

# ความเสียหายจากออกซิเดชันและศักยภาพรวมการต้านอนุมูลอิสระ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเปลือกสีน้ำตาลระหว่างการเก็บรักษาผลลองกอง

## Oxidative Damage and Total Antioxidant Capacity

### Involved in Pericarp Browning During Storage of Longkong Fruit

วารุณี จอมกิติชัย\*

Warunee Chomkitichai\*

หลักสูตรวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์

Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Uttaradit Rajabhat University

Received : 29 April 2019

Revised : 12 July 2019

Accepted : 27 August 2019

#### บทคัดย่อ

ความเสียหายจากออกซิเดชัน (oxidative damage) ที่เกิดจากความไม่สมดุลระหว่างการสร้างอนุมูลอิสระและศักยภาพการกำจัดอนุมูลอิสระนับเป็นสาเหตุหนึ่งทำให้ผลไม้หลายชนิดเกิดปัญหาเปลือกสีน้ำตาลภายหลังการเก็บเกี่ยวซึ่งทำให้อายุการเก็บรักษาลดลง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเสียหายจากออกซิเดชันและศักยภาพรวมการต้านอนุมูลอิสระที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเปลือกสีน้ำตาลระหว่างการเก็บรักษาผลลองกอง (*Lansium domesticum* Corr.) โดยนำผลลองกองบรรจุในตะกร้าที่หุ้มปิดด้วยด้วยพีวีซีฟิล์ม จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน สุ่มตัวอย่างผลลองกองมาวิเคราะห์ทุกวัน โดยวิเคราะห์การเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผล ปริมาณอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (reactive oxygen species: ROS) ได้แก่ อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide radical:  $O_2^{\bullet-}$ ) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide:  $H_2O_2$ ) วิเคราะห์ความเสียหายจากออกซิเดชันจากปริมาณมาลันโดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde: MDA) และอัตราการรั่วไหลของประจุ (electrolyte leakage rate: EL rate) และวิเคราะห์ศักยภาพรวมการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS DPPH และ FRAP ผลการศึกษาพบว่า การเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผลลองกองเพิ่มสูงขึ้นระหว่างการเก็บรักษา การเพิ่มขึ้นนี้สัมพันธ์กับการสร้างและการสะสมของปริมาณ ROS และ ความเสียหายจากออกซิเดชัน โดยทั้งปริมาณ  $O_2^{\bullet-}$   $H_2O_2$  MDA และอัตราการรั่วไหลของประจุเพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน ในขณะที่ศักยภาพรวมการต้านอนุมูลอิสระของเปลือกผลลองกองที่วิเคราะห์ทั้ง 3 วิธีมีแนวโน้มลดลง สอดคล้องกับการเกิดสีน้ำตาลและความเสียหายจากออกซิเดชันที่เกิดขึ้นระหว่างการเก็บรักษา ศักยภาพรวมการต้านอนุมูลอิสระของเปลือกผลลองกองที่ลดลงนำไปสู่การสะสมอนุมูลอิสระและความเสียหายออกซิเดชันของเยื่อหุ้มเซลล์ และส่งผลให้ผลลองกองเกิดเปลือกสีน้ำตาลระหว่างการเก็บรักษา

**คำสำคัญ :** ความเสียหายออกซิเดชัน, อนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจน, ศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระ,  
การเกิดสีน้ำตาล ลองกอง

\*Corresponding author. E-mail : j\_waru@hotmail.com

### Abstract

Oxidative damage occurred from an imbalance between the production of free radicals and the capacity of the antioxidant defense mechanism, is a cause of browning problem in many postharvested fruits that reduce in shelf life. The objective of this research was to study the oxidative damage and total antioxidant capacity involved in pericarp browning during storage of longkong fruit (*Lansium domesticum* Corr.). Longkong fruits were packed in basket and wrapped with PVC film, then stored at room temperature for 5 days. The fruits were randomized every day to analyze the pericarp browning, reactive oxygen species (ROS) including superoxide radical ( $O_2^{\bullet-}$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) content, oxidative membrane damage from malondialdehyde (MDA) content and electrolyte leakage (EL) rate and total antioxidant capacity by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging and ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) methods. The results showed that pericarp browning increased during storage of longkong fruit. This increase coincided with the production and accumulation of ROS contents both  $O_2^{\bullet-}$  and  $H_2O_2$  and oxidative membrane damage measured by MDA content and EL rate. Whereas, all of 3 methods for the total antioxidant capacity analysis of longkong fruit tended to decrease and was consistent with pericarp browning and oxidative damage during storage. The decline in total antioxidant capacity leads to an increase in ROS accumulation and oxidative membrane damage as well as subsequent pericarp browning during storage of longkong fruit.

**Keywords :** oxidative damage, reactive oxygen species, antioxidant capacity, browning, longkong

### บทนำ

ลองกองเป็นไม้ผลเขตร้อนชนิดหนึ่งที่มีความนิยมจากผู้บริโภค เนื่องจากมีรสชาติหวาน กลิ่นหอม ผลมีเปลือกบาง เปลือกมียางน้อย และมีเมล็ดน้อย จึงทำให้ความต้องการในการบริโภคผลสดมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามภายหลังจากเก็บเกี่ยวผลลองกองมักประสบปัญหาสำคัญคือการเกิดสีน้ำตาลที่เปลือกผลภายใน 2-3 วัน เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ทำให้อายุการเก็บรักษาสั้นลง และไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของการวางจำหน่าย

การเกิดเปลือกสีน้ำตาลนี้ สันนิษฐานว่ามีสาเหตุสำคัญเกิดจากอนุมูลอิสระ (free radicals) โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (reactive oxygen species: ROS) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide radical;  $O_2^{\bullet-}$ ) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide:  $H_2O_2$ ) และอนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical:  $HO^{\bullet}$ ) (Chomkitichai *et al.*, 2014a) ปริมาณอนุมูลอิสระที่เพิ่มสูงขึ้นจะก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทำลายเมมเบรนของเซลล์และออร์แกเนลล์ต่างๆ ซึ่งสามารถวิเคราะห์ความเสียหายนี้ได้จากสารตัวกลางที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) และโปรตีน (protein oxidation) ที่เป็นองค์ประกอบของเมมเบรน เช่น คอนจูเกตไดอีน (conjugated dienes) มาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde: MDA) และโปรตีนคาบอนิล (carbonyl protein) เป็นต้น และส่งผลทำให้เกิดการรั่วไหลของสารต่างๆ ภายในเซลล์ ซึ่งวัดได้จากอัตราการรั่วไหลของประจุ (electrolyte leakage rate: EL)

(Gill & Tuteja, 2010; Bhattacharjee, 2012) ปฏิกริยาออกซิเดชันซึ่งทำลายเมมเบรนนี้มีผลเร่งปฏิกริยาออกซิเดชันระหว่าง สารประกอบฟีนอลที่อยู่ในแวคิวโอล (vacuole) และเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase: PPO) และเปอร์ออกซิเดส (peroxidase: POD) ที่อยู่ในไซโตซอล (cytosol) และพลาสติด (plastid) ซึ่งรั่วไหลออกมาเกิดปฏิกริยาเป็นสารประกอบ สีน้ำตาลขึ้น (Toivonen & Brummell, 2008) ดังมีรายงานการศึกษาพบว่าการสะสมปริมาณอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับการ เกิดสีน้ำตาลในผลไม้บางชนิด เช่น ในผลลำไย ผลลิ้นจี่ ผลโศภอนท เซสนัท แอปเปิ้ล และ ราบัว (Cai *et al.*, 2006; Duan *et al.*, 2007a, 2011; Yang *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2010, 2011; You *et al.*, 2012; Huque *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2014; Chomkitichai *et al.*, 2014a)

อย่างไรก็ตามอนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์พืชเป็นปกติอยู่แล้วจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ต่างๆ ภายในเซลล์ ซึ่งปัจจัยภายนอกที่ไม่เหมาะสม เช่น การขาดน้ำ อุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไป การได้รับรังสี หรือสารเคมีต่างๆ สามารถชักนำให้มีการสร้างอนุมูลอิสระได้มากขึ้น (Gill & Tuteja, 2010) และเซลล์จะมีการกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้โดยระบบ ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant defense system) เพื่อให้เกิดความสมดุลและไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ ซึ่งในระบบนี้ประกอบด้วย สารต้านอนุมูลอิสระทั้งกลุ่มที่เป็นเอนไซม์ (enzymatic antioxidants) เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส (superoxide dismutase: SOD) คาตาเลส (catalase: CAT) และ แอสคอร์เบท เพอร์ออกซิเดส (ascorbate peroxidase: APX) และกลุ่มที่ไม่เป็นเอนไซม์ (non-enzymatic antioxidants) เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) วิตามินซี (ascorbic acid) วิตามินอี ( $\alpha$ -tocopherol) กลูตาไธโอน (glutathione) และ แคโรทีนอยด์ (carotenoid) เป็นต้น (Gill & Tuteja, 2010) ซึ่งประสิทธิภาพของ การต้านอนุมูลอิสระสามารถวัดได้จากกิจกรรมของเอนไซม์และสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ หรือวัดจากศักยภาพรวมการต้าน อนุมูลอิสระ (total antioxidant capacity) หลายๆ วิธี เช่น วิธีการทำลายอนุมูลดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging) วิธีการ ทำลายอนุมูลเอบีทีเอส (ABTS radical scavenging) และวิธีวัดความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (ferric reducing antioxidant power: FRAP) เป็นต้น

การเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผลภายหลังการเก็บเกี่ยวของผลลองกองอาจเกี่ยวข้องกับระบบต้านอนุมูลอิสระที่เสื่อม ต้อยลงในระหว่างการเก็บรักษา โดยจะมีผลชักนำให้เกิดการสะสมอนุมูลอิสระ และความเสียหายออกซิเดชันของเมมเบรนเพิ่ม มากขึ้น และเร่งการเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผล แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษากลไกการเกิดสีน้ำตาลนี้ ในผลลองกอง

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นเพื่อศึกษากลไกการเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผลลองกองที่เกี่ยวข้องกับระบบต้าน อนุมูลอิสระ การสะสมปริมาณอนุมูลอิสระ และความเสียหายออกซิเดชันของเมมเบรน ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นแนวคิด นำไปประยุกต์ใช้ในการลดการเกิดสีน้ำตาลของผลลองกองต่อไป

## วิธีดำเนินการวิจัย

นำผลสดลองกองพันธุ์ธารโต (*Lansium domesticum* Corr.) อายุประมาณ 13-15 สัปดาห์หลังดอกบาน จากสวน ของเกษตรกรในอำเภอฉวาง จังหวัดอุดรธานี บรรจุในกล่องกระดาษ แล้วขนส่งมายังห้องปฏิบัติการชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ภายในเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำผลมาตัดออกจากข้อให้เป็นผล เดี่ยว ให้เหลือก้านผลยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร คัดเลือกผลที่มีขนาดและสีที่ใกล้เคียงกัน ไม่มีการทำลายของโรคและแมลง

นำผลลองกองที่เตรียมไว้จำนวน 360 ผล แบ่งเป็น 3 ซ้ำๆ ละ 120 ผล บรรจุผลแต่ละซ้าลงในตะกร้าขนาด 18 x 24 x 7 เซนติเมตร จำนวน 6 ใบๆ ละ 20 ผล ปิดด้วยพลาสติกพีวีซีหุ้มอาหาร เพื่อรักษาสภาพของผลลองกอง ช่วยป้องกันการสูญเสีย น้ำและการรบกวนของแมลงต่างๆ โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ทำการสุ่มตัวอย่างผลลองกองในตะกร้าของทั้ง 3 ซ้ำๆ ละ 20 ผล มาวิเคราะห์ทุกวัน ตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 5 ของการเก็บรักษา โดยวิเคราะห์การเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผล ความเสียหายจากออกซิเดชัน และศักยภาพรวมการต้านอนุมูลอิสระ

### 1. การเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผล

การวิเคราะห์การเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผลลองกองวิเคราะห์จากจากเปอร์เซ็นต์พื้นที่การเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผล (% browning) และกิจกรรมของเอนไซม์ PPO และ POD

เปอร์เซ็นต์พื้นที่การเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผล วิเคราะห์โดยการประเมินด้วยสายตา ดัดแปลงจากวิธีการของ Jiang & Li (2001) บันทึกผลเป็นเปอร์เซ็นต์พื้นที่ที่เกิดสีน้ำตาลของผลเทียบกับพื้นที่เปลือกผลทั้งหมด โดยในแต่ละซ้าทำการประเมินพื้นที่ที่เกิดสีน้ำตาลทุกผลและคำนวณเป็นค่าเฉลี่ย

การสกัดเอนไซม์ PPO และ POD ดัดแปลงจากวิธีการของ Huang *et al.* (1990) โดยนำตัวอย่างเปลือกผลลองกอง หั่นละเอียด 1 กรัม มาบดสกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในโถงที่มีสารละลายสกัดประกอบด้วย potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 6.2 potassium chloride ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และ polyvinylpyrrolidone (PVPP) ความเข้มข้น 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำสารผสมที่ได้ไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเฉพาะของเหลวใส (supernatant) ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำเฉพาะส่วนของเหลวใส ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบเอนไซม์ ไปใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ PPO และ POD

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ PPO ดัดแปลงจากวิธีการของ Jiang & Fu (1998) โดยเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 catechol ความเข้มข้น 0.1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นเติมสารสกัดหยาบเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบที่มีสารวิเคราะห์ดังกล่าว ผสมให้เข้ากันและตั้งที่ไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ POD ดัดแปลงจากวิธีการของ Nagle & Harrod (1975) โดยเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย sodium acetate buffer ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ pH 6.0 guaiacol ความเข้มข้น 0.1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ความเข้มข้น 0.10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้นเติมสารสกัดหยาบเอนไซม์ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบที่มีสารวิเคราะห์ดังกล่าว ผสมให้เข้ากันและตั้งที่ไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ดัดแปลงจากวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) โดยนำสารสกัดหยาบเอนไซม์ที่เจือจางลง 10 เท่า ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมนลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายวิเคราะห์ ได้แก่ alkaline copper solution ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ซึ่งสารละลายนี้ประกอบด้วย sodium carbonate ความเข้มข้น 4% (น้ำหนักต่อปริมาตร): sodium hydroxide ความเข้มข้น 0.2 นอร์มอล: copper sulphate ความเข้มข้น 1% (ปริมาตรต่อปริมาตร): potassium tartrate ความเข้มข้น 2%

(น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอัตราส่วน 5 : 5 : 0.1 : 0.1 ผสมให้เข้ากัน แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 50% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองดังกล่าว ผสมให้เข้ากันแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร bovine serum albumin ซึ่งมีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด (mg/g FW)

กิจกรรมของเอนไซม์ 1 หน่วย (unit) มีค่าเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์โดยทำให้มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น 0.01 หน่วยต่อนาทีภายใต้สภาวะที่กำหนด

## 2. การวิเคราะห์ความเสียหายจากออกซิเดชัน

ความเสียหายออกซิเดชันของเปลือกผลขององุ่นวิเคราะห์จากปริมาณ ROS ที่วิเคราะห์จากปริมาณอนุมูลอิสระ  $O_2^{\bullet-}$  และ  $H_2O_2$  และวิเคราะห์ความเสียหายออกซิเดชันของเมมเบรนจากปริมาณ MDA และอัตราการรั่วไหลของประจุ

### 2.1 การวิเคราะห์ปริมาณ ROS

การวิเคราะห์ปริมาณ  $O_2^{\bullet-}$  ดัดแปลงจากวิธีการของ Jiang *et al.* (2010) โดยนำตัวอย่างเปลือกผลขององุ่นละเยียด 1 กรัม มาบดสกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในโถงที่มีสารละลายสกัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ประกอบด้วยสารละลาย phosphate buffer ความเข้มข้น 65 มิลลิโมลาร์ pH 7.8 hydroxylammonium chloride ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ แล้วนำสารผสมที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนของเหลวใสชั้นบนที่ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ไปทำปฏิกิริยากับสารละลายวิเคราะห์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยสารละลาย 4-amino benzene sulfonic acid ความเข้มข้น 17 มิลลิโมลาร์ และ naphthylamine ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ นำสารละลายผสมไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติม ether ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำเฉพาะส่วนที่ละลายน้ำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณ  $O_2^{\bullet-}$  โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร sodium nitrite ซึ่งปริมาณ  $O_2^{\bullet-}$  ที่ได้มีหน่วยเป็น นาโนโมลต่อกรัมน้ำหนักสด (nmole/g FW)

การวิเคราะห์ปริมาณ  $H_2O_2$  ดัดแปลงจากวิธีการของ Velikova *et al.* (2000) โดยนำตัวอย่างเปลือกผลขององุ่นละเยียด 1 กรัม มาบดสกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในโถงที่มีสารละลายสกัดประกอบด้วยสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำสารผสมไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนของเหลวใสชั้นบนที่ได้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายวิเคราะห์ที่ประกอบด้วย potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 390 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณ  $H_2O_2$  โดยเทียบมาตรฐานของสาร  $H_2O_2$  ซึ่งปริมาณ  $H_2O_2$  ที่ได้มีหน่วยเป็น ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักสด ( $\mu$ mole/g FW)

### 2.2 การวิเคราะห์ความเสียหายออกซิเดชันของเมมเบรน

การวิเคราะห์ปริมาณ MDA ดัดแปลงจากวิธีการของ Hodges *et al.* (1999) โดยนำตัวอย่างเปลือกผลขององุ่นละเยียด 1 กรัม มาบดสกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในโถงที่มีสารละลายสกัดประกอบด้วย Trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 0.1% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารผสมที่ได้ไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว

10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำเฉพาะส่วนของเหลวใส ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ MDA โดยนำสารสกัดหยาบที่ได้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายวิเคราะห์ประกอบด้วย TBA ความเข้มข้น 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใน TCA ความเข้มข้น 20% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำสารผสมที่ได้ไปวางในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 98-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำสารละลายผสมที่ได้นี้ไปเหวี่ยงตกตะกอน ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำเฉพาะส่วนของเหลวใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 และ 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณ MDA ซึ่งมีหน่วยเป็น ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักสด ( $\mu\text{mole/g FW}$ ) (extinction coefficient เท่ากับ  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

การวิเคราะห์อัตราการรั่วไหลของประจุ ดัดแปลงจากวิธีการของ Chan *et al.* (1985) โดยนำเปลือกของกอกมาเจาะด้วยที่เจาะจุกคอร์ก (cork borer) ให้ได้ชิ้นเปลือกผลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร จำนวน 10 ชิ้น จากนั้นนำชิ้นเปลือกผลมาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) จำนวน 3 ครั้ง แล้วใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้ววัดค่าการนำไฟฟ้าด้วยเครื่องวัดกระแสไฟฟ้า (conductivity meter: รุ่น FiveEasy FE 30 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland) จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ววัดค่าการนำไฟฟ้าอีกครั้ง นำค่าการนำไฟฟ้าที่ได้ไปคำนวณหาการรั่วไหลของประจุโดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการรั่วไหลของประจุ (\%)} = (\text{ค่าการนำไฟฟ้าที่อุณหภูมิห้อง} / \text{ค่าการนำไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส}) \times 100$$

#### การวิเคราะห์ศักยภาพรวมการต้านอนุมูลอิสระ

ทำการวิเคราะห์ศักยภาพรวมการต้านอนุมูลอิสระ 3 วิธี คือ วิธีการทำลายอนุมูลดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging) วิธีการทำลายอนุมูลเอบีทีเอส (ABTS radical scavenging) และวิธีวัดความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (ferric reducing antioxidant power: FRAP) ดังวิธีการต่อไปนี้

การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ ตามวิธีการของ Sunohara and Matsumoto (2004) โดยนำตัวอย่างเปลือกผลของกอกสด หั่นละเอียด 1 กรัม มาบดสกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในโถงที่มีสารละลายสกัดประกอบด้วยสารละลาย 80% methanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำสารผสมที่ได้ไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนของเหลวใสชั้นบนที่ได้ ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบไปใช้วิเคราะห์ศักยภาพรวมในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ABTS, DPPH และ FRAP ต่อไป

การวิเคราะห์ศักยภาพรวมการต้านอนุมูลอิสระวิธี ABTS ดัดแปลงจากวิธีการของ Huang *et al.* (2005) โดยเตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย potassium persulphate ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง แล้วนำมาเจือจางด้วย 80% ethanol ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ  $0.7 \pm 0.02$  ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ก่อนนำไปใช้ ซึ่งเรียกว่า ABTS solution จากนั้นนำ ABTS solution ที่ได้ ผสมกับสารสกัดหยาบปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร วางไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณศักยภาพรวมการต้านอนุมูลอิสระ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารโทรลอคซ์ (trolox) ซึ่งมีหน่วยเป็น ไมโครโมลของโทรลอคซ์ต่อกรัมน้ำหนักสด ( $\mu\text{mole Trolox/g FW}$ )

การวิเคราะห์ศักยภาพรวมการต้านออกซิเดชันวิธี DPPH ดัดแปลงจากวิธีการของ Mun'im *et al.* (2003) โดยเตรียมสารละลายวิเคราะห์ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ประกอบด้วยสารละลาย acetate buffer ความเข้มข้น 0.3 โมลลาร์ pH 5.5 สารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.12 มิลลิโมลลาร์ ที่ละลายใน 100% methanol และสารสกัดหยาบปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางไว้ในที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณศักยภาพรวมการต้านอนุมูลอิสระโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร Trolox ซึ่งมีหน่วยเป็น ไมโครโมลของ Trolox ต่อกรัมน้ำหนักสด ( $\mu\text{mole Trolox/g FW}$ )

การวิเคราะห์ศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP ดัดแปลงจากวิธีการของ Benzie & Strain (1999) โดยเตรียมสารละลายวิเคราะห์ปริมาตร 2.7 มิลลิลิตร ประกอบด้วยสารละลาย acetate buffer ความเข้มข้น 0.3 โมลลาร์ pH 6.3 สารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลลาร์ และ ferric chloride ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลลาร์ จากนั้นเติมสารสกัดหยาบปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ในที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณศักยภาพรวมการต้านอนุมูลอิสระโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร ferrous sulphate ซึ่งมีหน่วยเป็น ไมโครโมลของเฟอร์รัสต่อกรัมน้ำหนักสด ( $\mu\text{mole Fe}^{2+}/\text{g FW}$ )

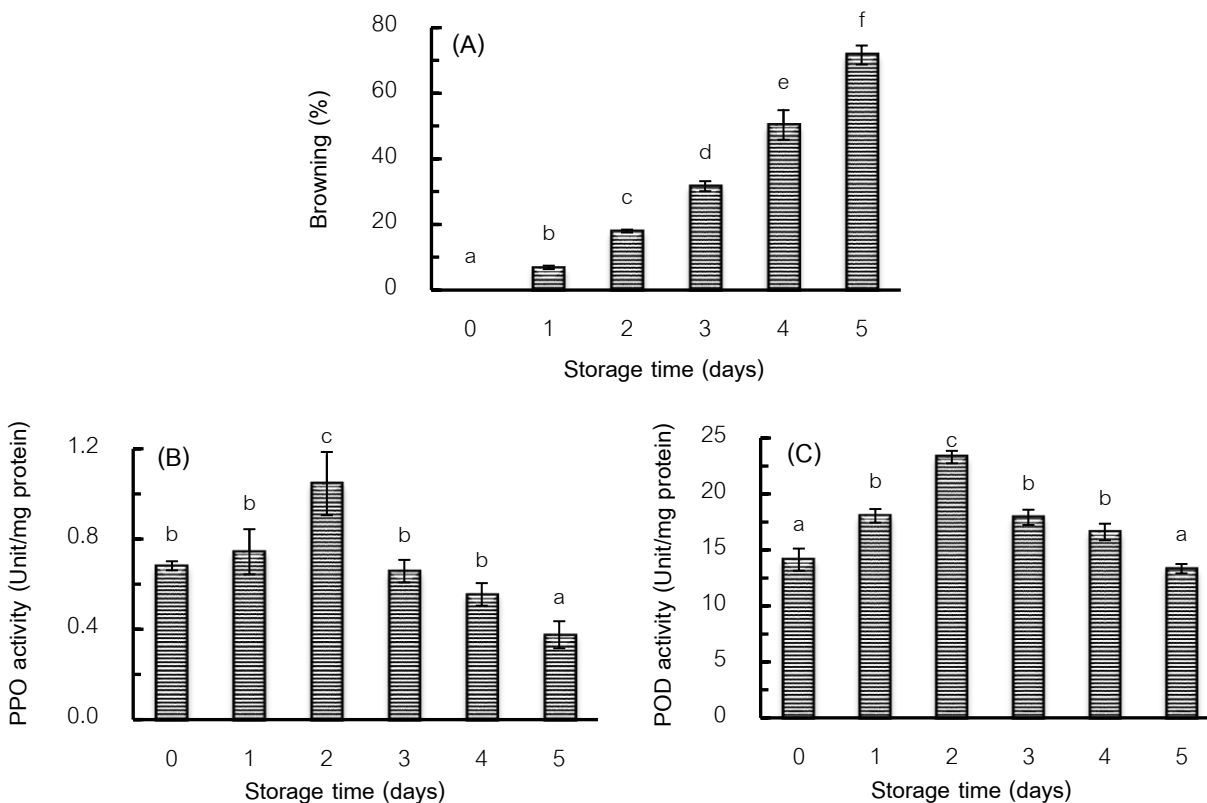
## ผลการวิจัย

### 1. การเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผล

การเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผลขององุ่นเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา โดยจะพบการเกิดสีน้ำตาลตั้งแต่วันที่ 1 หลังจากการเก็บรักษา คิดเป็นพื้นที่สีน้ำตาล 6.92% และพื้นที่การเกิดสีน้ำตาลจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 18.0 31.6 50.33 และ 71.67% ในวันที่ 2-5 ของการเก็บรักษา ตามลำดับ (ภาพที่ 1A)

กิจกรรมของเอนไซม์ PPO ของเปลือกผลขององุ่นระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเพิ่มสูงขึ้นในช่วง 2 วันแรกของการเก็บรักษา โดยกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มจาก 0.68 unit/mg protein เป็น 0.74 unit/mg protein และเพิ่มสูงสุดในวันที่ 2 ของการเก็บรักษาซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1.05 unit/mg protein ซึ่งสูงจากวันแรก 54.41% หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเรื่อย ๆ จนถึงวันสุดท้ายของการเก็บรักษา โดยวันที่ 3-5 เอนไซม์มีกิจกรรมเท่ากับ 0.66 0.55 และ 0.38 unit/mg protein ตามลำดับ (ภาพที่ 1B)

กิจกรรมของเอนไซม์ POD ของเปลือกผลขององุ่นมีการเปลี่ยนแปลงในทำนองเดียวกับกิจกรรมของเอนไซม์ PPO โดยใน 2 วันแรกของการเก็บรักษา กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นจาก 14.13 unit/mg protein เป็น 18.13 unit/mg protein และเพิ่มสูงสุดในวันที่ 2 ของการเก็บรักษาซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 23.30 unit/mg protein ซึ่งสูงจากวันแรก 64.89% จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเรื่อย ๆ จนถึงวันสุดท้ายของการเก็บรักษา โดยวันที่ 3-5 เอนไซม์มีกิจกรรมเท่ากับ 17.91 16.61 และ 3.32 unit/mg protein ตามลำดับ (ภาพที่ 1C)



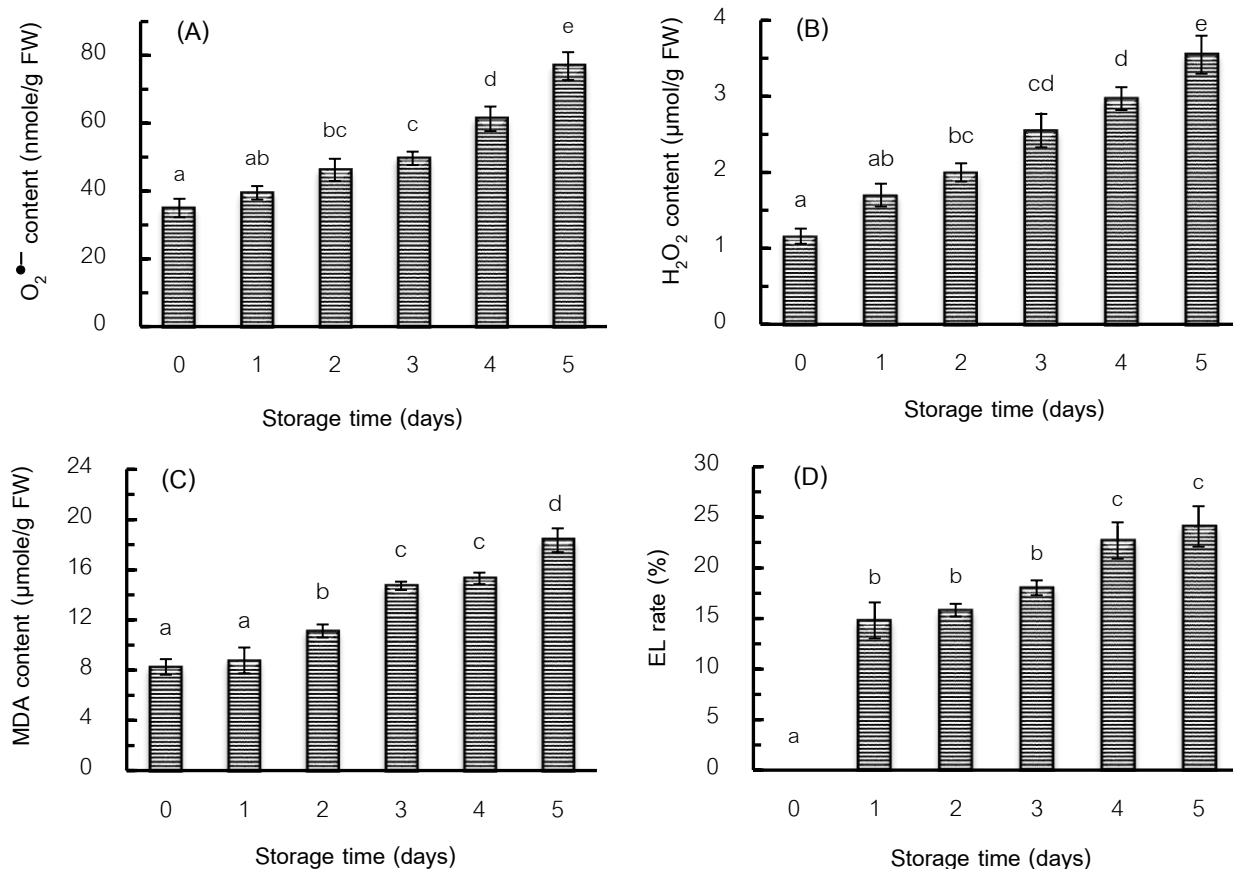
**ภาพที่ 1** การเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์พื้นที่การเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผล (A) และกิจกรรมของเอนไซม์ PPO (B) และ POD (C) ของเปลือกผลลองกองระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

## 2. ความเสียหายจากออกซิเดชัน

ปริมาณ ROS ที่วิเคราะห์จากปริมาณอนุมูลอิสระ  $O_2^{\bullet-}$  และ  $H_2O_2$  ของเปลือกผลลองกองมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา โดยมีปริมาณ 34.97-76.85 nmole/g FW (ภาพที่ 2A) และ 1.16-3.55  $\mu$ mole/g FW (ภาพที่ 2A) ตามลำดับ ในวันสุดท้ายของการเก็บรักษาปริมาณของ  $O_2^{\bullet-}$  และ  $H_2O_2$  เพิ่มขึ้นถึง 54% และ 29% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับวันเริ่มการทดลอง (day 0)

ผลการวิเคราะห์ความเสียหายออกซิเดชันของเมมเบรนพบว่าปริมาณ MDA ของเปลือกผลลองกองระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเพิ่มสูงขึ้นตลอดการเก็บรักษา โดยมีปริมาณ 8.26-18.35  $\mu$ mole/g FW (ภาพที่ 2C) และในวันสุดท้ายของการเก็บรักษาปริมาณ MDA เพิ่มขึ้น 54.98% เมื่อเทียบกับวันเริ่มการทดลอง (day 0) ส่วนอัตราการรั่วไหลของประจุของเปลือกผลลองกองระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องก็มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นตลอดการเก็บรักษา เช่นเดียวกับปริมาณอนุมูลอิสระและปริมาณ MDA โดยมีอัตราการรั่วไหลของประจุเพิ่มขึ้นถึง 24.09% (ภาพที่ 2D)

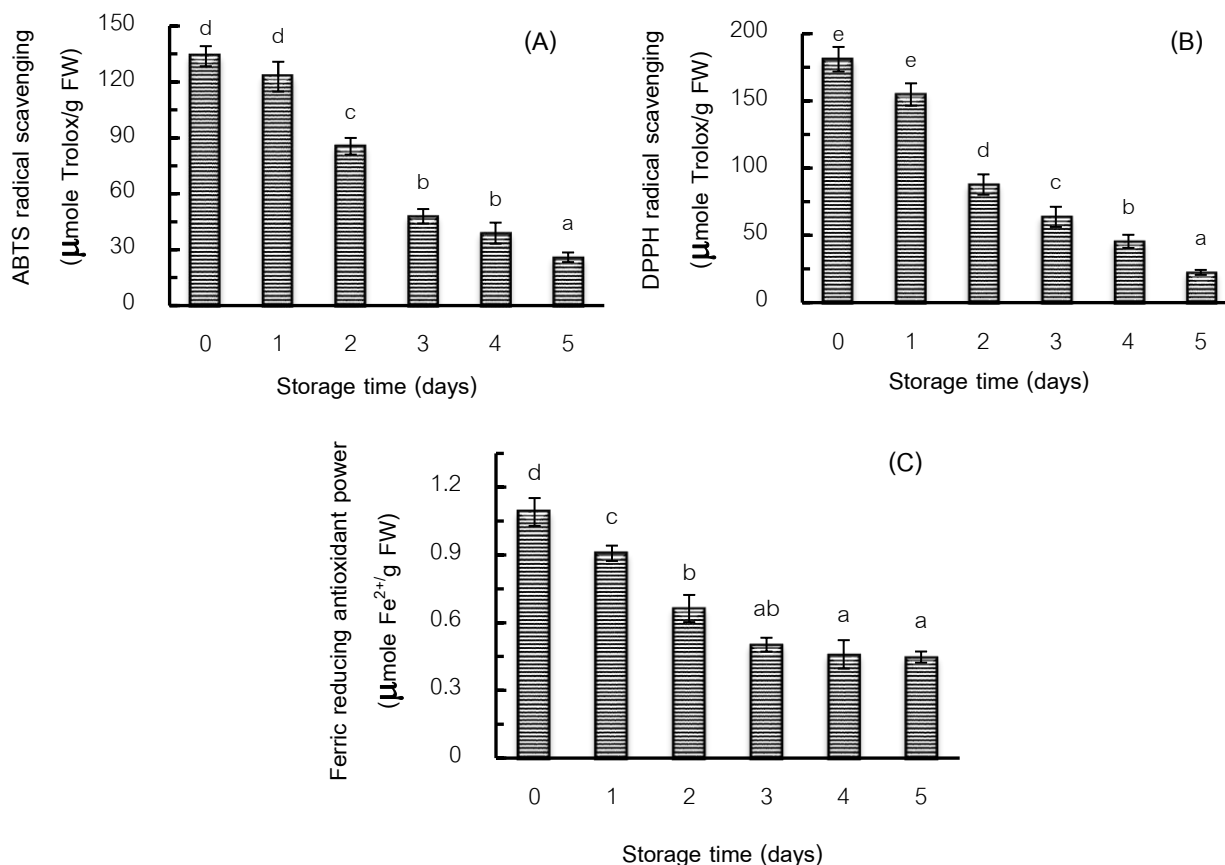




ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงการเปลี่ยนแปลงปริมาณอนุมูลอิสระ  $O_2^{\bullet-}$  (A) และ  $H_2O_2$  (B) ปริมาณ MDA (C) และอัตราการรั่วไหลของประจุ (EL rate) (D) ของเปลือกผลขององุ่นระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

### 3. ศักยภาพรวมการต้านอนุมูลอิสระ

ศักยภาพรวมการต้านอนุมูลอิสระทั้งวิธี ABTS DPPH และ FRAP ของเปลือกผลขององุ่นลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา โดยมีค่า 25.90–133.80  $\mu$ mole Trolox/g FW (ภาพที่ 3 A) 22.48–180.96  $\mu$ mole Trolox/g FW (ภาพที่ 3B) และ 0.45–1.09 ( $\mu$ mole  $Fe^{2+}$  /g FW) (ภาพที่ 3C) ตามลำดับ ในวันสุดท้ายของการเก็บรักษาพบว่า ศักยภาพรวมการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธี ลดลงจากวันที่เริ่มการทดลอง (day 0) 80.64% 87.58% และ 58.72% ตามลำดับ



**ภาพที่ 3** การเปลี่ยนแปลงศักยภาพรวมการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS (A) DPPH (B) และ FRAP (C) ของเปลือกผลลองกองระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

### วิจารณ์ผลการวิจัย

การเกิดสีน้ำตาลที่เปลือกผลลองกองระหว่างการเก็บรักษาเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา (ภาพที่ 1A) สอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ PPO และ POD ของเปลือกผลลองกองที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในสองวันแรกของการเก็บรักษา (ภาพที่ 1B และ 1C) อย่างไรก็ตามหลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง ทั้งนี้อาจจะเป็นเนื่องมาจากเกิดการเสื่อมสภาพของเอนไซม์หรือเกี่ยวข้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์นี้มีปริมาณลดต่ำลง ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงในวันที่ 3-5 ของการเก็บรักษา อย่างไรก็ตาม แม้กิจกรรมของเอนไซม์ PPO และ POD จะลดลง แต่การเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผลยังคงเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลต่อเนื่องของการเร่งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลโดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ตั้งแต่ 2 วันแรกของการเก็บรักษา

การเกิดเปลือกสีน้ำตาลและการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ PPO และ POD ของเปลือกผลลองกองระหว่างการเก็บรักษาอาจเกี่ยวข้องกับการสร้างและสะสมอนุมูลอิสระภายในเซลล์ของเปลือกผลที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันทำลายเมมเบรน เมื่อเมมเบรนได้รับความเสียหายจะมีผลทำให้เกิดการรั่วไหลของเอนไซม์ PPO และ POD ออกจากไซโตซอล และ พลาสติดี และการรั่วไหลของสารประกอบฟีนอลิกออกจากแวคิวโอล นำไปสู่ปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกโดยมีเอนไซม์ PPO

และ POD เร่งปฏิกิริยา และสร้างสารประกอบสีน้ำตาลเกิดขึ้น (Toivonen & Brummell, 2008) จึงทำให้เปลือกผลขององุ่นเกิดสีน้ำตาลระหว่างการเก็บรักษา

จากผลการศึกษาพบว่าอนุมูลอิสระทั้ง  $O_2^{\bullet-}$  และ  $H_2O_2$  มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (ภาพที่ 2A และ 2B) ทั้งนี้อาจเนื่องจากปัจจัยภายนอกที่ไม่เหมาะสมในระหว่างการเก็บรักษา เช่น การขาดน้ำ ขาดสารอาหาร การเกิดบาดแผล และการเกิดโรค มีผลชักนำการสร้างและสะสมอนุมูลอิสระให้เพิ่มสูงขึ้น ดังมีรายงานการศึกษาในผลลำไย (Chomkitichai *et al.*, 2014a) ลิ้นจี่ (Sun *et al.*, 2010) และผลโศวาท (Cao *et al.*, 2009) ซึ่งพบว่าการที่พืชได้รับปัจจัยที่ไม่เหมาะสมในระหว่างการเก็บรักษาส่งผลให้เกิดการสร้างและสะสมอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน

การสะสมอนุมูลอิสระในเปลือกผลขององุ่นเป็นสาเหตุทำให้เกิดความเสียหายออกซิเดชันของเมมเบรน ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดเปลือกสีน้ำตาลของผลขององุ่น โดยผลการศึกษาพบว่าปริมาณ MDA ที่เป็นดัชนีชี้วัดการเกิดออกซิเดชันของไขมัน เพิ่มสูงขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (ภาพที่ 2C) สอดคล้องกับการเพิ่มของปริมาณอนุมูลอิสระในเปลือกผลขององุ่น (ภาพที่ 2A และ 2B) โดยอนุมูลอิสระในกลุ่ม ROS เหล่านี้จะตั้งอะตอมของไฮโดรเจนจากโมเลกุลของไขมัน ซึ่งมีเอนไซม์ไลพอกซีจีเนส (lipoxygenase: LOX) เร่งปฏิกิริยา จากนั้นจะมีการจัดเรียงโครงสร้างโมเลกุลใหม่ในรูปคอนจูเกตไดอิน (Gill & Tuteja, 2010; Sharma *et al.*, 2012) และเมื่อมีความเข้มข้นของออกซิเจนไม่เพียงพอในสิ่งแวดล้อมทั้งคอนจูเกต ไดอิน และกรดไขมันที่เป็นอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนและอยู่ในรูป  $ROO^{\bullet}$  (Gill & Tuteja, 2010; Sharma *et al.*, 2012) กรดไขมันที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระสามารถตั้งไฮโดรเจนอะตอมอื่นจากโมเลกุลของกรดไขมันที่อยู่ข้างเคียง นำไปสู่การสร้างกรดไขมันที่เป็นอนุมูลอิสระซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาเดียวกัน มีการจัดเรียงโครงสร้างโมเลกุลใหม่เกิดเป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ของไขมัน ซึ่งสามารถแตกออกไปเป็น อัลดีไฮด์ เช่น MDA (Gill & Tuteja, 2010; Bhattacharjee, 2012) ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงเห็นได้ว่า MDA ที่เป็นดัชนีชี้วัดการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นพร้อมกับระดับของอนุมูลอิสระในระหว่างการเก็บรักษาผลขององุ่น

การเกิดออกซิเดชันของไขมันที่เป็นส่วนประกอบของเมมเบรนทำให้คุณสมบัติของเมมเบรนเปลี่ยนไป สูญเสียความเป็นสัดส่วนต่างๆ ของเซลล์ และเกิดการรั่วไหลของประจุ (Yang *et al.*, 2009) ซึ่งผลการวิจัยพบว่าในระหว่างการเก็บรักษาผลขององุ่นมีอัตราการรั่วไหลของประจุเพิ่มสูงขึ้น (ภาพที่ 2D) สอดคล้องกับปริมาณ MDA (ภาพที่ 2C) และปริมาณอนุมูลอิสระ (ภาพที่ 2A และ 2B) ที่เพิ่มสูงขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาเช่นกัน

จากการศึกษานี้จะเห็นได้ว่า การเกิดสีน้ำตาลของผลขององุ่น (ภาพที่ 1) มีความสัมพันธ์กับการเกิดออกซิเดชันของเมมเบรน และปริมาณอนุมูลอิสระ (ภาพที่ 2) ดังมีรายงานการศึกษาพบว่าปริมาณอนุมูลอิสระ ความเสียหายออกซิเดชันของเมมเบรน และเปอร์เซ็นต์พื้นที่การเกิดเปลือกสีน้ำตาลของผลขององุ่นระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องมีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Chomkitichai *et al.*, 2017, 2018) แสดงว่า หากอนุมูลอิสระมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ความเสียหายออกซิเดชันของเมมเบรน และการเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผลขององุ่นจะสูงขึ้นตามไปด้วย สอดคล้องกับการศึกษาของ Cai *et al.* (2006), Duan *et al.* (2007b), Yang *et al.* (2009), Sun *et al.* (2010), Duan *et al.* (2011), You *et al.* (2012) และ Barman *et al.* (2014)

โดยปกติทั่วไปอนุมูลอิสระกลุ่ม ROS ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์พืชระหว่างกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจและการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยในสภาวะเครียดที่มีการสร้าง ROS มากขึ้นนี้ พืชจะมีระบบต้านอนุมูลอิสระกำจัดอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะสมดุลและไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ หากระบบต้านอนุมูลอิสระไม่สามารถควบคุมระดับ ROS

ให้อยู่ในภาวะสมดุลได้จะทำให้สารชีวโมเลกุลเกิดความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน เยื่อหุ้มเซลล์และออร์แกเนลล์ถูกทำลาย เป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการสีน้ำตาลในพืชในที่สุด (Gill & Tuteja, 2010; Sharma *et al.*, 2012)

ผลจากการศึกษาศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระของผลลองกองระหว่างการเก็บรักษา ที่วิเคราะห์โดยวิธี ABTS DPPH และ FRAP (ภาพที่ 3) มีค่าลดลงตลอดการเก็บรักษา การลดลงของศักยภาพรวมในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ABTS และ DPPH แสดงให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกผลลองกองมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระลดลง ส่วนการลดลงของ FRAP แสดงให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกผลลองกองมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจน มีประสิทธิภาพลดลงระหว่างการเก็บรักษา

ศักยภาพรวมการต้านอนุมูลอิสระของเปลือกผลลองกองทั้ง 3 วิธี ที่มีแนวโน้มลดลง (ภาพที่ 3) เกิดขึ้นพร้อมกับการเกิดเปลือกสีน้ำตาลของผลลองกองที่เพิ่มขึ้นระหว่างการเก็บรักษา (ภาพที่ 1A) การลดลงของระบบต้านอนุมูลอิสระนี้สอดคล้องกับปริมาณ ROS ทั้ง  $O_2^{\bullet-}$  และ  $H_2O_2$  ที่เพิ่มขึ้นระหว่างการเก็บรักษาผลลองกอง (ภาพที่ 2A และ 2B) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดความเสียหายออกซิเดชันของเมมเบรน ดังจะเห็นจากปริมาณ MDA และอัตราการผลิตของโปรตีนที่เพิ่มสูงขึ้นระหว่างการเก็บรักษา (ภาพที่ 2C และ 2D) ความเสียหายที่เกิดขึ้นนำไปสู่ปฏิกิริยาการสร้างสารประกอบสีน้ำตาลจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกที่เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ PPO และ POD (Toivonen & Brummell, 2008) ซึ่งพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 นี้เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วใน 2 วันแรกของการเก็บรักษา (ภาพที่ 1B และ 1C) ดังนั้นจึงทำให้เกิดสีน้ำตาลของเปลือกผลลองกองขึ้นระหว่างการเก็บรักษา

### สรุปผลการวิจัย

การเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผลลองกองระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเกี่ยวข้องกับศักยภาพรวมการต้านอนุมูลอิสระและความเสียหายออกซิเดชันของเมมเบรน โดยระบบต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพลดลง เร่งการสะสมอนุมูลอิสระในกลุ่ม ROS และความเสียหายออกซิเดชันของเมมเบรนให้เพิ่มขึ้น นำไปสู่การเกิดเปลือกสีน้ำตาลของผลลองกองระหว่างการเก็บรักษา

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) สำหรับงบประมาณสนับสนุนการทำวิจัย และขอขอบคุณหลักสูตรชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตต์ ที่อนุเคราะห์ให้ใช้ห้องปฏิบัติการ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

### เอกสารอ้างอิง

- Abbasi, N.A, Akhtar, A, Hussain, A., & Ali, I. (2013). Effect of anti-browning agents on quality changes of loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindley] fruit after harvest. *Pakistan Journal of Botany*, 45, 1391-1396.
- Barman, K, Siddiqui, M.W, Patel, V.B, & Prasad, M. (2014). Nitric oxide reduces pericarp browning and preserves bioactive antioxidants in litchi. *Scientia Horticulturae*, 171, 71-77.

- Bhattacharjee, S. (2012). The language of reactive oxygen species signaling in plants. *Journal of Botany*, 2012, 1-22.
- Benzie, I.F.F., & Strain, J.J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant capacity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15-27.
- Cai, C., Chen, K., Xu, W., Zhang, W., Li, X., & Ferguson, I. (2006). Effect of 1-MCP on postharvest quality of loquat fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 40, 155-162.
- Cao, S., Zheng, Y., Wang, K., Jin, P., & Rui, H. (2009). Methyl jasmonate reduces chilling injury and enhances antioxidant enzyme activity in postharvest loquat fruit. *Food Chemistry*, 115, 1458-1463.
- Chan, H.T., Sanxter, S., & Couey, H.M. (1985). Electrolyte leakage and ethylene production induced by chilling injury of papayas. *Horticultural Science*, 20, 1070-1072.
- Chomkitichai W., Chumyarn A., Rachtanapun P., Uthaibutra J., & Saengnil K. (2014a). Reduction of reactive oxygen species production and membrane damage during storage of 'Daw' longan fruit by chlorine dioxide. *Scientia Horticulturae*, 170, 143-149.
- Chomkitichai W., Faiyue B., Rachtanapun P., Uthaibutra J., & Saengnil K. (2014b). Enhancement of the antioxidant defense system of post-harvested 'Daw' longan fruit by chlorine dioxide fumigation. *Scientia Horticulturae*, 178, 138-144.
- Chomkitichai, W., Chiangphookor, S., Kaewma, K., & Chomkitichai, W. (2017). Correlation between reactive oxygen species (ROS) contents and pericarp browning of longkong fruits during ambient temperature storage. *Agricultural Science Journal*, 48(3), 221-224. (in Thai)
- Chomkitichai, W., Junmatong, C., & Pirapak, W. (2018). Correlation between membrane damage and pericarp browning of longkong fruits during storage at ambient temperature. *Agricultural Science Journal*, 49(2), 525-528. (in Thai)
- Duan, X., Jiang, Y., Su, X., Zhang, Z., & Shi, J. (2007a). Antioxidant properties of anthocyanins extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning. *Food Chemistry*, 101, 1365-1371.
- Duan, X., Liu, T., Zhang, D., Su, X., Lin, H., & Jiang, Y. (2011). Effect of pure oxygen atmosphere on antioxidant enzyme and antioxidant activity of harvested litchi fruit during storage. *Food Research International*, 44, 1905-1911.
- Duan, X., Su, X., You, Y., Qu, H., Li, Y., & Jiang, Y. (2007b). Effect of nitric oxide on pericarp browning of harvested longan fruit in relation to phenolic metabolism. *Food Chemistry*, 104, 571-576.
- Duan, X., Wu, G., & Jiang, Y. (2007c). Evaluation of the antioxidant properties of litchi fruit phenolics in relation to pericarp browning prevention. *Molecules*, 12, 759-771.

- Gill, S.S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., & Prange, R.K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207, 604-611.
- Huang, S., Hart, H., Lee, H., & Wicker, L. (1990). A research note: Enzymatic and color change during postharvest storage of lychee fruit. *Journal of Food Science*, 55, 1762-1763.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R.L. (2005). The Chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Huque, R., Willa. R.B.H., Pristijono, P., & Golding, J.B. (2013). Effect of nitric oxide (NO) and associated control treatments on the metabolism of fresh-cut apple slices in relation to development of surface browning. *Postharvest Biology and Technology*, 78, 16-23.
- Jiang, L., Hou, T., Yuan, X., Jiang, J., & Yu, Z. (2010). Effect of storage temperature and packaging method on the decay and physiology of fresh leaves of *Gynura bicolor* D.C. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34, 858-871.
- Jiang, Y.M., & Li, Y. (2001). Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chemistry*, 73, 139-143.
- Jiang, Y.M., & Fu, J.R. (1998). Inhibition of polyphenol oxidase and the browning control of lychee fruit by glutathione and citric acid. *Food Chemistry*, 62, 49-52.
- Jiang, J., Jiang, L., Luo, H., & Yu, H. (2014). Establishment of a statistical model for browning of fresh-cut lotus root during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 92, 164-171.
- Lin, Y., Lin, H., Zhang, S., Chen, Y., Chen, M., & Lin, Y. (2014). The role of active oxygen metabolism in hydrogen peroxide-induced pericarp browning of harvested longan fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 96, 42-48.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Far, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Mun'im, A., Negishi, O., & Ozawa, T. (2003). Antioxidant compounds from *Crotalaria sessiliflora*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67, 410-414.
- Nagle, N.E., & Haard, N.F. (1975). Fractionation and characterization of peroxidase from ripe banana fruit. *Journal of Food Science*, 40, 576.
- Shao, Y., Xie, J., Chen, P., & Li, W. (2012). Changes in some chemical components and in the physiology of rambutan fruit (*Nephelium lappaceum* L.) as affected by storage temperature and packing material. *Fruits*, 68, 15-24.

- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1-26.
- Sun, D., Liang, G., Xie, J., Lei, X., & Mo, Y. (2010). Improved preservation effects of lychee fruit by combining chitosan coating with ascorbic acid treatment during postharvest storage. *African Journal of Biotechnology*, 9, 3272-3279.
- Sun, J., You, X., Li, L., Peng, H., Su, W., Li, C., He, Q., & Liao, F. (2011). Effects of a phospholipase D inhibitor on postharvest enzymatic browning and oxidative stress of litchi fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 62, 288-294.
- Sunohara, Y., Matsumoto, H. (2004). Oxidative injury induced by the herbicide quinclorac on *Echinochloa oryzicola* Vasing. and the involvement of antioxidative ability in its highly selective action in grass species. *Plant Science*, 167, 597-606.
- Toivonen, P.M.A., & Brummell, D.A. (2008). Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 48, 1-14.
- Velikova, V., Yordanov, I., & Edreva, A. (2000). Oxidation stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plant: protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151, 59-66.
- Yang, E., Lu, W., Qu, H., Lin, H., Wu, F., Yang, S., Chen, Y., & Jiang, Y. (2009). Altered energy status in pericarp browning of lychee fruit during storage. *Pakistan Journal of Botany*, 41, 2271-2279.
- Yi, C., Jiang, Y., Shi, J., Qu, H., Xue, S., Duan, X., Shi, J., & Prasad, N.K. (2010). ATP-regulation of antioxidant properties and phenolics in litchi fruit during browning and pathogen infection process. *Food Chemistry*, 118, 42-47.
- You, Y., Jiang, Y., Sun, J., Liu, H., Song, L., & Duan, X. (2012). Effects of short-term anoxia treatment on browning of fresh-cut Chinese water chestnut in relation to antioxidant activity. *Food Chemistry*, 118, 1191-1196.