$\text{Limonin} \underset{\text{Limonin D-ring lactone hydrolase}}{\rightleftharpoons} \text{Limonoate A-ring lactone}$$

Limonoate A-ring lactone เป็นเกลือของ Limonoic acid A-ring lactone ซึ่ง A-ring ปิด และ D-ring เปิด (รูปที่ 4) Maier และคณะ พบว่า limonoic acid A-ring lactone เป็นสารตั้งต้นที่ไม่มีรสขม สารตัวนี้จะเสถียรในรูปของเกลือ และจะถูกเปลี่ยนเป็นลิโมนินเมื่อเนื้อเยื่อของผลไม้ได้รับการกระทบกระเทือนจากการบีบคั้นน้ำผลไม้ในสภาวะที่เป็นกรด และจะถูกเปลี่ยนเป็นลิโมนินอย่างรวดเร็วถ้ามีเอนไซม์ limonoate D-ring lactone hydrolase ถ้า D-ring ปิด ทำให้เกิดสารที่ให้รสขมคือลิโมนิน การเปลี่ยนจาก limonoic acid A-ring lactone ไปเป็นลิโมนินเมื่อเนื้อเยื่อผลไม้ถูกรบกวน เช่น การเกิดบาดแผล, ความเสียหายที่เกิดจากการแช่แข็ง, การบีบคั้น

เอนไซม์ limonin D-ring lactone hydrolase จะมีอยู่แล้วในผลไม้ และถูกแยกได้จากเมล็ดส้ม มันสามารถเร่งปฏิกิริยาแบบผันกลับได้ของ D-ring ในลิโมนิน ในการสังเคราะห์โดยทางธรรมชาติมันมักจะอยู่ในรูปของเกลือที่ละลายน้ำได้ (D-ring lactone open)

ปริมาณ limonoic acid A-ring lactone มีไม่เท่ากันในแต่ละส่วนของผลไม้ ใน Desert Navel Orange จะมีปริมาณ limonoic acid A-ring lactone มากที่สุดใน albedo และ flavado tissue รองลงมาคือ carpellary membrane และ juice vesicle ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

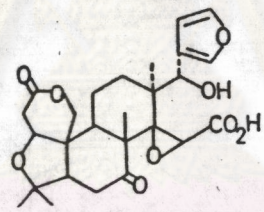
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 Limonoid Distribution in Desert Navel Orange Tissue[a]

	Limonoic Acid A-ring Lactone Content[b]	
	ppm. fresh weight	mg. per fruit
Albedo and Flavedo	415	22
Carpellary Membrane	305	10
Juice Vesicles	15	1.9

[a] Harvested November 12

[b] Determined as limonin



รูปที่ 4 สูตรโครงสร้างของ limonoic acid A-ring lactone (สารตั้งต้นของลิโมนิน)
ที่มา : Maier และคณะ (1977)

การยับยั้งการสังเคราะห์ลิโมนินตามธรรมชาติ (Maier และคณะ, 1980)

การยับยั้งการสังเคราะห์ลิโมนอยด์สามารถทำได้โดยใช้สารเคมีคือ Triethylamine derivatives เช่น 2-(4-ethylphenoxy) triethylamine และ 2-(3,4-dimethylphenoxy)- triethylamine สารนี้สามารถยับยั้งการสะสมของสารลิโมนอยด์ในใบของผลไม้ตระกูลส้ม ตัวอย่างเช่น ใบของต้นเลมอนที่ฉีดพ่นด้วย 2-(4-ethylphenoxy) triethylamine เข้มข้น 500 ppm จะมีความเข้มข้นของ limonoic acid A-ring

lactone เพียง 27 ppm หลังจากที่ฉีดพ่นแล้ว 8 วัน ในขณะที่ใบที่ไม่ได้ฉีดพ่นด้วยสารนี้จะมีความเข้มข้นของสารลิโมนอยด์ถึง 344 ppm

ปฏิกิริยาทางเคมีของลิโมนิน (Maier และคณะ, 1977)

ลิโมนินเป็นสารพวก tetracyclic triterpenoid dilacton กับ furan ring เป็น side chain, A-ring และ D-ring เป็นพวก δ-lactone ซึ่งสามารถเปิดและปิดได้ วงแหวนจะเปิดเมื่ออยู่ในสารละลายเจือจางของ alkali เมื่อลิโมนินเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะได้สารพวก dihydroxy diacid คือ limonoic acid สาร limonoic acid สามารถเกิดเป็นสารพวก monolactone ได้ 2 รูปแบบคือ limonoic acid A-ring lactone และ limonoic acid D-ring lactone ตัวที่มักอยู่ในเนื้อเยื่อของผลไม้ในธรรมชาติคือ limonoic acid A-ring lactone ปฏิกิริยาของลิโมนิน (ลิโมนิน = $C_{26}H_{30}O_8$) เช่น

1. Hydrogenation จะได้ของผสมของ tetrahydrolimonin $C_{26}H_{34}O_8$ และ hexahydrolimoniic acid ($C_{26}H_{36}O_8$)

2. Oxidation ด้วย alkaline hypoiodite จะได้ limonilic acid ($C_{26}H_{30}O_9$)

3. การเกิด dinitrophenylhydrazone โดยให้ลิโมนินทำปฏิกิริยากับ 2,4-dinitrophenylhydrazine ภายใต้สภาวะมาตรฐานของเวลาและอุณหภูมิคือ 16 ชั่วโมง ที่ 25 °C และตกผลึกในสารละลาย butanol จะได้ผลึกรูปเข็ม (needles) มีจุดหลอมเหลว 305 °C ($C_{32}H_{34}O_{11}N_4$)

ลิโมนินเป็นสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นโดยอากาศ ในระหว่างการแยกลิโมนินจึงต้องมีการเติม antioxidantsในน้ำผลไม้ที่สกัดได้เพื่อป้องกันการสูญเสียลิโมนิน antioxidants ที่ใช้คือ butylatehydroxytoluene, butylatehydroxyanisole, propyl gallate โดย antioxidants จะจับกับ O_2 เสียก่อนที่ O_2 จะไปทำปฏิกิริยากับลิโมนิน

<u>เมตาโบลิซึมของลิโมนินในผลไม้ตระกูลส้ม</u> (Maier และคณะ, 1977, 1980)

ปริมาณของสารลิโมนอยด์ในเนื้อเยื่อผลไม้จะลดลงเมื่อผลไม้มีความแก่ หรือมีอายุมากขึ้น ได้มีการค้นคว้าศึกษาสาร 17-dehydrolimonate A-ring lactone ซึ่งเป็น metabolite ของ limonoic acid A-ring lactone ที่แยกได้จากน้ำส้ม, เปลือก และเมล็ดของเลมอน การสกัดเอนไซม์ limonoate dehydrogenase โดยตรงจากเนื้อเยื่อของผลไม้สดนั้นไม่ประสบความสำเร็จ การติดตาม limonoid biodegradation system นี้ทำได้ยาก เพราะระดับของเอนไซม์ แอคติวิตีในผลไม้ค่อนข้างต่ำ ต่อมาได้มีการปรับปรุงโดยใช้ tissue slice technique ได้เป็นสาร radioactive limonoid คือ 19-deoxylimonoic acid 3-methyl-^{14}C ester สารนี้เตรียมได้ง่ายและเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ limonoate dehydrogenase ระหว่างที่บ่มสับสเตรทตัวนี้ด้วยเนื้อเยื่อ albedo ของส้มเป็นเวลา 2-3 วัน พบว่าสารนี้จะเปลี่ยนเป็น 17-dehydro-19-deoxylimonoic acid 3-methyl-^{14}C ester ซึ่งอัตราการเปลี่ยนของสารนี้จะแปรผันตรงกับเวลาที่บ่ม จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าในเนื้อเยื่อ albedo ของส้มมีแอคติวิตีของเอนไซม์ limonoate dehydrogenase

ลิโมนอยด์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อผลไม้อาจจะเคลื่อนย้ายไปสู่เมล็ดในผลไม้ที่มีเมล็ด หรือเคลื่อนไปสู่ปลายยอดในผลไม้ที่ไม่มีเมล็ดในระหว่างการสุก น้ำผลไม้ที่สกัดจากผลไม้ที่ไม่มีเมล็ดจะมีรสขมที่เกิดจากลิโมนินมากกว่าน้ำผลไม้ที่สกัดจากผลไม้ที่มีเมล็ด ยังไม่มีปรากฏการณ์ที่แสดงให้เห็นอย่างโดยตรงเกี่ยวกับการเคลื่อนย้ายของสารลิโมนอยด์นี้ แต่จากการสังเกตพบว่าปริมาณลิโมนอยด์จะลดลงเมื่อผลไม้มีความแก่เพิ่มขึ้น

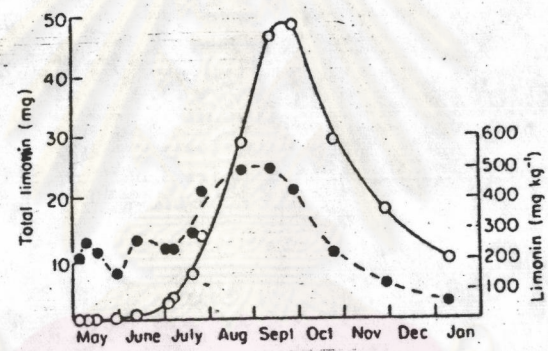
Dooxylimonin เป็น metabolite ของลิโมนินในการย่อยสลายโดยแบคทีเรีย สารนี้จะอยู่ในเมล็ดของ grapefruit ก่อนหน้านี้มีผู้ศึกษา และกล่าวว่า deoxylimonin เป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา epoxidation ที่ไม่สมบูรณ์ของสารตั้งต้นของลิโมนิน หรือเป็น side pathway ในการสังเคราะห์ลิโมนิน ได้มีการค้นพบว่าในเมล็ดของ lemon และ grapefruit มีเอนไซม์ deoxylimonic acid A-ring lactone hydrolase เอนไซม์ตัวนี้จะเกี่ยวข้องกับ deoxylimonin pathway ในแบคทีเรีย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในผลไม้ก็มี pathway นี้เกิดขึ้นเช่นเดียวกับที่เกิดในแบคทีเรีย

จากหัวข้อการสังเคราะห์ลิโมนอยด์ในธรรมชาติพบว่าในผลไม้มีเอนไซม์ limonin D-ring lactone hydrolase จาก deoxylimonin และ 17-Dehydrolimonoic acid A-ring laclone pathways ในผลไม้ แสดงให้เห็นว่า hydrolase อาจจะเกี่ยวข้องกับ biodegradation ของลิโมนอยด์ในผลไม้เหมือนกับที่เกิดในแบคทีเรีย

<u>ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณลิโมนินหรือความขมในผลไม้ตระกูลส้ม</u> (Maier และคณะ, 1977, 1980)

ความขมของผลไม้ตระกูลส้มขึ้นกับปัจจัยดังต่อไปนี้

1. เวลาในการเก็บเกี่ยว จะมีผลต่อปริมาณลิโมนินในผลไม้ กล่าวคือ ถ้าหากเก็บผลไม้ในช่วงต้นฤดู (commercial maturity) ปริมาณลิโมนินจะสูง แต่ถ้าเก็บในช่วงปลายฤดู ปริมาณลิโมนินจะต่ำ (Marsh 1953; Kefford และ Chandler 1961; Wilson และ Crutchfield 1968; Scott 1970; Albach et al. 1974; Levi et al. 1974) จากการศึกษาใน Washington Navel Orange พบว่าเมื่อมันแก่จัด (maturity) ปริมาณลิโมนินจะลดต่ำลง (Rodrigo และ Casas, 1982) ดังแสดงในรูปที่ 5



<u>รูปที่ 5</u> การเปลี่ยนแปลงของปริมาณลิโมนินระหว่างการเจริญเติบโตของ Washington Navel Orange

o ปริมาณลิโมนิน (mg.) ต่อผล

● ปริมาณลิโมนิน (mg. $Kg.^{-1}$)

วันบานของดอกคือ 9 พฤษภาคม

ที่มา : Rodrigo และ Casas (1982)

2. Species และ Cultivar เป็นแฟคเตอร์ที่มีผลต่อปริมาณลิโมนิน คือผลไม้ต่างชนิดกัน ปริมาณลิโมนินก็จะแตกต่างกัน หรือผลไม้ชนิดเดียวกันแต่เป็นคนละพันธุ์ ปริมาณลิโมนินก็จะต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 4

3. ผลของธาตุ N, P, K ที่ใส่ในดินจะมีผลต่อปริมาณลิโมนินใน Washington Navel Orange Juice พบว่าปริมาณลิโมนินจะลดลงเมื่อใช้ธาตุ N & K สูงขึ้น แต่ไม่มีข้อสรุปสำหรับผลของธาตุ P (Rodrigo et al. 1978)

4. ตำแหน่งของผลไม้ที่อยู่บนต้น จะมีผลต่อปริมาณสารตั้งต้นของลิโมนิน (limonin monolactone A) ใน Washington Navel Orange พบว่าผลที่อยู่ส่วนบนสุดของต้นจะมี limonin monolactone A มากกว่าผลที่อยู่ภายในต้น และผลที่อยู่ทางทิศตะวันออกและตะวันตกและผลที่อยู่ภายในต้นจะมีสารตั้งต้นตัวนี้น้อยกว่าที่อยู่ทางใต้ของต้น แต่จะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างปริมาณ limonin monolactone A ในผลที่อยู่ทางใต้และเหนือของต้น และระหว่างผลที่อยู่ทางตะวันออกและตะวันตก (Rodrigo et al. 1982)

5. สภาวะภายหลังการเก็บเกี่ยว การควบคุมสภาวะในระหว่างการเก็บ (storage) จะสามารถลดความขมได้ กล่าวคือ

5.1 เก็บไว้ในห้องที่อบอุ่นและมีความชื้น (Rockland et al., 1957)

5.2 การใช้เอทธีลีน 20 ppm. สัมผัสกับผลไม้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ภายหลังจากการเก็บเกี่ยวจะสามารถลดปริมาณลิโมนินได้ เพราะเอทธิลีนจะทำให้ limonoate A-ring lactone หยุดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นลิโมนิน มีสารตัวหนึ่งเมื่อสลายตัวแล้วจะให้เอทธิลีน คือ 2-chloroethylphosphonic acid (CEPA) แต่ยังมีการศึกษาด้าน toxicological ต่อไปก่อนที่จะได้รับอนุญาตจาก FDA (Maier et al., 1971, 1973; Anon, 1974)

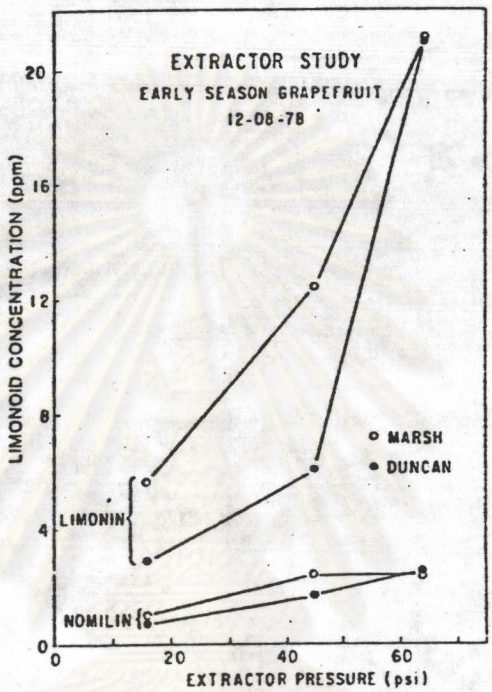
5.3 การใช้เอทธิลีน treat ส้มในช่วงต้นฤดูกาล (early season) เป็นเวลา 8 ถึง 24 ชั่วโมง เพื่อให้ส้มเกิด degreening คือการเปลี่ยนแปลงสีผิวจากสีเขียวเป็นเหลืองจะมีส่วนช่วยลดปริมาณลิโมนินด้วย

5.4 อุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บ โดยทดลองเก็บที่อุณหภูมิ 20 และ 30 °C เป็นเวลา 30 วัน พบว่าปริมาณความขมจะลดลงเมื่ออุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บเพิ่มขึ้น และยังพบอีกว่าถ้านำผลไม้ไปผ่าน pretreatment ด้วยเอทธิลีนก็จะช่วยลดความขมได้อีกด้วย (Sakamoto et al., 1985)

6. สภาวะในกระบวนการคั้นน้ำผลไม้

สภาวะในการคั้นน้ำผลไม้จะมีผลต่อปริมาณลิโมนิน กล่าวคือ ถ้าหากใช้แรงบีบคั้นขนาดต่ำ ปริมาณลิโมนินจะต่ำ แต่ถ้าใช้แรงบีบคั้นสูงจะทำให้ปริมาณลิโมนินมีค่าสูงขึ้นด้วย

(รูปที่ 6) ทั้งนี้เพราะแรงบีบคั้นจะทำให้เนื้อเยื่อถูกกระทบกระเทือน ซึ่งเป็นการเร่งให้ limonoic acid A-ring lactone เปลี่ยนไปเป็นลิโมนิน แรงบีบจะไม่มีผลเท่าใดนักกับโนมิลิน ในเชิงอุตสาหกรรมการควบคุมแรงบีบคั้นทำได้ยาก เพราะถ้าหากใช้แรงน้อย ปริมาณน้ำผลไม้ที่ได้ก็น้อยลงไปด้วย



รูปที่ 6 ผลของแรงบีบคั้นต่อปริมาณลิโมนอยด์ในน้ำผลไม้เกรปฟรุ๊ต พันธุ์ Duncan กับพันธุ์ Marsh

ที่มา : Rouseff และ Mansell (1982)

7. ระยะเวลาในการสัมผัสของเนื้อเยื่อกับน้ำผลไม้

การแยกเศษเนื้อเยื่อออกจากน้ำผลไม้โดยเร็วที่สุด จะสามารถช่วยลดปริมาณลิลิโมนินได้ ซึ่งทำให้ระดับความขมน้อยลงได้ (Trifiro et al., 1983)

8. ผลของสารให้ความหวาน (Sweeteners)

Guadagni et al. (1974A) ได้ศึกษาผลของ sweeteners ที่มีต่อความขม พบว่า sucrose, neohesperidin dihydrochalcone (NHD), hesperitin dihydrochalcone glucoside (HDG) และ aspertyl phenylalanine methyl ester (AP) จะมีส่วนบดบังความขมได้เล็กน้อย

9. ผลจากสารที่ให้รสขมประเภทอื่น

ในผลไม้ประเภทเกรปฟรุ๊ต จะมีนารินจิน (เป็นสารพวก flavanone neohesperidasides ซึ่งมีรสขม) ปะปนกับลิโมนิน สารนี้จะทำให้เกรปฟรุ๊ตที่มีระดับความขมของลิโมนินต่ำ เกิดความขมเพิ่มขึ้น

10. ปัจจัยอื่น ๆ เช่น สถานที่ปลูก, ชนิดของดิน และสภาพแวดล้อม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ปริมาณลิโมนินในผลไม้ชนิดและพันธุ์ต่าง ๆ

ที่มา : Maier และคณะ (1977)

REPORTED LIMONIN CONTENTS OF CITRUS JUICES

Type of Juice	Growing Region	Juice Source	Variables Studied or Samples Tested	Limonin Content (ppm)	Source
Grapefruit					
Marsh	Arizona	Laboratory	Jan.-June	9-3	1
Marsh	California	Laboratory	Avg of 4 samples	4	2
Marsh	California	Laboratory	Late-season	2.2	3
Duncan	Florida	Pilot plant	1 sample	2	4
Canned	Florida	Commercial	3 samples	12, 12, 16	5
Canned	Florida	Commercial	17 samples	16-2	6
Reconstituted concentrate	California	Commercial	1 sample	9.5	7
Reconstituted concentrate	California	Commercial	2 samples	14, 15	3
Lemon					
Eureka	California	Laboratory	Avg of 4 samples	6	2
Meyer	Florida	Laboratory	1 sample	2	6
Reconstituted concentrate	Arizona-California	Commercial	5 samples	2.9, 3.7, 4.2, 6.0, 14	3
Reconstituted concentrate	Florida	Commercial	1 sample	2	6
Lime					
Key	Florida	Laboratory	1 sample	6	6
Persian	Florida	Laboratory	1 sample	1	6
Natsudaidai	Japan	Laboratory	Feb., Mar., Apr.	65, 48, 30	8
Orange					
Hamlin	Texas	Laboratory	Sept.-Jan.	6.6-2.0	9
Marrs	Texas	Laboratory	Sept.-Jan.	5.4-1.6	9
Murcott	Florida	Laboratory	Rootstock and Local	9.4-19	6
Navel	Australia	Laboratory	Own rootstock	7.5	10
Navel	Australia	Laboratory	Trifoliate orange rootstock	8.0	10
Navel	Australia	Laboratory	Sweet orange rootstock	11	10
Navel	Australia	Laboratory	Rough lemon rootstock	17	10
Navel	California	Laboratory	Dec.-March	25, 24, 12, 6	2
Page	Florida	Laboratory	2 seasons	2, 1	6
Satsuma	Florida	Laboratory	1 season	0	6
Temple	Florida	Laboratory	3 seasons	3, 3, 4	6
Valencia	California	Laboratory	Early-season	2.3	3
Hamlin	Florida	Pilot plant	Low and high extraction pressures	1.5-5.5	4
Hamlin	Florida	Pilot plant	1 sample	2.0	4
Navel	Florida	Pilot plant	1 sample	4.0	4
Navel	Australia	Pilot plant	4 samples	8, 10, 18, 21	11
Parson Brown	Florida	Pilot plant	1 sample	1.5	4
Pineapple	Florida	Pilot plant	Low and high extraction pressures	<1-38	4
Valencia, early	Florida	Pilot plant	Low and high extraction pressures	<1-5	4
Valencia, late	Florida	Pilot plant	Low and high extraction pressures	<1-7	4
Valencia	Florida	Pilot plant	1 sample	2.0	4
Canned	U.S.	Commercial	Dec.-Feb.	6, 2, 2	4
Canned	U.S.	Commercial	Dec.-Feb.	2, 2, 2	4
Chilled	Florida	Commercial	4 samples	3, 4, 5, 5	5
Navel	Arizona-California	Commercial	Dec.-Apr.	42-2.3	12
Navel, Reconstituted concentrate	Arizona-California	Commercial	Dec.-Apr.	35-6.1	12
Navel, Reconstituted concentrate	California	Commercial	2 samples	9.4, 11	3
Shamouti, Reconstituted concentrate	Israel	Commercial	Dec.-Mar.	25->2	13
Valencia, Reconstituted concentrate	California	Commercial	1 sample	4.6	3
Tangelo					
Minneola	Florida	Laboratory	1 season	2	6
Nova	Florida	Laboratory	2 seasons	0, 4	6
Orlando	Florida	Laboratory	2 seasons	0, 0	6
Tangerine					
Asceola	Florida	Laboratory	1 season	4	6
Bower	Florida	Laboratory	2 seasons	6, 1	6
Dancy	Florida	Laboratory	3 seasons	0, 0, 2	6
Robinson	Florida	Laboratory	2 seasons	1, 1	6

Note: This table comprises data from a number of widely different sources. It is not intended to show comprehensive range nor to serve for direct comparisons.

Sources:

[1] Nelson *et al.* (1968)
[2] Maier *et al.* (1973)
[3] Maier and Grant (1970)
[4] Tatum and Berry (1973)
[5] Scott (1969)
[6] Scott (1970)
[7] Maier and Dreyer (1965)
[8] Nomura and Saito (1965)
[9] Albach *et al.* (1974)
[10] Chandler *et al.* (1966)
[11] Chandler *et al.* (1968)
[12] Wilson and Crutchfield (1968)
[13] Levi *et al.* (1974)

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณลิโมนินกับระดับความขมในน้ำผลไม้ตระกูลส้ม (Maier และคณะ , 1977, 1980 (Relatioship Between Limonin Content and Bitterness)

จากการศึกษาระดับความขมของลิโมนินกับปริมาณลิโมนิน พบว่าไม่สามารถที่จะสร้างความสัมพันธ์ที่แน่นอนระหว่างระดับความขมกับปริมาณลิโมนินได้ แต่ก็สามารถบอกได้อย่างประมาณ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ระดับความขมกับปริมาณลิโมนิน

ปริมาณลิโมนิน (ppm.)	ระดับความขม
> 16	ขมมาก
9-16	ขม
5-9	ขมน้อย
< 5	ไม่ขม

ที่มา : Maier และคณะ (1977)

ต่อมาได้มีการทดลองโดยใช้การทดสอบทางประสาทสัมผัส ใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนมาอย่างดี 20-27 คน มาทำการทดสอบความขมของน้ำส้มที่มีปริมาณลิโมนินต่างกัน ได้ผลทดสอบดังตารางที่ 6 ซึ่งจะเห็นว่าระดับความขมที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้คือ 0.5 ppm. และมีผู้ตรวจสอบได้ถึง 8% ทำให้คิดว่าถ้าหากมีผู้บริโภคเป็นผู้ไวต่อรสขมแล้ว โรงงานอุตสาหกรรมจะต้องพยายามลดปริมาณลิโมนินให้น้อยที่สุด

ค่า Threshold ของลิโมนินในน้ำส้ม ขึ้นกับปริมาณกรดและปริมาณน้ำตาลของน้ำผลไม้ และ pH แต่ในรัฐ Florida มีการกำหนดไว้ว่า frozen concentrated grapefruit juice เกรด A จะต้องมีปริมาณลิโมนินน้อยกว่า 5 ppm ส่วนเกรด B จะต้องมีปริมาณลิโมนินน้อยกว่า 7 ppm

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบระดับความขมของน้ำส้ม[a] ที่มีปริมาณลิโมนินต่าง ๆ กัน

Limonin Threshold (ppm.)	Cumulative % of Panel
0.5	8
1.0	17
2.0	30
3.0	49
4.0	62
5.0	70
6.0	75
10.0	91
32.0	99.5

a = pH 3.8, B/A 14.8

ที่มา : Maier และคณะ (1977)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

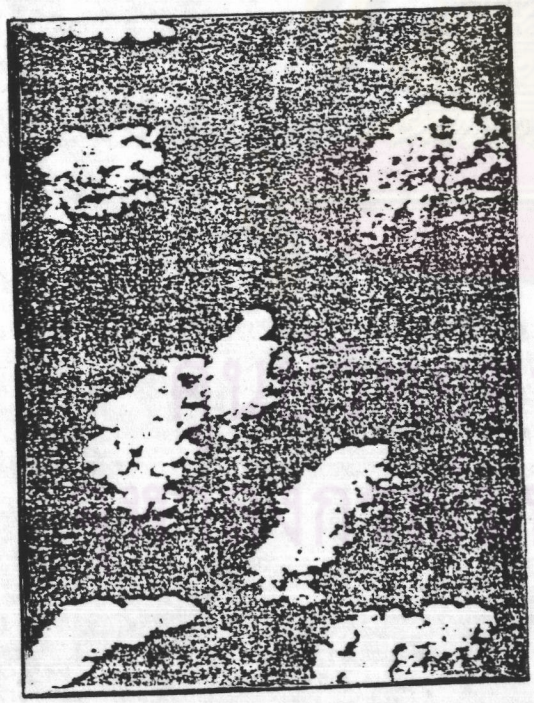
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>วิธีการกำจัดหรือลดความขมจากลิโมนินในน้ำผลไม้ตระกูลส้ม</u> (Bruemmer, 1980 และ Maier และคณะ, 1977)

1. การตกตะกอน เป็นการทำให้ลิโมนินเกิดการตกตะกอนแล้วจึงแยกเอาตะกอนลิโมนินออกไป Chandler กล่าวว่า การลดปริมาณเพคตินในน้ำผลไม้จะทำให้ลิโมนินตกตะกอนได้ วิธีนี้ทำโดยการเติมพวก pectic enzymes ซึ่งย่อยเพคติน เมื่อเพคตินถูกย่อย การละลายของลิโมนินจะลดลง ทำให้ลิโมนินตกตะกอนได้ (มีผลในลักษณะที่ว่า ลิโมนินจะถูกเปลี่ยนรูปจาก colloidal phase ไปเป็น insoluble phase ทำให้การละลายลดลง)

จากการศึกษาผลของน้ำตาลและ pectin ต่อการละลายของลิโมนินพบว่า น้ำตาลหรือ pectin ตัวใดตัวหนึ่ง หรือส่วนผสมทั้ง 2 ตัวจะช่วยเพิ่มการละลายของลิโมนินในน้ำร้อน (Chandler, 1971)

จากการทดลองผลของอุณหภูมิต่อการละลายของลิโมนินในช่วง 0-100 °C พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิการละลายของลิโมนินจะเพิ่มขึ้นด้วย (Chandler et al., 1983)



<u>รูปที่ 7</u> ผลึกของ ลิโมนินที่ตกตะกอนใน Navel Orange Juice ระหว่างการเก็บเป็นเวลานาน (Prolonged storage)
ที่มา : Chandler B.V., 1971

2. การใช้สารดูดซับ (Adsorption) เป็นการใช้สารที่เป็นของแข็งหรือพวก gel บางชนิด ซึ่งสามารถดูดซับลิโมนินออกจากน้ำผลไม้ได้ ได้แก่

2.1 Activated carbon สารนี้จะดูดซับลิโมนินและสารตั้งต้นของลิโมนินออกได้ วิธีนี้มีข้อดีที่ว่าไม่สูญเสียรสชาติ แต่มีข้อเสียตรงที่ว่าสีของน้ำผลไม้จะเปลี่ยนแปลงไป และมีการสูญเสียของ sulfhydryl compound นอกจากนี้สารคาร์บอนยังเข้าไปปะปนกับน้ำผลไม้ (Mc Colloch, 1950)

2.2 พวก cellulose ester ได้แก่ cellulose acetate, cellulose triacetate, cellulose acetate butyrate อาจอยู่ในรูป gel หรือ powder form มีวิธีการดังนี้คือ จะต้องแยกส่วนขุ่น (cloud) ออกจากส่วนใส (serum) นำส่วนใสไป treat ด้วยสารดังกล่าวข้างต้น แล้วกรองสารเหล่านี้ออกไป นำส่วนใสที่ผ่านการ treat แล้วไปผสมกับ cloud ตอนเริ่มต้น การใช้สารนี้มีข้อดีกว่าการใช้ polyamide คือการสูญเสีย ascorbic acid จะมีน้อย แต่อาจมีองค์ประกอบของน้ำผลไม้บางตัวถูกดูดซับไปในระหว่างการดูดซับลิโมนินด้วย (Chandler and Johnson, 1974)

ในปี 1977 ได้ทดลองใช้ cellulose ester กำจัดลิโมนินในน้ำผลไม้ตระกูลส้ม อาจใช้ในรูป gel หรือ powder โดยไม่มีการเติมเอนไซม์เพื่อกำจัดลิโมนินก่อนหรือหลังบรรจุในภาชนะ (Chandler et al., 1977) ต่อมามีการใช้ cellulose acetate แบบ flake หรือแบบ powder โดยใช้แบบ powder 10 กรัม/น้ำผลไม้ 1 ลิตร จะกำจัดลิโมนินได้ 44-70% ในเวลาน้อยกว่า 1 ชั่วโมง ส่วนแบบ flake ก็ทำได้ในทำนองเดียวกัน โดยการเติม cellulose acetate ลงไปแล้วกวนให้สัมผัสกับน้ำผลไม้

การกำจัดความขมโดยใช้ cellulose acetate แบบ powder นี้ ต้องมีการแยกเอาส่วนใสของน้ำผลไม้มากำจัดความขมก่อน แล้วจึงนำไปรวมกับส่วนที่เป็น cloud เพื่อจะได้รับการยอมรับจากผู้บริโภค ฉะนั้นจึงได้มีการพัฒนา cellulose ester แบบ gel form โดยไม่ต้องมีกระบวนการเซนตริฟิวจ์น้ำผลไม้ก่อน ซึ่งประสพความสำเร็จในการกำจัดความขมโดยวิธีดังนี้คือ นำน้ำผลไม้ใส่ลงในภาชนะที่พื้นผิวรองด้วย ester แบบ gel, หรือทำแบบ batch แล้วมีเครื่องกวนและบรรจุ gel ที่เป็นลูกบาศก์หรือทรงกลม และแบบที่นำ gel ไปบรรจุในคอลัมน์แล้วผ่านน้ำผลไม้ลงคอลัมน์ สารตัวนี้สามารถ regenerated ได้ง่าย โดยล้างด้วยน้ำธรรมดา และมีราคาถูก (Chandler และ Johnson, 1979)

ในปี 1981 ได้อธิบายถึงการศึกษาการกำจัดลิโมนินออกจาก navel orange juice โดยใช้คอลัมน์ของ cellulose acetate gel beads ซึ่ง beads นี้สามารถทำได้ง่ายและมีขนาดพอที่จะให้น้ำผลไม้ทั้งหมดผ่านไปได้ และคอลัมน์นี้สามารถ reactivated ด้วยน้ำธรรมดา ซึ่งสะดวกมาก (Johnson et al., 1981) ต่อมาพบว่าการใช้ cellulose acetate gel beads ทางการค้าในการกำจัดลิโมนินอาจเกิดการ load ของ organic acid มากไป จึงไม่สามารถใช้น้ำธรรมดาในการ reactivated ต้องใช้น้ำอุ่นไป recycle ฉะนั้นจะเห็นว่านอกจากลิโมนินยังมีสารประกอบตัวอื่นถูกดูดซับ ทำให้ beads สูญเสียแอคติวิตี

ในปี 1983 ได้ศึกษาผลของ cellulose acetate gel beads column ต่อการยอมรับ และองค์ประกอบของน้ำส้ม การลดปริมาณลิโมนินในน้ำส้มที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์แล้ว โดยใช้ cellulose acetate gel beads column ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าสามารถลดรสขม รวมทั้งเพิ่มรสชาติ และการยอมรับด้วย การลดความขมโดยวิธีนี้จะมีผลน้อย เมื่อใช้น้ำผลไม้สดที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ และแช่เย็น ผ่านคอลัมน์เพียงครั้งเดียวจะสามารถกำจัดลิโมนินได้ 55% และสูญเสีย ascorbic acid น้อยกว่า 5%

2.3 พวก Resin ได้แก่

2.3.1 พวก Polyamide หรือ Polyvinylphyrrolidone resin powder ใช้กำจัดความขมใน grapefruit juice แต่ยังไม่มีตัวอย่างการทำใน navel orange juice (Griffiths, 1969) ต่อมามีรายงานการใช้ polyamide กับน้ำส้มที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์แล้ว โดยเติม polyamide adsorbent ลงในน้ำส้ม กวนเป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงเซ็นตริฟิวส์เอา adsorbent นี้ออก ถ้าต้องการให้ประสิทธิภาพในการลดความขมมีมากขึ้นก็ต้อง treat ด้วย polyamide 2 ครั้ง แต่มีข้อเสียคือ ascorbic acid จะลดลงไปเป็นจำนวนถึง 30% จึงเป็นอุปสรรคในทางการค้า (Chandler et al., 1968) ในปี 1982 ก็ได้มีการทดลองใช้ Polyvinylpyrrolidone (PVP) กำจัดนารินจินและลิโมนินใน grapefruit juice พบว่ากำจัดได้ 78.1% และ 17.5% ตามลำดับ ซึ่งปริมาณที่กำจัดได้นี้ขึ้นกับปริมาณของ adsorbent และระยะเวลาที่น้ำผลไม้สัมผัสกับ adsorbent การทดลองนี้จะดีขึ้นกว่าเดิมคือเปอร์เซ็นต์การสูญเสียของ ascorbic acid จะน้อยลงกว่าการทดลองแรก คือสูญเสียไปประมาณ 23.1% โดยใช้ PVP 5% และเวลาในการทำปฏิกิริยา 1 ชั่วโมง (Nisperos et al., 1982)

2.3.2 β-cyclodextrin ใช้ลดความขมในน้ำส้มที่ผ่านการกรองด้วย PVDC cloth และเติม 8% ซูโครส ตามด้วยกระบวนการให้ความร้อน แล้วจึงเติม β-cyclodextrin 0.3% w/w ซึ่งได้รับความสนใจจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้ตระกูลส้มมาก (Konno, 1981)

ในปี 1983 มีการใช้ β-cyclodextrin polymer กำจัดลิโมนิน และนารินจินในน้ำส้ม และ grapefruit juice ซึ่งทำแบบ batch และแบบ continuous flow column และมีข้อดีคือ ปริมาณของ ascorbic acid จะไม่เปลี่ยนแปลง และสามารถใช้ organic solvent ในการ regenerated polymer ได้ (Shaw et al., 1983) ต่อมาได้ศึกษาถึงกลไกของปฏิกิริยาระหว่าง β-cyclodextrin กับลิโมนินและนารินจิน อธิบายถึงการละลายของสารที่ให้รสขมและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจาก proton shiff ภายใน β-cyclodextrin และพบว่าเมื่อใช้ β-cyclodextrin 0.5% จะสามารถลดความขมของลิโมนินหรือนารินจินได้ 50% เมื่อเติม β-cyclodextrin จะทำให้การละลายของลิโมนินและนารินจินสูงขึ้น และการที่ความขมลดลงได้เนื่องจาก β-cyclodextrin ไป from complex กับลิโมนินและนารินจิน (Konno et al., 1983)

ในปี 1984 มีการปรับปรุงรสชาติของ navel orange juice และ grapefruit juice โดยใช้ β-cyclodextrin polymer 1 กรัม/น้ำผลไม้ 50 มล. ทำแบบ batch และแบบ continuous พบว่าสามารถกำจัดลิโมนิน, โนมิลิน และนารินจินใน grapefruit juice และลิโมนินและโนมิลินในน้ำส้มได้ 50% โพลิเมอร์นี้สามารถ regenerated ด้วยสารละลายด่างเจือจาง หรือเอทธานอล ข้อดีของวิธีนี้คือ จะไม่มีผลต่อ soluble solids, total acid หรือ ascorbic acid และลดปริมาณน้ำมันได้ประมาณ 40% และพบอีกว่า α-cyclodextrin ก็มีประสิทธิภาพในการกำจัดความขมได้เช่นเดียวกัน (Shaw et al., 1984)

2.3.3 Amberlite XAD-7 : สารดูดซับตัวนี้จะสามารถกำจัดนารินจินได้ 63% ลิโมนิน 85% และ titratable acid 3% ใน grapefruit juice เมื่อใช้ตัวดูดซับ 20 กรัม/น้ำผลไม้ 1 ลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตัวดูดซับนี้สามารถ reactivated ได้ง่ายและประหยัด (Johnson และ Chandler, 1982)

2.3.4 Duolite S 861, Duolite S 866, Duolite A 378 etc.

2.4 Florisil (activated magnesium silicate) : ข้อดีของสารตัวนี้คือ จะไม่มีผลต่อปริมาณ ascorbic acid และ total soluble solid จากการทดลองพบว่าจะมีความแตกต่างระหว่างน้ำผลไม้ที่ treat ด้วย Florisil กับที่ไม่ได้ treat ด้วย Florisil โดยผู้ทดสอบจะชอบน้ำผลไม้ที่ผ่านการ treat ด้วย Florisil มากกว่า (Barmore, 1986)

3. Ion exchange (Johnson et al., 1985)

4. การใช้ supercritical carbon dioxide : การใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในการกำจัดลิโมนิน โดยใช้ความดันอยู่ในช่วง 3,000-6,000 psi. และอุณหภูมิระหว่าง 30-60 °C ซึ่งสามารถลดปริมาณลิโมนินได้ 25% จากการทดลองให้ run เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดปริมาณลิโมนินจาก 17.5 ppm. ไปเป็น 7 ppm. โดยไม่มีผลต่อปริมาณ ascorbic acid, titratable acidity, citic acid และ total amino acids ข้อเสียของวิธีนี้คือเครื่องมือที่ใช้สำหรับทนความดันสูง ๆ เช่นนี้มีราคาแพง (Kimball, D.A., 1987)

5. การใช้สารเคมี : ลดการสะสมของ limonoate A-ring lactone ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของลิโมนิน สารเคมีที่ใช้ เช่น triethylamine derivatives ซึ่งจะยับยั้งการสังเคราะห์ลิโมนอยด์ สารเคมีตัวนี้ควรใช้ตอนต้นของการปลูกต้นไม้ (Hasegawa et al., 1979)

6. การใช้สารบดบังความขม (Addition of Bitterness Modulators) (Bruemmer, 1980 และ Maier และคณะ, 1977)

เป็นการลดความขมโดยใช้สารบางชนิดมาบดบังความขม ได้แก่ sweeteners ที่มีตามธรรมชาติและที่สังเคราะห์ขึ้น เช่น sucrose, neohesperidin dehydrochalcone (NHD), hesperetin dihydrochalcone glucoside (HDG) และ aspartylphenylalanine methyl ester (AP) และ citric acid ดูขนาดการยอมรับของผู้บริโภคจากอัตราส่วน Brix/acid

มีสารบดบังความขมบางตัวที่ไม่มีรสชาติในตัวมันเอง เช่น Neodiosmin (NEO) อย่างไรก็ตาม สารตัวนี้จะไม่สามารถแก้รสขมได้อย่างแท้จริง แต่จะช่วยกำจัดรสขมของนารินจินใน grapefruit juice ได้ดี (Guadagni et al., 1976)

สารที่ไม่มีรสชาติที่ช่วยบดบังความขมตัวอื่น เช่น Rhoifolin เป็นต้น

7. การใช้เอนไซม์ : การกำจัดความขมโดยการใช้เอนไซม์มี 2 แบบคือ

7.1 Primary method : เป็นการใช้เอนไซม์สัมผัสหรือทำปฏิกิริยาโดยตรงกับ limonoic acid A-ring lactone หรือลิโมนิน แล้วเปลี่ยนเป็นสารที่เสถียรและไม่มีรสขม ตัวอย่างเช่น

- จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เพื่อช่วยกำจัดความขม เช่น เอนไซม์ Limonoate dehydrogenase ได้แก่

: Arthrobacter globiformis (Hasegawa et al., 1972B)

: Pseudomonas 321-18 (Hasegawa et al., 1972A)

: Bacterium 342-152-1 (Hasegawa et al., 1974B) เป็นต้น

- เอนไซม์จากส่วนที่เป็นเปลือกสีขาว (albedo) ของผลไม้ตระกูลส้ม ได้ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสม และเทคนิคในการสกัดเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายสารตั้งต้นของลิโมนินจาก albedo ของส้ม แล้วนำมาทดสอบพบว่า เอนไซม์ที่ได้ไม่มีความเสถียร และมีแอคติวิตีต่ำ การทดลองนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น ซึ่งควรมีการศึกษาวิธีการแยกและกระบวนการ assay ต่อไป (Nicol et al., 1979)

7.2 Secondary method : เป็นวิธีการที่ให้เอนไซม์สัมผัสกับองค์ประกอบในน้ำผลไม้ แล้วทำให้คุณสมบัติทางกายภาพเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งในที่สุดจะเป็นการนำเอาลิโมนินออกไป โดยวิธีทางฟิสิกส์ เช่น การกรอง ตัวอย่างเช่น การใช้เอนไซม์ในการย่อยแพคติน ทำให้สายเพคตินสั้นลง มีผลทำให้ลิโมนินสูญเสีย colloidal properties ลิโมนินจึงตกตะกอน

ได้มีการทดลองใช้ pectic enzyme ในการรักษาความขุ่นในน้ำผลไม้ไว้ และช่วยลดปริมาณลิโมนินในน้ำผลไม้ลง pectic enzyme ที่ใช้ 2 ตัวเป็น enzyme complex ได้แก่ Irgazyme M10 และ Ultrazyme 100 พบว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ตัวนี้ไม่สามารถทำให้ความขุ่นมีเสถียรภาพเพิ่มขึ้นหรือลดปริมาณลิโมนินตามที่คาดไว้ เนื่องจากปัจจัยที่ควบคุมการละลายของลิโมนินในน้ำส้มค่อนข้างยุ่งยากมากกว่าที่เคยคิดไว้ และยังมีปฏิกิริยาเคมีอื่น ๆ เกี่ยวข้องนอกจากปฏิกิริยาการเปลี่ยนจากสารตั้งต้นที่ไม่ขม ไปเป็นลิโมนิน (Chandler et al., 1983)

8. การใช้เทคนิคการตรึงเซลของแบคทีเรีย : เป็นวิธีการลดความขมโดยกระบวนการทางชีวภาพ โดยใช้เซลของแบคทีเรียในลักษณะ solid catalyst ซึ่งวิธีนี้ไม่ต้องมีกระบวนการสกัดและกระบวนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ การตรึงเซลแบคทีเรียนี้มีหลายวิธี แต่ละวิธีมีความเหมาะสมแตกต่างกันไป ในการพิจารณานั้นควรคำนึงถึงเสถียรภาพและประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์หรือเซลของจุลินทรีย์ในการกำจัดลิโมนินหรือลดความขมในน้ำผลไม้ตระกูลส้ม

ได้มีการศึกษา limonoid degrading microorganism จากดิน (Hasegawa et al., 1972A) ต่อมาได้มีการแยกแบคทีเรียชื่อ Arthrobactor globiformis ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ Limonoate dehydrogenase (Limonoate oxidoreductase : NAD) เอนไซม์ตัวนี้จัดอยู่ในกลุ่ม oxidoreductase ช่วยเร่งปฏิกิริยาการถ่ายทอดอิเลคตรอน ต้องการ sulfhydryl groups และ Zn^{2+} ions สำหรับปฏิกิริยาการเร่ง มันจะเข้าทำปฏิกิริยาเฉพาะลิโมนอยด์ที่ประกอบด้วย furan ring, epoxide gr. และ open D-ring เท่านั้น เอนไซม์ตัวนี้จะทำปฏิกิริยากับ limonin, nomilin และ obacunone ที่มีโครงสร้างแบบ D-ring open คือมันสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นของลิโมนินคือ Limonoate หรือ Limonoate A-ring lactone ไปเป็น 17-Dehydrolimonoate หรือ 17-Dehydrolimonoate A-ring lactone ซึ่งเป็นสารที่ไม่ขม (Hasegawa et al., 1972B)

ต่อมาในปี 1974 ได้มีการแยกเอนไซม์ Limonoate dehydrogenase จาก Pseudomonas (Limonoate oxidoreductase : NAD[P]) (Hasegawa et al., 1974)

Limonoate dehydrogenase จาก A. globiformis (Hasegawa et al., 1972)

1. หาแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยการวัดการดูดกลืนแสง ซึ่งติดตามปฏิกิริยาได้โดยวัดปริมาณ NADH ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

เอนไซม์ตัวนี้จะออกซิไดซ์หมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตัวที่ 17 ของ Limonoate A-ring lactone เป็น 17-dehydro compound โดยที่ 1 unit ของ LD หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาให้เกิดผลิตภัณฑ์ (17-DLARL) 1 µmol ในเวลา 1 นาที เอนไซม์ตัวนี้มี NAD เป็นโคเอนไซม์ หรือเป็นตัวรับไฮโดรเจน ถ้าใช้ NADP แทน NAD จะไม่พบ activity

2. ศึกษาผลของ pH พบว่า optimum pH สำหรับแอคติวิตีอยู่ที่ pH 9.5

3. ศึกษาผลของแคทไอออน โดยให้หลอด control (หลอดที่ไม่มีการเติมไอออน) มีแอคติวิตี เป็น 100 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลของ Diavalent cation ต่อเอนไซม์ลิโมโนเอท ดีไฮโดรจีเนส

Ions	Concentrations (M)	Relative activity
Control	-	100
$CaCl_2$	10^{-3}	105
$Mgcl_2$	10^{-3}	100
$MnCl_2$	10^{-3}	95
$ZnCl_2$	10^{-3}	144
EDTA	10^{-3}	100

- Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Mn^{2+} อิออนไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์
- Zn^{2+} อิออนจะช่วยเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์
- ปกติ EDTA ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ แต่ถ้ามันเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับ Zn^{2+} อิออน มันก็จะยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้

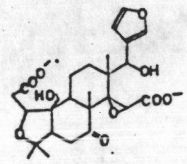
4. ศึกษาผลของตัวยับยั้ง : ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลของตัวยับยั้งต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ลิโมโนเอท ดีไฮโดรจีเนส

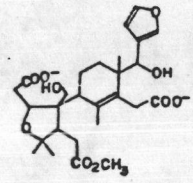
Inhibitors	Concentration	Inhibition (%)
$HgCl_2$	10^{-4} M	68
	10^{-3} M	100
PCMB	10^{-3} M	59
NaN_3	10^{-3} M	44

- $HgCl_2$ และ PCMB (p-chloromercuribenzoate) เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์อย่างรุนแรง
- NaN_3 ก็สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้

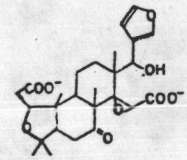
5. ศึกษาความจำเพาะของสับสเตรทต่อเอนไซม์ โดยกำหนดให้ lomonoate มีแอคติวิตี เป็น 100 เปรียบเทียบกับตัวอื่น



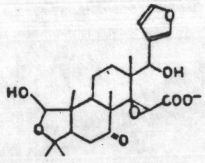
A



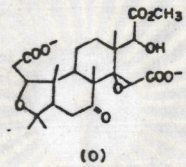
B



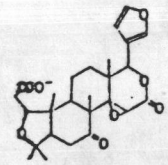
C



D



E



F

<u>รูปที่ 8</u> โครงสร้างของสับสเตรทต่าง ๆ ที่เข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ลิโมโนเอท คีไฮโดรจีเนส โดยเปรียบเทียบแอคติวิตีกับ lominoate

- ลักษณะโครงสร้างของสับสเตรทที่เอนไซม์ไม่สามารถเข้าไปเร่งปฏิกิริยาได้คือ สับสเตรท (B) Deoxylimonic acid และ (E) Etioisoobacunoic acid

- สับสเตรทที่เอนไซม์สามารถเข้าไปเร่งปฏิกิริยาได้เร็วกว่า limonoate (A) คือ สับสเตรท Isoobacunoic acid (C) และ Compound (D)

- ลักษณะโครงสร้างของสับสเตรท D-ring closed isoobacunoic acid (F) นี้ ส่วนที่เป็น D-ring จะปิดเอนไซม์ก็สามารถเข้าไปเร่งปฏิกิริยาได้ แต่อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะน้อยกว่า 5% ของเมื่อ D-ring เปิดอยู่

- จากลักษณะโครงสร้างของสับสเตรท (C) และ (D) การเปลี่ยนโครงสร้างรอบ A-ring ในโมเลกุลของลิโมนอยด์ จะทำให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาได้เร็วขึ้น แต่ในทางตรงกันข้าม การย้ายหมู่ epoxide ของสับสเตรท (B) หรือ furan-ring ของสับสเตรท (E) จะทำให้เกิดสารประกอบที่ต่อต้านการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์

- ลักษณะของสับสเตรทที่เหมาะสำหรับเอนไซม์ชนิดนี้ในการเข้าทำปฏิกิริยาคือ สารลิโมนอยด์ ที่มี furan ring, epoxide และ D-ring ที่เปิด

- เอนไซม์ LD นี้ต้องการ Zn^{2+} อิออน และ sulfhydryl group ในการเข้าทำ

ปฏิกิริยากับสับสเตรท

ต่อมาในปี 1974 ได้มีการแยกเอนไซม์ LD จาก Pseudomonas (Limonoate oxidoreductase : NAD[P]) (Haseganwa et al., 1974) dehydrogenase ตัวนี้ต่างจาก LD ที่ได้จาก A. globiformis

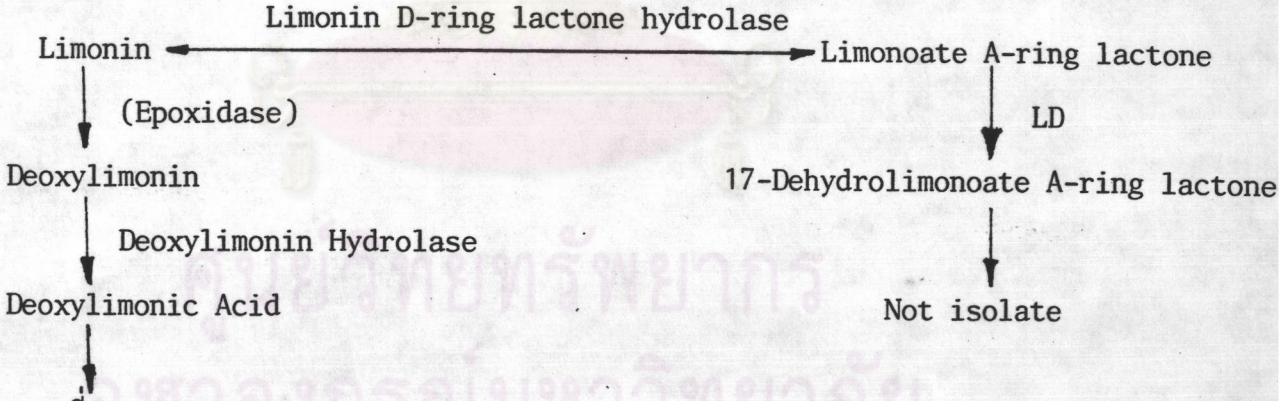
1. LD ของ A. globiformis ใช้ NAD เป็น cotactor ได้ตัวเดียว ส่วน LD ของ Pseudomonas ใช้ได้ทั้ง NAD และ NADP

2. LD ของ A. globiformis จะมี affinity กับ DEAE cellulose บนคอลัมน์มากกว่า

3. LD ของ Pseudomonas จะมี activity ในช่วง pH กว้างกว่า

4. LD ของ Pseudomonas จะมีความเสถียรที่ pH ต่ำกว่า ในช่วง pH ที่ต่ำยังพบ activity อยู่ ซึ่งในช่วง pH ที่ต่ำนี้จะไม่พบ activity ของ LD จาก A. globiformis

ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า LD ของ Pseudomonas sp. 321-18 มีประสิทธิภาพมากกว่า LD ของ A. globiformis ในการป้องกันความขมจากลิโมนินในน้ำผลไม้ตระกูลส้ม (Brewster et al., 1976)

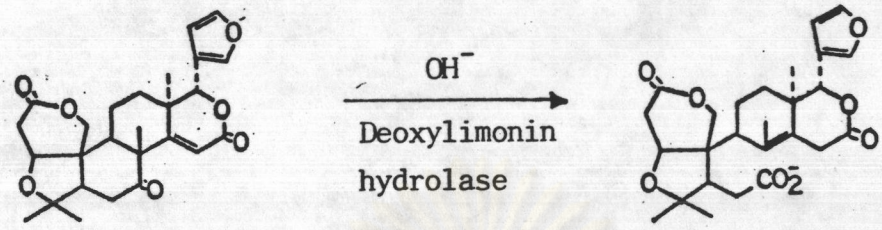


รูปที่ 9 Metabolic Pathways of Limonoid in Bacteria (Pseudomonas sp. 321-18)

ที่มา : Maier และคณะ (1977)

เอนไซม์ Limonin epoxidase ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิด deoxylimonin ยังไม่มีการแยกจาก Pseudomonas sp. 321-18 (Hasegawa and Bennett, 1975) แต่มีการแยก Deoxylimonin hydrolase ออกมา (Hasegawa et al., 1974B) hydrolase ตัวนี้จะ

เร่งปฏิกิริยาต่างจาก hydrolase ตัวอื่น คือ C-C bond ของ B-ring จะถูก cleaved และ double bond ของ D-ring จะถูก shifted ไปที่ C-ring ดังรูป



Deoxylimonin Deoxylimonic acid

เอนไซม์ Deoxylimonin hydrolase จะถูกยับยั้งโดย p-chloromercuribenzoate และ $HgCl_2$ และมันจะไม่ attack deoxylimonin ถ้า D-ring เปิดอยู่ เอนไซม์อีกตัวที่ได้จาก Pseudomonas sp. 321-18 คือ limonin D-ring lactone hydrolase ซึ่งมันสามารถเร่งปฏิกิริยาแบบผันกลับได้

จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ที่สกัดได้จาก Pseudomonas sp. 321-18 มักจะ metabolized ลิโมนิน ไป pathway ทาง deoxylimonin มากกว่าไปทาง 17-dehydro-limonoate A-ring lactone ซึ่งเกิดใน A. globiformis มากกว่า

การทำลายทางชีวภาพ (biodegradation) ของสารลิโมนอยด์ โดยรา (molds) ยังไม่ค่อยเข้าใจกันนัก และมีรายงานว่า พบ limonoid-degrading enzymes ในรา เช่น Aspergillus niger และ Penicillium มี activity และยังไม่มีการกล่าวถึง metabolite ที่ได้ (Misawa et al., 1972) ต่อมาก็ได้มีการใช้ enzyme-rich medium ที่เตรียมโดยใช้ Aspergillus หรือ Penicillium spp. ในการกำจัดความขมในน้ำผลไม้และน้ำผัก (Sodial, 1980) และมีการใช้เอนไซม์ในการกำจัดความขมในน้ำผลไม้ตระกูลส้มจาก Trichoderma หรือ Aspergillus อีกด้วย (Toy Seikan KK, 1982) และในปี 1985 ได้มีการทำ Screening ของจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา เพื่อจะได้ limonoid-degrading enzymes ในการกำจัดความขมในน้ำผลไม้ตระกูลส้ม (Hashinaga et al., 1984) อีกด้วย

ได้มีผู้ทำรายงานเกี่ยวกับวิธีการกำจัดความขมใน navel orange juice ซึ่งพัฒนาโดย Hasagawa โดยใช้เทคนิคการตรึงเอนไซม์ ได้ใช้เอนไซม์ที่สกัดได้จาก A. globiformis มา bound กับ resin เพื่อใช้ในการเปลี่ยนลิโมนินไปเป็น lactone และจาก lactone เปลี่ยนเป็นสารประกอบที่ stable และไม่ขมใน navel orange juice เอนไซม์ที่เตรียมได้โดยวิธีนี้จะเสถียรเพียงพอ โดยไม่มีการสูญเสียประสิทธิภาพ (Anon, 1981)

เอนไซม์ที่ผลิตจาก A. globiformis สามารถ metabolized ลิโมนิน โดยกระบวนการ 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกจะเปลี่ยนจากลิโมนินไปเป็น limonoate A-ring lactone โดยใช้เอนไซม์ limonin A-ring lactone hydrolase จากนั้นจึงใช้เอนไซม์ตัวที่ 2 คือ limonoate dehydrogenase เปลี่ยน lactone เป็นสารประกอบที่เสถียร และไม่ขม เอนไซม์ทั้ง 2 ตัวนี้ถูกแยกออกมาและทำให้บริสุทธิ์ แต่การกำจัดความขมจะใช้เทคนิคการ immobilized cell ของแบคทีเรีย แทนการใช้เอนไซม์ และการ encapsulated organism จะ stable มากกว่าการใช้เอนไซม์ ประสิทธิภาพในการกำจัดความขมจะเพิ่มขึ้นประมาณ 33-50% (Anon, 1982)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การลดความขุ่นหรือการกำจัดลิโมนินในน้ำผลไม้ตระกูลส้มโดยใช้จุลินทรีย์ตรึงรูป (Chibata และ Wingard, 1983)

ทั้ง ๆ ที่เอนไซม์นี้สามารถผลิตได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แต่เอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมคือเอนไซม์จากจุลินทรีย์ ซึ่งมีเหตุผลดังนี้คือ

1. ค่าใช้จ่ายในการผลิตต่ำ
2. สภาวะที่ใช้ในการผลิตไม่ถูกจำกัดโดยสถานที่ตั้งและฤดูกาล
3. เวลาที่ใช้ในการผลิตสั้น
4. สามารถผลิตเป็นปริมาณมากในอุตสาหกรรมได้

เอนไซม์จากจุลินทรีย์สามารถแยกได้เป็น 2 กลุ่มคือ

ก. extracellular enzymes

ข. intracellular enzymes

การใช้ intracellular enzymes นี้จำเป็นจะต้องมีกระบวนการสกัดจากเซลของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ที่สกัดได้นี้มักจะไม่ค่อยเสถียร และไม่นิยมนำมาทำเป็น immobilized enzymes การที่จะพยายามกำจัดขั้นตอนการสกัดเอนไซม์จากจุลินทรีย์ และเพื่อที่จะสามารถใช้ระบบที่ใช้เอนไซม์หลายตัวในปฏิกิริยา ซึ่งทำได้โดยการ immobilized เซลของจุลินทรีย์โดยตรง อุตสาหกรรมแรกที่ใช้เทคนิคการ immobilized cell คืออุตสาหกรรมการผลิต L-aspartic acid

เซลล์ของจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการ immobilized สามารถใช้ได้ทั้ง 3 ชนิดคือ เซลล์ที่กำลังเจริญเติบโต เซลล์ที่กำลังพักตัวอยู่และเซลล์ที่ตายแล้ว แต่แอคติวิตีของเอนไซม์ต้องอยู่ในสภาพที่แอคทีฟ ข้อกำหนดของการใช้วิธีการ immobilized cell คือ

1. ต้องเป็นจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แบบ intracellular
2. เอนไซม์ที่สกัดได้จากเซลไม่เสถียรในระหว่างและหลังจากการทำ immobilization
3. จุลินทรีย์จะต้องไม่มีเอนไซม์ตัวที่เราไม่ต้องการมารบกวน หรือเอนไซม์ที่จะมารบกวนระบบสามารถ inactivated หรือกำจัดออกได้ง่าย
4. สับสเตรทและผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่ควรเป็นสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

ข้อดีของการใช้วิธีการ immobilized cell คือ

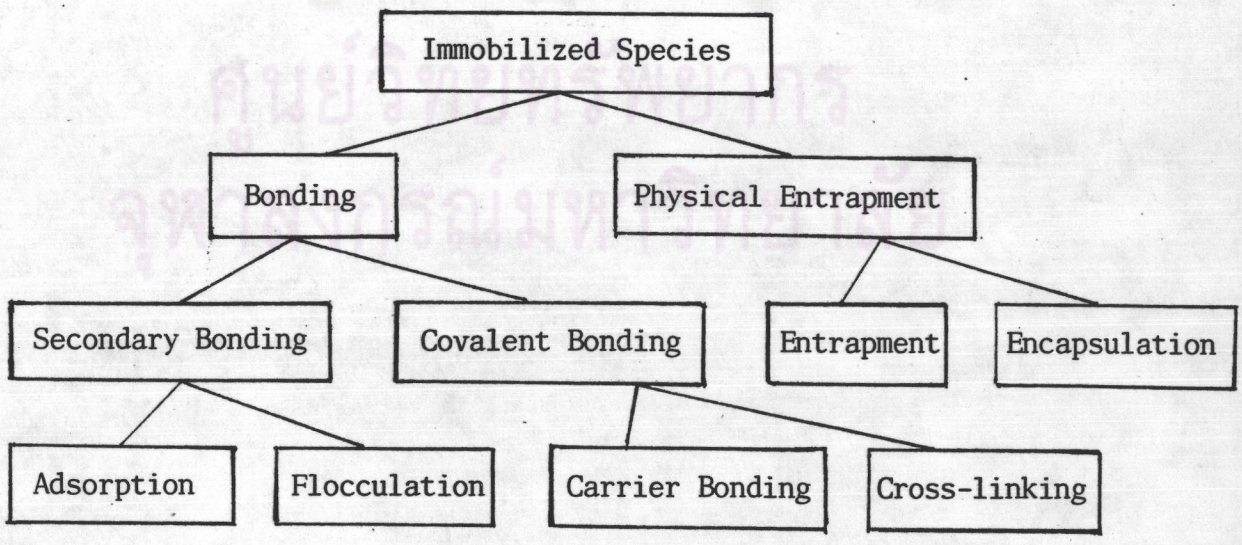
1. ไม่จำเป็นต้องมีกระบวนการสกัดและหรือกระบวนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์
2. Yield ของเอนไซม์แอคติวิตีจากการ immobilization มีค่าสูง
3. ความเสถียรในระหว่างการดำเนินการในกระบวนการมีค่าสูง
4. ค่าใช้จ่ายของการใช้เอนไซม์ต่ำ
5. สามารถนำไปใช้ในปฏิกิริยาที่ต้องใช้เอนไซม์หลายตัวในระบบได้

ปัญหาหนึ่งที่เกิดจากการใช้ระบบการ immobilized เซลล์จุลินทรีย์คือการเกิดการปนเปื้อนโดยแบคทีเรีย

วิธีที่ใช้ในการทำตรึงรูป (Methods of immobilization)

1. Physical cross-linking (flocculation)
2. Covalent cross-linking
3. Adsorption on insoluble matrices
4. Covalent binding to insoluble matrices
5. Physical entrapment in porous materials
6. Encapsulation

จากวิธีข้างต้นนี้สามารถเขียนได้เป็นแผนภาพดังนี้คือ



รูปที่ 10 การแบ่งวิธีการ immobilized cell โดยแบ่งตามชนิดและพันธะที่อยู่บน catalyst particle

จากแผนภาพนี้เราสามารถแบ่งวิธีเหล่านี้ได้ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

1. Carrier-free immobilization
2. Immobilization of a given biomass onto a preformed carrier
3. Immobilizaiton of a given biomass in the course of carrier preparation
4. Immobilization by growth of immobilized cell

1. Carrier-free immobilization วิธีนี้ไม่ต้องอาศัยตัวพยุง แต่เซลล์ของจุลินทรีย์เกิดการดูดซับ หรือเกิด covalent cross-linking ระหว่างกัน กระบวนการดูดซับเช่น การเกิด flocculation หรือ pelletization การเกิด flocculation จะใช้สารพวก polymer เป็นตัวให้เซลล์เกาะ ถ้าใช้แบบ covalent cross-linking ต้องใช้สารพวก bivalent coupling reagent เช่น glutaraldehyde เป็นตัวเชื่อม

ข้อดีของวิธีนี้คือ จะมีความหนาแน่นของเซลล์สูงทำให้มีประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาสูง แต่มีข้อเสียความเสถียรทางด้าน mechanical ต่ำ เมื่ออยู่ภายใต้ความกดดันและแรงเฉือน และมีข้อจำกัดในการส่งผ่านของสารถ้าเซลล์มีความหนาแน่นมาก

2. Immobilization onto a Preformed Carrier : วิธีนี้ต้องมีการเตรียมตัวพยุงที่เป็นแบบ matrix (carrier matrix) แล้วใช้เทคนิคของการดูดซับตรึงเซลล์เข้าไปในตัวพยุง matrix นี้จะต้องมีรูใหญ่กว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของเซล การจะนำเซลล์ติดเข้าไปในตัวพยุงนี้ต้องใช้วิธีการดูดซับ หรือ covalent bonding โดยทั่วไปทำได้โดยการนำตัวพยุงที่มีรูพรุนนี้แช่ลงไปใน cell suspension เซลจะถูกบังคับให้เข้าไปในโครงสร้างของตัวพยุงโดยการพาของของเหลว

3. Immobilization in the Course of Carrier Preparation : เทคนิคนี้ประกอบด้วย 2 วิธีคือ

3.1 entrapment : เป็นวิธีรวมเอาเซลล์เข้าไปในตัวพยุง ไม่ต้องอาศัยพันธะทางเคมีเข้ามาช่วย ตัวพยุงต้องมีความพรุน และยอมให้สารซึมผ่านได้บ้าง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาได้

3.2 encapsulation : เป็นวิธีเอาเซลล์เข้าไปในตัวพยุงในลักษณะเป็น capsule ตัวพยุงควรมีสมบัติเช่นเดียวกับข้อ 3.1

4. Growth of Immobilized Cells within the Biocatalyst : วิธีนี้จะใช้เซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่และอยู่ในสภาพที่จะเพิ่มจำนวนได้ สามารถใช้ในระบบที่ต้องการเอนไซม์หลายตัวในปฏิกิริยา

การทดลองหรืองานวิจัยที่ใช้เทคนิคการ immobilized cell เพื่อใช้กำจัดความขมในน้ำผลไม้ตระกูลส้มมีดังนี้คือ

1. Acinetobactor sp. เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน และใช้ลิโมนินเป็น C-source ในการเจริญเติบโต การทดลองนี้ใช้เซลของแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตอยู่ entrapped เข้าไปใน dialysis sac อยู่ในลักษณะเป็น pellet ซึ่งสามารถกำจัดความขมโดยนำ dialysis sac นี้ transfer จาก batch หนึ่งไปสู่อีก batch หนึ่งของน้ำผลไม้ จากปฏิกิริยาสามารถแยก metabolite ซึ่งเป็นสารที่ไม่ขมได้ 2 ตัวคือ deoxylimonin และ deoxylimonic a acid โดยมี pathway ดังนี้

$$\text{Limonin} \longrightarrow \text{Deoxylimonin} \xrightarrow[\text{hydrolase}]{\text{Deoxylimonin}} \text{Deoxylimonic acid}$$

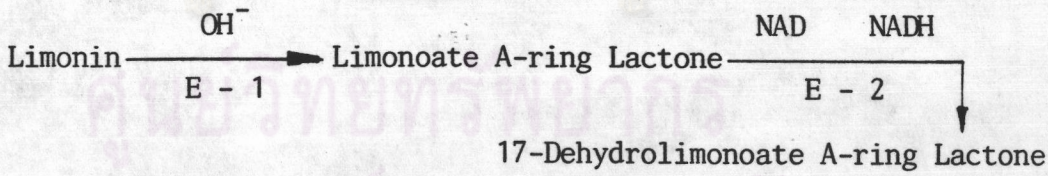
เอนไซม์ตัวแรกที่ใช้ในการเปลี่ยนลิโมนิน เป็น deoxylimonin ไม่สามารถแยกออกมาได้ และไม่พบแอคติวิตี้ใน culture medium (cell-free supernatant) หรือในส่วนที่สกัดได้จากเซล ซึ่งผลการทดลองนี้เหมือนกับที่ค้นพบโดย Hasegawa et al., (1974 A) ใน Pseudomonas ส่วนเอนไซม์ตัวที่ 2 คือ deoxylimonin hydrolase นี้สามารถแยกและทำให้บริสุทธิ์ได้เหมือนกับที่พบใน Pseudomonas โดย Hasegawa et al. (1974 A)

จากผลการทดลองใช้ entrapped bacteria in dialysis sacs ในการกำจัดลิโมนินในน้ำผลไม้พบว่า ถ้าใช้แบคทีเรีย 3 mg. ของน้ำหนักแห้ง entrapped ใน dialysis sac แล้วใส่ลงไปในน้ำผลไม้ที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ ที่ pH 4.5 และมีลิโมนิน 18 ppm. หลังจาก 2 ชั่วโมง ก็ใส่ dialysis sac อันเดิมนี้ลงในน้ำผลไม้ batch ต่อไป พบว่าสามารถใช้ dialysis sac ได้ถึง 5 ครั้ง ก่อนที่แอคติวิตีของมันจะตกลงมาอยู่ที่ 50% ของตอนเริ่มต้น ถ้าใช้เซลของแบคทีเรีย 120 mg. ของน้ำหนักแห้งนี้จะสามารถเปลี่ยนน้ำส้มที่มีรสขมปริมาณ 1 ลิตร เป็นน้ำส้มที่ไม่มีรสขม และสามารถดื่มได้ (ที่ pH 4.5, 18 ppm. ลิโมนิน)

ข้อดีของการใช้แบคทีเรียตัวนี้คือ สามารถกำจัดลิโมนินในน้ำผลไม้ซึ่งมีสภาพเป็นกรดได้ ซึ่งเดิมการใช้เอนไซม์ที่แยกได้จาก A. globiformis และ Pseudomonas ต้องทำให้น้ำผลไม้อยู่ในสภาพที่เป็นด่าง เพราะ optimum pH ของเอนไซม์ที่สกัดได้นี้มี pH ที่ 8.5-9.5 และคุณภาพของน้ำผลไม้ที่ผ่านการกำจัดความขมโดย Acinetobactor sp. นี้จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงในด้าน pH และรสชาติ การแยกเซลล์ของแบคทีเรียจากน้ำผลไม้ทำได้ง่าย กรณีที่ปฏิกิริยาเป็นแบบ batch ในกรณีที่ทำแบบระบบต่อเนื่องก็สามารถให้ผลดีในแง่ของอัตราการไหลหรือการเคลื่อนที่ (Vaks et al., 1981)

2. A. globiformis : เนื่องจากเอนไซม์พวก dehydrogenase มี optimum activity ที่ pH ค่อนข้างสูง ฉะนั้นจึงต้องมีการปรับ pH ของน้ำผลไม้ด้วย alkali ก่อนใช้เอนไซม์ ซึ่งยุ่งยากและต้องใช้เอนไซม์ปริมาณมากเพื่อกำจัดปริมาณลิโมนินให้มีค่าต่ำกว่าความขมที่สามารถทดสอบได้ ดังนั้นจึงได้มีการทดลอง immobilized cell ของ A. globiformis ใน acrylamide gel แล้ว packed ในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 ซม. โดยใช้ immobilized cells 1.6 กรัม เอนไซม์ที่ได้จากวิธีนี้จะมีความเสถียรมาก และมีประสิทธิภาพสูง สามารถลดปริมาณลิโมนิน 70% หรือมากกว่าในน้ำผลไม้ 30 มล. เมื่อน้ำผลไม้ผ่านคอลัมน์เพียงครั้งเดียว และลิโมนินจะถูก metabolized อย่างสมบูรณ์เมื่อผ่านคอลัมน์ครั้งที่ 2 คอลัมน์นี้สามารถใช้ได้ถึง 17 ครั้ง โดยยังไม่มีการสูญเสียประสิทธิภาพเลย

pathway ที่เกิดจากการทดลองโดยวิธีนี้คือ



E - 1 = Limonin D-ring lactone hydrolase

E - 2 = Limonoate dehydrogenase

จากผลการทดลองพบว่า เอนไซม์ที่ได้จากการ immobilized cells นี้สามารถทำงานได้ที่ pH ตามธรรมชาติของน้ำผลไม้ ไม่ต้องมีการปรับ pH ของน้ำผลไม้ และยังเสถียรด้วย นอกจากนี้น้ำผลไม้ที่ได้จากการลดความขมโดยวิธีนี้จะมีองค์ประกอบและคุณสมบัติเหมือนเดิม ดังแสดงในตารางที่ 9 (Hasegawa et al., 1982)

ตารางที่ 9 ผลการทดลองเปรียบเทียบองค์ประกอบของน้ำผลไม้ที่ผ่านคอลัมน์ที่ไม่มีเซลล์แบคทีเรียตรึงรูปกับคอลัมน์ที่มีเซลล์ของแบคทีเรียตรึงรูปของ A. globiformis

constituents and parameters[a]	control	treated
limonin, ppm.	22.0	4.0
total acids, mequiv/100 ml.	25.3	25.3
total soluble solids, g/100 ml.	10.7	10.7
total sugar, g/100 ml.	8.5	8.4
reducing sugars, g/100 ml.	5.2	5.1
nonreducing sugar, g/100 ml.	3.3	3.3
pH	3.6	3.6

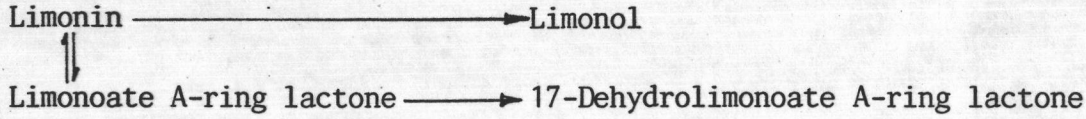
[a] 30 ml. of the serum was treated with a 1.5 cm. diameter column packed with 1.5 gm. of cells immobilized in gel (15-ml. bed volume). The control was treated with the same colume packed with acrylamide gel without bacterial cells.

3. A. globiformis II

ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการกำจัดความขมในน้ำผลไม้ตระกูลส้มโดยใช้วิธีการ immobilized cell ของแบคทีเรียเช่นการใช้ Acinetobactor sp. ลดปริมาณลิโมนิน โดยเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่ไม่ขมคือ deoxylimonin และ deoxylimonic acid, กระบวนการ immobilized cell ของA. globiformis ใน acrylamide gel เพื่อเปลี่ยนลิโมนินเป็นสารประกอบที่ไม่ขมคือ 17-Dehydrolimonoate A-ring Lactone ซึ่งทั้ง 2 กระบวนการนี้ต้องใช้เอนไซม์หลายตัวในปฏิกิริยา (multienzyme catalytic systems)

การทดลองนี้ได้พบ pathway ใหม่ที่สามารถเปลี่ยนลิโมนินไปเป็น limonol ซึ่งเป็นสารประกอบที่ไม่ขม โดยใช้เอนไซม์เพียงตัวเดียว โดยใช้วิธี immobilized cell ของ A. globiformis II ใน acrylamide gel ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินเช่นเดียวกัน แต่วิถีทางที่ใช้ในการกำจัดลิโมนินต่างกัน pathways ที่เกิดโดย A. globiformis II มี

อย่างน้อย 2 pathways คือ

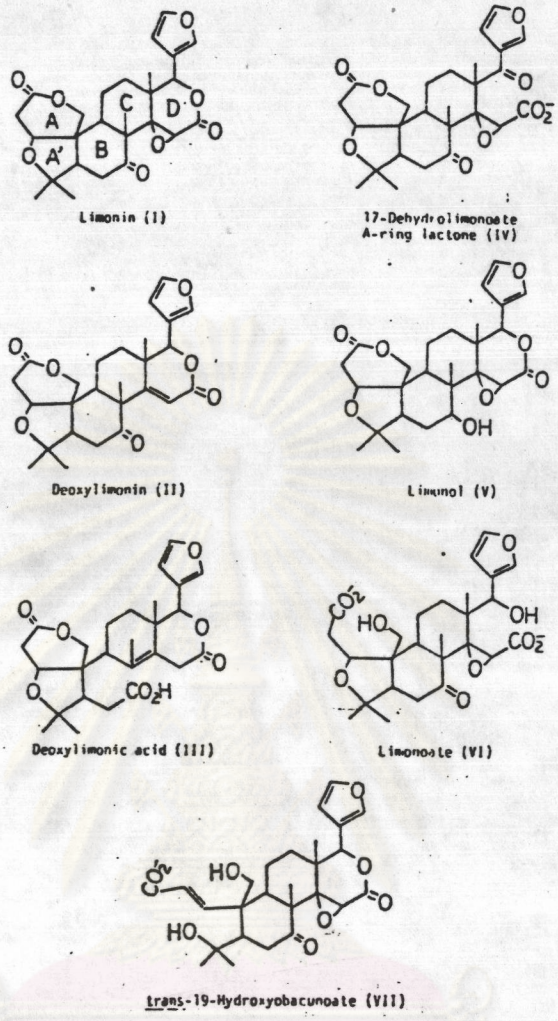


การเปลี่ยนลิโมนินไปเป็น limonol ในปฏิกิริยานี้มีประสิทธิภาพพอ ๆ กับการเปลี่ยนลิโมนินไปเป็น 17-dehydrolimonoate A-ring lactone โดยการ immobilized cellของ A. globiformis ตัวเดิม การทดลองนี้ก็มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณลิโมนินได้เช่นเดียวกัน

4. Corynebacterium fascians (Hasegawa และ King Jr., 1984; Hasegawa และ คณะ, 1985)

การผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในการสลายลิโมนินโดยแบคทีเรียทุกตัวที่กล่าวมานี้ต้องใช้สารพวกลิโมนอยด์เป็นตัวชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ แต่แบคทีเรียตัวนี้สามารถใช้ C-source จากแหล่งอื่นที่ไม่ใช่สารลิโมนอยด์เพื่อใช้ในการเจริญได้ มันสามารถเจริญได้โดยใช้น้ำตาลธรรมดา และสามารถผลิตเอนไซม์ Limonoate dehydrogenase จากผลการทดลองพบว่า C. fascians สามารถเจริญได้ดีที่สุดใน fructose รองลงมาคือ limonoate และ galactose ตามลำดับ มันจะเจริญได้ไม่ดีใน glucose และไม่เจริญเลยใน sucrose แต่ถ้าหากปรับสูตรอาหารโดยเพิ่ม 0.2% nutrient broth พบว่าลักษณะการเจริญจะต่างไป โดยแบคทีเรียจะเจริญใน limonoate ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ fructose และ galactose ตามลำดับ (Hasegawa et al., 1983)

C. fascians จะ metabolized limonoate ส่วนใหญ่ไปตามวิถีทาง 17-dehydrolimonoid แต่ยังมี minor metabolites อีก 3 ตัว metabolite ตัวใหม่ที่ได้จากปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ตัวนี้คือ trans-19-hydroxyobacunoate ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ transeliminase แต่เอนไซม์ตัวนี้ยังไม่ได้ถูกแยกออกมา ในวิถีทางนี้เอนไซม์จะเข้าไปทำปฏิกิริยาที่ A'-ring ของ limonoate ขณะที่วิถีทางของ deoxylimonoid และ 17-dehydrolimonoid เอนไซม์จะเข้าทำปฏิกิริยาที่ D-ring แต่ในทางตรงกันข้ามวิถีทางของ 7α-hydroxylimonoid หรือ limonol นี้ เอนไซม์จะเข้าทำปฏิกิริยาที่ B-ring



รูปที่ 11 สูตรโครงสร้างของลิโมนินและเมตาโบไลท์ที่ได้จากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียตามวิถีทางต่าง ๆ

metabolites ทั้ง 3 ตัวคือ 17-dehydrolimonoid, deoxylimonoids และ 7α-hydroxylimonoids ได้ถูกแยกออกมาได้แล้วจากผลไม้ตระกูลส้ม แต่ trans-19-hydroxyobacunoate ยังไม่พบในผลไม้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิถีทางที่เกิดสารตัวใหม่นี้ไม่ได้เกิดในตัวผลไม้ ส่วนวิถีทางของ 17-dehydrolimonoids, deoxylimonoids และ 7α-hydroxylimonoids สามารถเกิดในผลไม้ (Hasegawa, S., 1984)

ต่อมาได้นำเซลของ C. fascians มา immobilized ใน acrylamide gel ซึ่งเตรียมได้สะดวกโดยใช้ C-source ที่มีราคาถูกและหาได้ง่ายคือ fructose, galactose,

citric acid แล้วทดลองนำชีรัมของน้ำผลไม้ไปผ่าน immobilized cell column พบว่าปริมาณลิโมนินและโนมิลินลดลงจนต่ำกว่าระดับความขมคือ 6 ppm. โดยเฉพาะการลดปริมาณโนมิลิน และไม่มีผลต่อองค์ประกอบอื่น เช่น citric, malic, ascorbic acids, fructose, glucose และ sucrose เลย

จากการศึกษา metabolite จากการย่อยสลายลิโมนิน พบว่าลิโมนินจะถูกเปลี่ยนเป็น limonol โดยเอนไซม์ limonol dehydrogenase

โนมิลินเป็นสารที่ให้รสขมที่พบในน้ำเกรปฟรุ๊ต ซึ่งแยกได้ครั้งแรกจากเมล็ดของส้มและเลมอน มีความขมเป็น 2 เท่าของลิโมนิน (Rouseff, 1982) การย่อยสลายโนมิลินโดย C. fascians โนมิลินจะถูกเปลี่ยนเป็น obacunone โดยเอนไซม์ Nomilin acetyl lyase ซึ่ง C. fascians มีแอคติวิตี้ของเอนไซม์นี้สูงมาก

$$\text{Nomilin} \xrightarrow{\text{Nolilin acetyl lyase}} \text{Obacunone}$$

ระบบการตรึงเซลของ C. fascians จะมีเสถียรภาพน้อยกว่าของ A. globiformis ที่ทำในสภาวะคล้ายคลึงกัน และมีประสิทธิภาพในการลดความขมของโนมิลินดีกว่าประสิทธิภาพในการลดความขมของลิโมนิน (Hasegawa et al., 1985)

จากผลงานวิจัยที่ใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ในการกำจัดความขมในน้ำผลไม้ตระกูลส้ม สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 10

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 ชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ในการย่อยสลายสารลิโมนอยด์ และวิถีการย่อยสลายของแบคทีเรียแต่ละชนิด

Bacteria	Enzymes	Pathways
A. globiformis	induced	17-dehydrolimonoids
Pseudomonas 321-18	induced	deoxylimonoids
		17-dehydrolimonoids
Bacterium 342-152-1	induced	17-dehydrolimonoids
		deoxylimonoids
Acinetobacter sp.	induced	deoxylimonoids
A. globiformis II	induced	17-dehydrolimonoids
		7α-hydroxylimonoids
C. fascians	constitutive	17-dehydrolimonoids
		trans-19-hydroxyobacunoic acid

ที่มา : Hasegawa and Bennet, 1983

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย