บทที่ 5
วิจารณ์ผลการศึกษา

สารประกอบฟีนอลทั้งหมดและกิจกรรมด้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น

พืชสกุลมะเขือ (*Solanum* spp.) เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อน มีความหลากหลายทั้งในด้านลักษณะของผล รูปทรง ขนาด และ สีของผล (Lester and Hasan, 1991) ในประเทศไทยมีการปลูกกันอย่างแพร่หลายและบริโภคเป็นอาหารในรูปของผักและใช้ในรูปของสมุนไพร จากการเก็บตัวอย่างมะเขือที่มีการวางจำหน่ายในตลาดรอบตัวเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ช่วงระยะเวลาตั้งแต่ปี 2548-2550 พบมะเขือจำนวน 21 สายพันธุ์ เมื่อนำมาจำแนกตามลักษณะทางพฤกษศาสตร์ พบมะเขือทั้งหมด 3 species คือ *S. melongena* L. จำนวน 19 สายพันธุ์ *S. torvum* 1 สายพันธุ์ (มะเขือพวง) และ *S. nigrum* Linn 1 สายพันธุ์ (มะแว้งนก) และสามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่มได้ตามสีของผลคือ กลุ่มที่มีผลสีเขียวจำนวน 8 สายพันธุ์ กลุ่มที่มีผลสีขาว จำนวน 3 สายพันธุ์ และ กลุ่มที่มีผลสีม่วง จำนวน 10 สายพันธุ์ และในแต่ละกลุ่มยังสามารถแยกย่อยได้ตามลักษณะของทรงผล เนื้อผลออกเป็นกลุ่มที่มีผลกลม ป้อม เนื้อบาง เมล็ดมาก (กลุ่ม A-) และกลุ่มที่มีผลยาว เนื้อคล้ายฟองน้ำและเมล็ดน้อย (กลุ่ม B-) จากรายงานการศึกษาของบงการ (2545) มะเขือที่อยู่ใน*กลุ่ม S. melongena* และ *S. torvum* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันและสามารถจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ ส่วนมะแว้งนก (*S. nigrum*) นั้นมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์แตกต่างออกไป จากการเก็บตัวอย่าง พบว่า มะเขือบางชนิดเช่น มะแว้งนก ไม่นิยมนำมาจำหน่ายเพื่อรับประทานผลสด และไม่มีวางจำหน่ายแพร่หลายเหมือนมะเขือชนิดอื่น มะเขือบางสายพันธุ์มีจำหน่ายไม่สม่ำเสมอเนื่องจากเป็นพันธุ์นำเข้ามาปลูกจากต่างประเทศเช่น มะเขือม่วงญี่ปุ่นก้านม่วง มะเขือม่วงก้านเขียว และบางชนิดมีวางจำหน่ายเป็นฤดูกาลเช่น มะเขือตอแหล มะเขือม่วงยาว จึงไม่ได้รวมมะเขือเหล่านี้ไว้ในผลการศึกษาวิจัยซึ่งอาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในภายหลัง

ผลมะเขือเมื่อถูกหั่นชิ้น บริเวณรอยตัดจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอย่างรวดเร็ว จากการศึกษาพบว่า สีน้ำตาลที่เกิดขึ้นจะพบมากบริเวณเมล็ดและส่วนของรก (placenta) ที่ติดกับเมล็ด จากตัวอย่างมะเขือทั้ง 16 สายพันธุ์ที่สำรวจได้ สายพันธุ์ที่มีเมล็ดเป็นจำนวนมาก เช่น มะเขือพวง มะเขือเปราะ มะเขือเปราะเจ้าพระยา ซึ่งมีเนื้อผลบางและเมล็ดมากจะเกิดสีน้ำตาลอย่างรวดเร็ว ในขณะที่มะเขือที่มีเมล็ดน้อย เช่น มะเขือยาว มะเขือทำม้า มะเขือม่วงญี่ปุ่นก้านม่วง มีเนื้อผลคล้ายฟองน้ำ และเมล็ดน้อยจะใช้ระยะเวลานานกว่าในการเกิดสีน้ำตาลเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มแรก การเกิดสีน้ำตาลบริเวณรอยตัดบนผลมะเขือเป็นผลจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารประกอบฟีนอลที่เร่งการทำงานโดยเอนไซม์ PPO กระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชันสารประกอบฟีนอล ภายใต้สภาพที่มีออกซิเจน เอนไซม์จะเร่งการเปลี่ยนสารประกอบโมโนฟีนอลไปเป็นสารประกอบไดฟีนอล และเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นจนกระทั่งได้สาร *o*-quinone ที่ไม่เสถียร สามารถทำปฏิกิริยากับกรดแอมิโนหรือโปรตีนได้สารสีน้ำตาลขึ้นจากกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน

(Garcia-Carmona *et al.*, 1988) จากนั้นสารที่ได้จะรวมตัวกันจนโมเลกุลมีขนาดใหญ่ กลายเป็นสารสีน้ำตาลที่เรียกรวมๆ ว่า เมลานิน (จริงแท้, 2550) โดยการเกิดสีน้ำตาลจากสารประกอบฟีนอลและกิจกรรมของเอนไซม์ PPO นั้นมีปัจจัยต่างๆ ที่เข้ามาเกี่ยวข้องและส่งผลต่ออัตราการเกิดสีน้ำตาล ได้แก่ ปริมาณสารประกอบฟีนอล ที่เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยา ความเข้มข้นของเอนไซม์ PPO สารยับยั้งหรือเร่งกิจกรรมของเอนไซม์ ค่าพีเอช ออกซิเจน และอุณหภูมิ (Martinez and Whitaker, 1995)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ส่งผลต่ออัตราการเกิดสารสีน้ำตาล ดังนั้นหากผลมะเขือมีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูง อาจส่งผลให้เกิดสีน้ำตาลได้เร็วขึ้น มีรายงานว่ามะเขือในกลุ่มของ *S. melongena* เป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีสารประกอบฟีนอลทั้งหมดสูง (Bajaj *et al.*, 1979; Sakamura and Obata, 1963) จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า มะเขือพวง (*S. torvum*) มีดัชนีการเกิดสีน้ำตาลสูงสุด (index = 10) และเป็นมะเขือที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดสูงสุดจากมะเขือที่ศึกษาจำนวน 16 สายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบกับมะเขือแต่ละกลุ่มซึ่งเป็นมะเขือชนิด *S. melongena* ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของมะเขือพวงสูงกว่ามะเขือที่มีผลสีเขียวสายพันธุ์อื่นคิดเป็น 2.5 เท่า สูงกว่ามะเขือกลุ่มที่มีผลสีม่วงและสีขาวคิดเป็น 3 เท่า มะเขือในกลุ่มสีม่วง (-P) มีสีผลเป็นสีม่วงจากสารแอนโทไซยานินจำพวก nasunin หรือ delphinidin-3-(*p*-coumaroylrutinoside-5-glucoside เป็นสารสีหลักบนผิวของมะเขือม่วง (Matsubara *et al.*, 2005) แต่จากงานวิจัยในครั้งนี้ พบว่า การมีผลสีม่วงไม่ได้ทำให้มะเขือกลุ่มนี้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดสูงกว่ามะเขือในกลุ่มที่มีผลสีเขียวหรือสีขาว ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดที่วัดได้มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของมะเขือกลุ่มอื่น ยกเว้นมะเขือพวง จากรายงานของ Whitaker *et al.* (2003) ได้ศึกษามะเขือในกลุ่มของ *S. melongena* พบว่า ในผลมะเขือมีสารประกอบฟีนอลในกลุ่มของกรดฟีนอลปริมาณมาก ซึ่งกรดฟีนอลที่พบสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มคือ ไอโซเมอร์ของ chlorogenic acid, ไอโซเมอร์ของ isochlorogenic acid, hydroxylcinnamic acid amide conjugated, caffeic acid conjugated และไอโซเมอร์ของ acetylated chlorogenic โดยสารในกลุ่มกรด chlorogenic เป็นกรดฟีนอลที่พบปริมาณมากที่สุด คิดเป็น 63.4-96% ของปริมาณสารประกอบฟีนอลที่พบในผลมะเขือ ดังนั้นปริมาณสารประกอบฟีนอลที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มสีผลอาจเนื่องจากปริมาณสารประกอบฟีนอลชนิดอื่น เช่น กรดฟีนอลที่มีอยู่ในมะเขือมากกว่าปริมาณสารแอนโทไซยานิน

ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในผลมะเขือบางสายพันธุ์ขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตของผลมะเขือ จากการศึกษาในมะเขือ 4 สายพันธุ์ พบว่า มะเขือเปราะสีเขียว และมะเขือยาว มีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดสูงสุดในระยะผลอ่อน และลดลง 52% และ 75% ตามลำดับเมื่อผลอายุเพิ่มขึ้น 6 วันและมีแนวโน้มคงที่จนถึงระยะสิ้นสุดการเจริญ (30 วัน) มะเขือม่วงก้านเขียว และ มะเขือเปราะเจ้าพระยา มีปริมาณสารประกอบฟีนอลเพิ่มขึ้นเมื่อผลเจริญเติบโต ก่อนจะลดลงเมื่อผลเข้าสู่ระยะเติบโตเต็มที่ ซึ่งระยะที่มีการเก็บเกี่ยวเพื่อจำหน่ายทางการค้าอายุผลมะเขือประมาณ 18 – 24 วันเป็นช่วงที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลในมะเขือเหล่านี้

เริ่มคงที่ ในผลมะเขือที่ยังอ่อนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงอาจเนื่องจากมีการสะสมกรดฟีนอลหรือสารประกอบฟีนอลชนิดอื่นเพื่อใช้เป็นกลไกในการป้องกันตัวเอง (Robards *et al.*, 1999) หรืออาจเนื่องจากผลอายุ 6 วันของมะเขือทั้ง 2 ชนิดนั้นมีขนาดเล็กทำให้ต้องใช้จำนวนตัวอย่างในการสกัดมากกว่า ส่งผลให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลต่อน้ำหนักสดสูงกว่า

สารประกอบฟีนอลที่พบในพืช มีความหลากหลายมากมาย และมีความสำคัญในแง่เป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่พบในธรรมชาติ จึงได้มีผู้ศึกษาและวิจัยชนิดของสารประกอบฟีนอลและความสามารถในการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในผักและผลไม้ต่างๆ มากมาย สารประกอบฟีนอล เช่น สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ และกรดฟีนอล มีรายงานว่ามีคุณสมบัติต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Packer and Fuchs, 1996; Robards *et al.*, 1999) ทำหน้าที่เป็นตัวขับไล่อนุมูลอิสระ ทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอคทีพ (Rice-Evans *et al.*, 1997) ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้จึงได้นำสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของมะเขือแต่ละสายพันธุ์มาทดสอบหากิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (antioxidant activity) เทียบกับสารประกอบฟีนอลมาตรฐานคือ กรดแกลลิก ด้วยวิเคราะห์กิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น 3 แบบคือ วิธียับยั้งการฟอกจางสารละลายเบต้า-แคโรทีน (Dapkevicius *et al.*, 1998) วิธียับยั้งการฟอกจางสีของสาร DDPH (Mahattanatawee *et al.*, 2006) และ วิธีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค $ABTS^{+}$ (Nenadis *et al.*, 2004) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจสอบกิจกรรมการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ผลการศึกษาพบว่า DPPH assay มีแนวโน้มวัดกิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารประกอบฟีนอลได้ดีที่สุด DPPH assay เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารประกอบฟีนอล (Robards *et al.*, 1999) โดยเฉพาะสารที่อยู่ในกลุ่มของ chlorogenic (Ohnishi *et al.*, 1994) ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลที่มีประมาณมากที่สุดในมะเขือ (Stommel and Whitaker, 2003; Whitaker and Stommel, 2003) เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารประกอบฟีนอลทั้งหมดที่สกัดได้จากผลมะเขือทั้ง 16 สายพันธุ์พบว่า มะเขือพวงซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงสุดทั้งหมดมีกิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นสูงสุดเช่นกัน และปริมาณสารประกอลฟีนอลทั้งหมดของมะเขือมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นทั้งจากตัวอย่างที่ได้จากการสำรวจ และจากผลมะเขือระหว่างการเจริญเติบโต กล่าวคือ เมื่อปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดเพิ่มขึ้น กิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยเฉพาะมะเขือกลุ่มที่มีผลสีเขียว เมื่อนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงเส้นพบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดและกิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมีความสัมพันธ์เชิงบวก (r^2 = 0.97) และมากกว่ากลุ่มที่มีผลสีม่วง มะเขือที่มีผลสีม่วงเป็นพันธุ์ที่ต่างประเทศรู้จักและนิยมบริโภคมากกว่า มีรายงานศึกษาวิจัยหลายฉบับว่า สีม่วงที่เปลือกคือสาร nasunin เป็นสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน (Noda *et al.*, 2000)สามารถเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเนื้องอก (Matsubara *et al.*, 2005) จากรายงานการศึกษาชนิดของสารประกอบฟีนอลในมะเขือที่อยู่ในกลุ่มของ *S. melongena* จำนวน 33 สายพันธุ์ซึ่งมีทั้งกลุ่มที่มีผลสีเขียว สีม่วง และสีขาว พบว่า สารประกอบฟีนอลในมะเขือมีถึง 14

ชนิด (Stommel and Whitaker, 2003; Whitaker and Stommel, 2003) และสารประกอบฟีนอลเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล superoxide ด้วยวิธีวัด superoxide scavenging มากกว่าปริมาณวิตามินซีในผลมะเขือ (Hanson *et al.*, 2006) ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ามะเขือกลุ่มที่มีผลสีเขียวมีกิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้ดีกว่ามะเขือกลุ่มที่มีผลสีม่วง ดังนั้นกิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่เกิดขึ้นจึงไม่น่าจะเกิดจากสารแอนโทไซยานินในผลมะเขือเพียงอย่างเดียว แต่อาจเกิดจากสารอย่างอื่นที่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระในรูปอื่นๆ และมีประสิทธิภาพดีกว่าแอนโทไซยานิน เช่น สาร Chlorogenic acid ซึ่งเป็นกรดฟีนอลที่มีปริมาณมากที่สุดในผลมะเขือกลุ่ม *S. melongena* (Whitaker and Stommel, 2003) และมีรายงานว่าสามารถกำจัดอนุมูล peroxide radical และยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation (Kono *et al.*, 1997) แต่จากการศึกษาของ ชนิกาญจน์และคณะ (2551) ได้ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลและกิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารประกอบฟีนอลที่สกัดจากส่วนต่างๆ ของมะเขือกลับพบว่า บริเวณเปลือกของมะเขือมีปริมาณสารประกอบฟีนอลต่อน้ำหนักสดสูงสุด โดยเฉพาะในกลุ่มของมะเขือสีม่วง และทำให้กิจกรรต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่วัดด้วย DPPH assay สูงตามไปด้วยและน่าจะเป็นผลจากปริมาณสารแอนโทไซยานินจากเปลือกมะเขือเป็นหลัก ซึ่งต่างจากการศึกษาในครั้งนี้เพราะสารประกอบฟีนอลจากทั้งผลเนื่องจากพฤติกรรมในการบริโภคมะเขือจะนิยมบริโภคทั้งผลมากกว่า

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า มะเขือพวงเป็นแหล่งที่ให้สารประกอบฟีนอลทั้งหมดสูงกว่ามะเขือในกลุ่มของ *S. melongena* และสารประกอบฟีนอลทั้งหมดที่สกัดได้ยังมีกิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นสูงที่สุดด้วย กิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารประกอบฟีนอลในมะเขือพวง อาจเกิดจากสารในกลุ่มของ chlorogenic เป็นหลัก เนื่องจากมีรายงานว่ามะเขือพวงมีสารประกอบในกลุ่มของ chlorogenic หลายชนิดเช่น neochlorogenin 6-O-β-D-quinovopyranoside, neochlorogenin 6-O-β-D-xylopyranosyl-β-D-quinovopyranoside (2), neochlorogenin 6-O-α-L-rhamnopyranosyl-β-D-quinovopyranoside (Lu *et al.*, 2011) และยังมีสารประกอบฟีนอลอื่นๆ อีกหลายชนิดที่พบในผลไม้ชนิดอื่น เช่น isoquercetin,, kaempferol และ quercetin (Rice-Evans *et al.*, 1997; Robards *et al.*, 1999) มะเขือพวงจึงน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการเป็นแหล่งของสารประกอบฟีนอลที่สามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นจากธรรมชาติและส่งเสริมให้มีการบริโภคต่อไป

เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสและคุณสมบัติบางประการ

แม้ว่าสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นบนผลมะเขือเป็นปัญหาสำคัญที่พบในการจัดการหลังการเก็บเกี่ยว (review โดยMartinez and Whitaker, 1995) และเกิดปัญหาในการเก็บรักษามะเขือ (Concellon *et al.*, 2004) และทำให้ผลมะเขือไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค แต่สารกลุ่มนี้ยังมีการนำไปใช้ประโยชน์ในการปรุงแต่งอาหารที่ต้องการสีน้ำตาลเช่น กาแฟ (Amorim, 1991) ใบชาแห้ง (Ullah, 1991) และโกโก้ (Lee *et al.*, 1991) การเกิดสีน้ำตาลนอกจากจะขึ้นกับปริมาณ

สารประกอบฟีนอลแล้ว ยังเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ดังนั้นการเกิดสีน้ำตาลบริเวณรอยตัดบนผลมะเขือ นอกจากปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดแล้ว น่าจะสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ในผลมะเขือด้วย จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ PPO ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด และการเกิดสีน้ำตาลบริเวณรอยตัดไม่สัมพันธ์กัน โดยพบว่ามะเขือบางสายพันธุ์เช่น มะเขือเปราะ มีกิจกรรมของเอนไซม์ PPO สูงกว่า มะเขือเปราะพันธุ์แจ้ถึง 3.5 เท่า แต่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลใกล้เคียงกัน ค่า L* ที่แสดงถึงความสว่างของบริเวณรอยตัดมะเขือเมื่อเวลาผ่านไป 20 นาทีไม่แตกต่างกัน มะเขือที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ PPO สูงในกลุ่มมะเขือผลสีขาวเช่น มะเขือไข่กา และมะเขือยาวสีขาว มีกิจกรรมของเอนไซม์ PPO สูงมากเมื่อเทียบกับมะเขือสายพันธุ์อื่น และมะเขือไข่กาเกิดสีน้ำตาลมากที่สุด แต่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดไม่แตกต่างจากมะเขือกลุ่มผลสีเขียวและผลสีม่วง และมะเขือพวง ซึ่งเป็นมะเขือที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดสูงสุดและมีค่าดัชนีการเกิดสีน้ำตาลสูงสุดแต่มีกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ต่ำ แสดงว่าการเกิดสีน้ำตาลไม่ได้ขึ้นอยู่กับกิจกรรมของเอนไซม์ PPO เพียงอย่างเดียว หรืออาจมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ PPO เช่น ปัจจัยเรื่องอายุของมะเขือ เอนไซม์ PPO ในพืชพบได้ 2 รูปแบบคือ รูปแบบที่ละลายได้ (soluble form) และแบบ insoluble form หรือเอนไซม์ที่จับกับเยื่อหุ้มเซลล์ (Yoruk and Marshall, 2003) ในพืชที่มีอายุน้อยจะมีปริมาณ PPO ต่ำ เนื่องจากเอนไซม์จะเกาะอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์ และไม่สามารถทำงานได้ ระหว่างที่พืชเจริญเติบโต ปริมาณเอนไซม์จะเพิ่มสูงขึ้น และมีปริมาณมากที่สุดในช่วงก่อนที่พืชจะโตเต็มที่ จากนั้นจะค่อยๆ ลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะการเสื่อมสภาพ หรือเมื่อผลไม้สุก (Yoruk and Marshall, 2003; Zawitowski *et al.*, 1991) ซึ่งจากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ PPO ในผลมะเขือระหว่างการเจริญเติบโต พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ PPO เพิ่มขึ้นเมื่อผลมะเขือมีอายุมากขึ้น และมีกิจกรรมสูงสุดเมื่อผลเจริญเติบโตเต็มที่ (อายุ 30วัน) ตัวอย่างเช่น กิจกรรมเอนไซม์ PPO ของมะเขือม่วงก้านเขียวมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นมากกว่า 5 เท่าในระยะเวลา 4 สัปดาห์ ส่วนตัวอย่างมะเขือที่เก็บจากตลาดมีอายุผลที่แตกต่างกัน และระยะการเก็บเกี่ยวเพื่อการค้าของผลมะเขือมักมีอายุประมาณ 18-24 วันซึ่งอาจเป็นช่วงที่เอนไซม์ PPO มีกิจกรรมต่ำทำให้ผลการศึกษามีความคลาดเคลื่อนได้

การศึกษารูปแบบการกระจายตัวของโปรตีนในเอนไซม์ PPO จากมะเขือบางสายพันธุ์ พบว่า เมื่อนำโปรตีนที่ไม่ผ่านความร้อนมาแยกขนาดโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE และศึกษาการเกิดกิจกรรมโดยใช้กระดาษอิ่มตัวสับสเทรต (Cheng *et al.*, 2007) มาทดสอบจะพบแถบของสารสีน้ำตาลที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ PPO แสดงว่าโปรตีนที่ผ่านการแยกขนาดด้วยเทคนิคนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและใช้สารประกอบฟีนอลเป็นสับสเทรตจนได้สารสีน้ำตาล ซึ่งขนาดของแถบสีน้ำตาลขึ้นอยู่กับกิจกรรมของเอนไซม์ PPO จากมะเขือแต่ละชนิด ซึ่งพบว่ามีอย่างน้อย 1 แถบ ขนาดของโปรตีนที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ PPO มีขนาดประมาณ 150 – 160 kDa มะเขือบางชนิดจะมีแถบโปรตีนมากกว่า 1 แถบ โดยมีโปรตีนขนาด 60 kDa ที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ PPO เพิ่มขึ้นมา เนื่องจาก โปรตีนที่นำมาศึกษาไม่ได้ผ่านความร้อนจึงไม่สามารถบอก

ขนาดที่แน่นอนของโปรตีนที่แยกได้แต่ประมาณได้จากเจลของโปรตีนที่ผ่านความร้อนและแยกขนาดในเวลาเดียวกันเป็นตัวเปรียบเทียบ จากการศึกษายังพบว่า แถบแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ PPO เพิ่มขึ้นตามอายุของผลมะเขือ โดยมีจำนวนแถบที่เพิ่มขึ้นนั้นจะพบเฉพาะบางช่วงของการเจริญเติบโตเท่านั้น แสดงว่า กิจกรรมของเอนไซม์ PPO จากมะเขือนั้นเกิดจากกลุ่มของโปรตีนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชั่นของสารประกอบฟีนอล และมีโปรตีนมากกว่า 1 ชนิดในกลุ่มของเอนไซม์ และโปรตีนบางชนิดแสดงกิจกรรมในบางช่วงอายุของการเจริญเท่านั้น

จากการศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ PPO ที่สกัดได้จากมะเขือจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ มะเขือพวง มะเขือเปราะเจ้าพระยา มะเขือยาวสีเขียว มะเขือยาวชินฮั้ว และ มะเขือยาวสีขาว เพื่อเป็นตัวแทนของมะเขือแต่ละกลุ่มสีผล พบว่า จากวิธีการสกัดและปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ที่สกัดได้ เอนไซม์ PPO ของมะเขือที่ศึกษาเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในรูปของ soluble form สอดคล้องกับรายงานของ Concellon *et al.* (2004) และไม่ได้เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ จากการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โดยใช้ 4-MC ความเข้มข้น 10mM ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1M ค่าพีเอช 6.5 เป็นสับสเทรต พบว่าค่า Km และ Vmax ของแต่เอนไซม์ PPO ที่สกัดได้จากมะเขือแต่ละสายพันธุ์มีค่าดังนี้ มะเขือพวงมีค่า Km เท่ากับ 3.0mM และค่า Vmax เท่ากับ 0.25 OD min^{-1} มะเขือเปราะเจ้าพระยามีค่า Km เท่ากับ 2.9mM และค่า Vmax เท่ากับ 0.15 OD min^{-1} มะเขือยาวสีเขียวมีค่า Km เท่ากับ 3.2mM และค่า Vmax เท่ากับ 0.10 OD min^{-1} Oมะเขือยาวสีขาวมีค่า Km เท่ากับ 2.9mM และค่า Vmax เท่ากับ 0.14 OD min^{-1} มะเขือยาวชินฮั้วมีค่า Km เท่ากับ 2.8 mM และค่า Vmax เท่ากับ 0.20 OD min^{-1} ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (Concellon *et al.*, 2004; DOgan *et al.*, 2002; Garcia-Carmona *et al.*, 1988; Perez-Gilabert and Garcia-Carmona, 2000).

สับสเทรตจำเพาะของเอนไซม์ PPO แต่ละชนิดที่สกัดได้แตกต่างกัน โดย catechin เป็นสับสเทรตจำเพาะของเอนไซม์ PPO จากมะเขือพวง มะเขือยาวสีขาว และมะเขือม่วงชินฮั้ว ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 10-15mM ส่วนมะเขือเปราะเจ้าพระยาสามารถใช้ 4-MC ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารประกอบฟีนอลตัวอื่น ส่วนมะเขือยาวสีเขียวมี 4-TC เป็นสับสเทรตจำเพาะและเมื่อเพิ่มความเข้มข้น กิจกรรมเอนไซม์ PPO ของมะเขือยาวสีเขียวจะเพิ่มขึ้นเช่นกัน ตามปกติแม้เอนไซม์ PPO สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารประกอบฟีนอลได้ แต่สารประกอบฟีนอลแต่ละชนิดมีโครงสร้างแตกต่างกัน ทั้งตำแหน่งของหมู่ hydroxyl หรือ ตำแหน่งของ benzene ring ซึ่งมีผลอย่างมากต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (Yoruk and Marshall, 2003) ในการศึกษาครั้งนี้สารประกอบฟีนอลที่ใช้ 4 ชนิด คือ 4-MC, catechol, pyroatechol (PC), catechin, และ 4-TC ต่างมีโครงสร้างหลักเหมือนกันแต่มีอนุพันธ์ที่แตกต่างกัน ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ PPO เมื่อใช้สารเหล่านี้เป็นสับสเทรตมีกิจกรรมแตกต่างกันด้วย ส่วน dopamine ซึ่งมีโครงสร้างแตกต่างจากกลุ่มของ catechol กิจกรรมของเอนไซม์ PPO เมื่อใช้ dopamine เป็นสับสเทรตจะมีกิจกรรมต่ำสุด แสดงว่าเอนไซม์ PPO ของมะเขือสามารถใช้สารในกลุ่ม catechol ได้ดีที่สุด ซึ่งมีรายงานว่า catechol, 4-MC และ 4-TC เป็นสับสเทรตจำเพาะสำหรับเอนไซม PPO ของมะเขือใน

กลุ่ม *S. melonga* แต่ใช้ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ (Cheriot *et al.*, 2006; Concellon *et al.*, 2004; DOgan *et al.*, 2002; Perez-Gilabert and Garcia-Carmona, 2000; Zhang and Chen, 2006) ส่วน catechin ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลที่พบได้ในองุ่น (Jaworski and Lee, 1987) และ ชา (Ullah, 1991) และน่าจะเป็นสับสเทรตสำหรับเอนไซม์ PPO ในผลไม้อีกหลายชนิดแต่ catechin ยังไม่เคยนำมาใช้กับเอนไซม์ PPO ของมะเขือมาก่อน จากกิจกรรมที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ catechin เป็นสับสเทรตให้กับเอนไซม์ PPO ของมะเขือพวง มะเขือยาวสีขาวและมะเขือม่วงชินฮั้วแสดงว่า โครงสร้างของ catechin น่าจะเหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ PPO มากกว่าสารในกลุ่ม catechol

เอนไซม์ PPO ค่อนข้างทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม เช่น ค่าพีเอช และอุณหภูมิ จากการศึกษาพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ PPO สามารถเกิดขึ้นได้ในช่วงพีเอชระหว่าง 5 -8 และมีค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน (optimal pH) ค่อนข้างกว้างคืออยู่ระหว่า 5.0-6.5 กิจกรรมของเอนไซม์ PPO จะเริ่มลดลงเมื่อค่าพีเอชสูงกว่า 6.5 หรือต่ำกว่า 5.0 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Perez-Gilabert และ Garcia-Carmona (2000) และ Concellon *et al.* (2004) นอกจากนั้น เอนไซม์ PPO จากมะเขือยังมีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 2 – 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์ PPO จากมะเขือยังสามารถเกิดกิจกรรมได้ ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimal temperature) สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ PPO จากมะเขือทุกสายพันธุ์อยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส เมื่อลดอุณหภูมิของสภาพแวดล้อมลง เอนไซม์ PPO จากมะเขือยังสามารถเกิดกิจกรรมได้ แม้อุณหภูมิจะลดลงถึง 2 องศาเซลเซียส โดยกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเพียง 20% เมื่อเทียบกับกิจกรรมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาการเกิดสีน้ำตาลกับมะเขือม่วงเมื่อเก็บรักษาอุณหภูมิต่ำ (Concellon *et al.*, 2004; Dogan *et al.*, 2002) แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ PPO จากมะเขือทุกสายพันธุ์จะลดลงอย่างรวดเร็ว แต่เอนไซม์ PPO ยังสามารถเกิดกิจกรรมได้ แม้กิจกรรมจะลดลงเหลือเพียง 25% ของกิจกรรมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เอนไซม์ PPO จากมะเขือยังสามารถทนอุณหภูมิสูงได้เป็นระยะเวลานานหากอุณหภูมิไม่สูงเกินกว่า 60 องศาเซลเซียส ซึ่งปกติเป็นอุณหภูมิที่นิยมใช้ทำแห้งผลไม้ (Del Caro *et al.*, 2004) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ PPO ลดลง 50% เมื่อได้รับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนานกว่า 15 นาที แต่หากได้รับอุณหภูมิ 40 หรือ 50 องศาเซลเซียสจะใช้ระยะเวลา 30 นาที กิจกรรมของเอนไซม์จึงจะลดลง 50% แสดงว่ากิจกรรมของเอนไซม์ PPO จากมะเขือมีกิจกรรมลดลงเมื่อได้รับอุณหภูมิสูงขึ้นและระยะเวลานานขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Dogan *et al.* (2002) การที่กิจกรรมของเอนไซม์ PPO ลดลงอาจเนื่องจากการเสียสภาพของโปรตีนเมื่อได้รับความร้อนสูงขึ้นและเป็นระยะเวลานานขึ้น (Dogan *et al.*, 2005) แต่จัดได้ว่าเอนไซม์ PPO ของมะเขือเป็นเอนไซม์ที่ค่อนข้างทนต่ออุณหภูมิสูง เพราะแม้ได้รับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนานถึง 60 นาที ยังสามารถเกิดกิจกรรมได้ถึง 20% โดยปกติ PPO จัดเป็นเอนไซม์ที่ทนต่ออุณหภูมิ (Zawitowski *et al.*, 1991) แต่จะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช เช่น กิจกรรมของเอนไซม์ PPO จากลำไยลดลง 50% เมื่อได้รับอุณหภูมิ 50 องศา

เซลเซียสนาน 20 นาที แต่เอนไซม์ของผักกาดแก้วสามารถทนอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสได้ถึง 5 นาทีโดยกิจกรรมของเอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลง (Heimdal *et al.*, 1994)

การศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้สารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ซึ่งสารยับยั้งแต่ละชนิดทำหน้าที่แตกต่างกันคือ สารที่ทำหน้าที่เป็น reducing agent ได้แก่ กรดซิทริก โซเดียมเมทาไบซัลไฟต์ สารที่ทำหน้าที่เป็น chelating agent ได้แก่ EDTA และกรดแอสคอร์บิก ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชั่น โดยสารเหล่านี้จะทำหน้าที่ยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลโดยไปแย่งจับกับเอนไซม์ หรือสับสเทรต หรือ ทองแดงที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ PPO (Eskin *et al.*, 1971) จากการศึกษาพบว่า กรดแอสคอร์บิกและโซเดียมเมทาไบซัลไฟต์มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการเป็นสารยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ PPO จากมะเขือทุกสายพันธุ์ ตั้งแต่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ กรดซิทริก เกลือและ EDTA สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ PPO จากมะเขือบางสายพันธุ์ได้ แต่ต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึงจะมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากรดแอสคอร์บิกและโซเดียมเมทาไบซัลไฟต์ ซึ่งในกรณีของกรดซิทริกและเกลืออาจส่งผลต่อรสชาติของมะเขือหากจะใช้สารเหล่านี้ยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลบริเวณรอยตัด สารโซเดียมเมทาไบซัลไฟต์เป็นสารที่ห้ามใช้กับผักและผลไม้สดเพราะอาจเกิดอันตรายจากสารตกค้าง (Martinez and Whitaker, 1995) ดังนั้นกรดแอสคอร์บิกจึงเป็นทางเลือกสำหรับการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการป้องกันการเกิดสีน้ำตาลบนมะเขือ หรืออาจใช้ร่วมกับกรดซิทริกและการให้ความร้อน (Almeida and Nogueira, 1995) เพื่อควบคุมการเกิดสีน้ำตาลบนมะเขือ แต่หากต้องการเพิ่มปริมาณสารสีน้ำตาลให้กับมะเขือเพื่อนำสารสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปใช้เป็นสีจากธรรมชาติ เพื่อใช้แต่งอาหารเช่น ชาสมุนไพร ต้องปรับสภาพแวดล้อมต่างๆให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ PPO คือ ใช้ catechin หรือ 4-MC เป็นสับสเทรต ในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดอ่อน ค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 6.0 อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส และในเนื้อมะเขือต้องไม่มีวิตามินซี