# บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5280017
ชื่อโครงการ: การจำแนกสารประกอบฟีนอลและการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ Polyphenol oxidaseในเปลือกผลลองกอง
ชื่อนักวิจัย และสถาบัน : ผศ.ดร.สมัคร แก้วสุกแสง
อีเมล์: samak@tsu.ac.th
ระยะเวลาโครงการ: 16 มีนาคม 2552- 15 มีนาคม 2554

การศึกษาคุณสมบัติและคุณลักษณะของกิจกรรมเอนไซม์ polyphenol oxidase (PPO) ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผลลองกองมีวัตถุประสงค์เพื่อทราบและเข้าใจถึงคุณสมบัติเฉพาะอย่างและน้ำหนักโมเลกุล เพื่อยับยั้งหรือลดบทบาทกิจกรรมเอนไซม์ PPO โดยความรู้พื้นฐานนี้สามารถศึกษาต่อในกระบวนการแสดงออกของยีน polyphenol oxidase นำไปสู่การแก้ปัญหาการเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผลต่อลองกองต่อไป โดยสกัดเอนไซม์จากเปลือกลองกองมาทำให้บริสุทธิ์ (partially purified) ด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ ที่อิ่มตัว 20-60 เปอร์เซ็นต์แล้วต่อเนื่องด้วยวิธีการ molecular exclusion chromatography (Sephacryl S-200) แล้ววัดส่วนพีเอชที่เหมาะสม (pH optimum) ค่าความเสถียรของพีเอช (pH stability) และความเสถียรของอุณหภูมิ (temperature stability ) ของปฏิกิริยาเอนไซม์ PPO คือ 7.5 5.0-8.0 และ 40 องศาเซลเซียสตามลำดับ นอกจากนี้กิจกรรมเอนไซม์ PPO สามารถถูกยับยั้งได้ดีที่สุดด้วยสาร radical scavengers และ reducing agents ได้แก่ Reduced glutathion และ quercetin เมื่อหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Molecular exclusion chromatography (HW-55F) พบว่าเอนไซม์ PPO ไม่ปรากฏ isozyme และมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 93 KDa และเมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ PPO พบว่ากิจกรรมของ PPO ค่อยๆ เพิ่มขึ้นตั้งแต่ในวันที่ 0 และเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 8 ของการเก็บรักษา จากนั้นนำเอนไซม์ PPO ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี Anionic exchange chromatography (DEAE-650M) และศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ PPO อีกครั้งพบว่ากิจกรรม PPO ถูกยับยั้งอย่างชัดเจนในลองกองตั้งแต่วันแรกของการเก็บรักษาหลังจากที่ผ่านการให้รังสี UV-C ที่ความเข้มข้น 5.4 กิโลจูลย์ต่อตารางเมตร

การศึกษาสารประกอบฟีนอล กิจกรรมเอนไซม์ PAL และ PPO ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการเกิดสีน้ำตาลที่เปลือกลองกองพบว่าที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียสสามารถลดการสังเคราะห์ของกิจกรรมเหล่านี้ได้ดีกว่าอุณหภูมิห้อง และเมื่อมีการตรวจสอบสารประกอบฟีนอลบ่งชี้ได้ว่าในเปลือกผลลองกองส่วนใหญ่เป็นสารประกอบฟีนอลจำพวก kaempfenol และ quercetin ตามลำดับ รองลงมาคือ chlorogenic acid และ resveratrol ซึ่งพบในปริมาณที่ต่ำ นอกจากนี้มีการศึกษาวิธีการฉายรังสี

UV-C ที่ความเข้มข้น 0 (control), 3.6, 5.4 and 7.2 kJ/$m^2$ ที่มีผลต่อการเกิดสีน้ำตาลของลองกอง หลังเก็บเกี่ยวพบว่า การฉายรังสี UV-C ที่ 3.6 และ 5.4 kJ/$m^2$ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลที่ผิวเปลือกได้ดีกว่าชุดการทดลองอื่นและชะลอการลดลงของสารประกอบฟีนอล รวมทั้งลดกิจกรรมเอนไซม์ PPO และ PAL ได้ดีที่สุด

**คำหลัก**: สีน้ำตาล สารประกอบฟีนอล การทำบริสุทธิ์ ลองกอง

## Abstract

Project Code : MRG5280017

Project Title : Identification of Phenolic Compounds and Purification of Polyphenol oxidase in Longkong Pericarp

Investigator : Assist. Prof.Dr. Samak Kaewsuksaeng

E-mail Address :samak@tsu.ac.th

Project Period : 16 March 2009-15 March 2011

The characterization of Polyphenol oxidase (PPO) activity of stored longkong (*Aglaia dookkoo* Griff.) was investigated to clarify the mechanism of pericarp browning. The activity of PPO, which was partially purified by $(NH_4)_2SO_4$ precipitation (20-60% saturation) and continued to molecular exclusion chromatography (Sephacryl S-200). The pH optimum and stability of PPO activity were 7.5 and 5.0-8.0, respectively. Only one peak of the activity was detected and no other isozyme with PPO was estimate about 93 KDa. Reduced glutathione, and especially quercetin had more effective inhibitory activity. Anionic exchange chromatography (DEAE-650M) was further purified. PPO activity of the extract from UV-C irradiation 5.4 $kJ/m^2$, was lower than that of extracts from fresh longkong.

Phenolic compounds, as well as PAL and PPO activities, are likely to involve in the development of browning that occurs during the storage of longkong fruit at room temperature. Low storage temperature ($13^{\circ}C$) retarded the metabolism of longkong fruits as indicated by the lower L value, browning disorder, total phenolic content, PPO and POD

activities and water loss as compared to the high storage temperature (13$^{\circ}$C). The Identification of phenolic compound in Longkong Pericarp was determined. The primary phenolic in longkong peel are kaempfenol and quercetin. The other identification are chlorogenic acid and resveratrol, respectively. The UV-C irradiation 0 (control), 3.6, 5.4 and 7.2 kJ/m$^2$on phenolic content, polyphenol oxidase (PPO) and phenylalanine ammonia lyase (PAL) of longkong at 25C was determined. UV-C irradiation at 3.6 and 5.4 kJ/m$^2$ effectively inhibited pericarp browning relative to the control. PPO activity correspondingly decrease resulting to reduced phenolic oxidation indicated by retention of higher phenolics content than that in control. PAL also decreased and may have contributed to the reduction of browning as the most effective of UV-C irradiation was 5.4 kJ/m$^2$.

**Keywords**: Polyphenol oxidase, Phenolic compound, browning