

## การเปลี่ยนแปลงปริมาณและการกระจายตัวโมเลกุลของเพกทินของฝักวานิลลา Changes in Content and Molecular Size Distribution of Pectin in Vanilla Pods

พรพรรณ นุชโพพันธ์<sup>1</sup> ลำแพน ขวัญพูล<sup>1</sup> และ ธิติมา วงษ์ชีรี<sup>2</sup>  
Pornphan Nuchpophan<sup>1</sup>, Lampan Khurnpoon<sup>1</sup> and Thitima Wongsheree<sup>2</sup>

### Abstract

Vanilla pod shattering before processing is a main problem. The objective of this research was to investigate the changes in pectin content and molecular size distribution of pectin in the shattering and non-shattering zones of vanilla pods. Vanilla pods were harvested at three maturity stages: immature green 0% yellow, mature 10% yellow and over mature 50% yellow. The results showed that total pectin in the non-shattering zone was higher than that in the shattering zone. However, the over mature pods had lower water soluble pectin content than those harvested at the other stages with the non-significant difference between the shattering and non-shattering zones. Water soluble pectin content from the pods harvested at all the stages was higher in the shattering zone than that in the non-shattering zone. There was higher sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) soluble pectin content in the shattering zone with the significant difference between the shattering zone and non-shattering zone of the pods harvested at the immature green and mature stages. The non-significant difference between the shattering and non-shattering zones was found in 1,2-cyclohexanediamine tetraacetic acid (CDTA) and potassium hydroxide (KOH) soluble pectin for all the three stages. The study of molecular size distribution of pectin in showed that the molecular size distribution of pectin solubilized in water, 1,2-cyclohexanediamine tetraacetic acid (CDTA), sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) and potassium hydroxide (KOH) from the pods at the over mature stage had decreased more rapidly than that in the mature and immature green stages, respectively. In addition, the molecular size distribution of pectin in the shattering zone was distribute to smaller size than that in the non-shattering zone.

**Keywords:** shattering, pectin, molecular size distribution

### บทคัดย่อ

ฝักวานิลลามากเกิดการแตกก่อนการแปรรูป วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณและการกระจายตัวโมเลกุลของเพกทินในบริเวณรอยแตกและบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตกของฝักวานิลลา 3 ระยะการเก็บเกี่ยว ได้แก่ ระยะฝักอ่อน (สีเหลือง 0%) ฝักเริ่มเปลี่ยนสี (สีเหลือง 10%) และฝักแก่ (สีเหลือง 50%) พบว่าบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตกมีปริมาณเพกทินรวมมากกว่าบริเวณรอยแตกของฝักในทุกระยะของการเก็บเกี่ยว สอดคล้องกับปริมาณเพกทินที่ละลายได้ในน้ำในบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตกมีค่าน้อยกว่าในบริเวณรอยแตกของฝักในทุกระยะของการเก็บเกี่ยว อย่างไรก็ตาม พบว่าเมื่อเก็บเกี่ยวในระยะฝักแก่เพกทินที่ละลายได้ในน้ำมีปริมาณน้อยกว่าในระยะอื่น แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างบริเวณรอยแตกและบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตก สำหรับเพกทินที่ละลายใน  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  พบว่ามีปริมาณมากในบริเวณรอยแตก โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างบริเวณรอยแตกและบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตกในระยะฝักอ่อนและฝักเริ่มเปลี่ยนสี ส่วนปริมาณเพกทินที่ละลายในสารละลาย CDTA และ KOH พบว่าไม่แตกต่างกันระหว่างบริเวณรอยแตกและบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตกของฝักในทุกระยะของการเก็บเกี่ยว เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวโมเลกุลของเพกทิน พบว่าระยะฝักแก่มีการกระจายตัวโมเลกุลของเพกทินที่ละลายในน้ำ CDTA,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  และ KOH ลดลงมากกว่าระยะฝักเริ่มเปลี่ยนสีและฝักอ่อน ตามลำดับ โดยบริเวณรอยแตกมีการกระจายตัวโมเลกุลของเพกทินลดลงมากกว่าบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตก

**คำสำคัญ:** รอยแตก เพกทิน การกระจายตัวโมเลกุล

<sup>1</sup> หลักสูตรพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

<sup>1</sup> Program of Horticulture, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520

<sup>2</sup> สำนักวิจัยและบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ 10140

<sup>2</sup> Institute for Scientific and Technological Research and Services, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok 10140

## คำนำ

วานิลลา (Vanilla) อยู่ในวงศ์กล้วยไม้ (Orchidaceae) มีถิ่นกำเนิดในประเทศเม็กซิโก ผลผลิตของวานิลลามีคุณค่าทางเศรษฐกิจมาก ปริมาณการใช้และการนำเข้าฝักวานิลลาจากต่างประเทศ ในปี 2542-2550 รวม 2,997 และ 6,940 กิโลกรัม มูลค่าประมาณ 4.34 ล้านบาท และ 0.40 ล้านบาท ตามลำดับ และความต้องการผลผลิตวานิลลามีแนวโน้มมากขึ้น (สิริพร และคณะ, 2552) ประโยชน์ของฝักวานิลลาคือการนำกลิ่นมาใช้ในการปรุงแต่งกลิ่น รสอาหาร รวมทั้งเครื่องดื่ม ซึ่งฝักจะมีกลิ่นหอมเพิ่มขึ้นเมื่อสีของฝักเข้มขึ้น และค่อยๆ ลดลงเรื่อยๆ จนในที่สุดหมดกลิ่น ฝักวานิลลาที่มีคุณภาพดีและเหมาะสมกับการแปรรูป คือ ฝักแก่ โดยปลายฝักจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แต่ในขณะนี้นักเกิดการแตกของฝัก (Minoo *et al.*, 2006) เกิดความเสียหาย ทั้งก่อนการบ่ม ระหว่างการบ่ม หรือในกระบวนการแปรรูปฝัก การแตกของฝักพบว่าเป็นปัญหาในทางการเกษตรอย่างมาก เมื่อเมล็ดภายในเจริญเติบโตเต็มที่ฝักจะเหี่ยวและแตก บางกรณีฝักอาจแตกก่อนที่เมล็ดพัฒนาเต็มที่ ก่อให้เกิดความเสียหาย (จริงแท้, 2549; Patterson, 2001)การแตกของผลหรือฝักมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ ได้แก่ เพกทิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส โดยมีเอนไซม์ที่มีบทบาทเกี่ยวข้อง เช่น polygalacturonase (PG) และ pectin methylesterase (PME) เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับการสลายโมเลกุลของผนังเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวของโมเลกุล (Khumpoon *et al.*, 2008) โดยเฉพาะเพกทินที่ก่อให้เกิดการแตกของผลหรือฝักในพืชบางชนิด รวมทั้งฝักวานิลลา จึงได้ทำการศึกษาปริมาณและการกระจายตัวโมเลกุลของเพกทินของฝักวานิลลา

## อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บตัวอย่างฝักวานิลลาจากแปลงปลูกในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ เดือนมกราคม ถึง มีนาคม นำฝักวานิลลาบรรจุในถุงพลาสติกเจาะรู ขนส่งฝักวานิลลามาทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว หลักสูตรพืชสวน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design ประกอบด้วย 3 ทรีเมนต์ ได้แก่ ฝักอ่อน (สีเหลือง 0%) ฝักเริ่มเปลี่ยนสี (สีเหลือง 10%) และฝักแก่ (สีเหลือง 50%) โดยแต่ละทรีเมนต์ใช้ฝักวานิลลา 20 ฝัก จากนั้นทำการตัดชิ้นตัวอย่างเนื้อเยื่อบริเวณรอยแตกและบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตกของฝัก สกัดแยกเฮมาผนังเซลล์ออกจากส่วนอื่นๆ ด้วยเอทานอล 95% บดให้ละเอียดและกรองด้วยผ้าขาวบาง นำเฉพาะส่วนเนื้อที่กรองได้มาทำการล้างด้วยอะซีโตน ปริมาตร 20 ml นำไปอบในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างแห้งมาบดละเอียด นำไปสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณเพกทินรวม (total pectin) และเพกทินที่ละลายได้ในสารละลายต่างๆ (pectin fractions) ตามลำดับ คือ ปริมาณเพกทินที่ละลายได้ในน้ำ ปริมาณเพกทินที่ละลายใน CDTA ปริมาณเพกทินที่ละลายใน Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> และปริมาณเพกทินที่ละลายใน KOH นำตัวอย่างที่สกัดได้จากแต่ละขั้นตอนไปวัดปริมาณเพกทิน ดัดแปลงตามวิธีการของ Brummell และ Labavitch (1997) โดยดูดตัวอย่างจากแต่ละหลอด sodium tetraborate (Na<sub>2</sub>b<sub>4</sub>o<sub>7</sub>) ความเข้มข้น 0.0125 M ใน conc. sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ปริมาตร 4 ml เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย m-hydroxyphenyl ความเข้มข้น 0.15% ใน sodium hydroxide (NaOH) ความเข้มข้น 0.5% ปริมาตร 20  $\mu$ l เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 520nm การศึกษาการเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวโมเลกุลของเพกทิน โดยนำตัวอย่างที่ได้จากการสกัดเพกทินที่ละลายในสารละลายชนิดต่างๆ ข้างต้น ปริมาตร 5 ml นำไปโหลดตัวอย่างลงบนคอลัมน์การกระจายตัว 200 cm<sup>3</sup> ที่บรรจุด้วย sepharose 4B จากนั้นชะด้วยสารละลาย sodium acetate buffer pH 6.0 โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ของสารผ่านคอลัมน์เท่ากับ 1.33 cm<sup>3</sup>/min เก็บตัวอย่างที่เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ในหลอดทดลองหลอดละ 3 ml จากนั้นนำตัวอย่างไปวัดปริมาณเพกทินเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น (Brummell and Labavitch, 1997)

## ผลการทดลอง

### การเปลี่ยนแปลงปริมาณเพกทินของฝักวานิลลา

จากการสกัดเพื่อหาปริมาณเพกทินของฝักวานิลลา พบว่าเพกทินรวมบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตกมีปริมาณมากกว่าบริเวณที่เกิดรอยแตกในทุกๆระยะของการเก็บเกี่ยว โดยระยะฝักแก่มีปริมาณเพกทินรวมในบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตกมากที่สุด คือ 56.98  $\mu$ g galacturonic acid/mg AIS สอดคล้องกับปริมาณเพกทินที่ละลายได้ในน้ำในบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตกมีค่าน้อยกว่าบริเวณรอยแตกของฝักในทุกๆระยะของการเก็บเกี่ยว อย่างไรก็ตาม พบว่าเมื่อเก็บเกี่ยวในระยะฝักแก่เพกทินที่ละลายได้ในน้ำมีปริมาณน้อยกว่าในระยะอื่น แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างบริเวณรอยแตกและบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตก สำหรับเพกทินที่ละลายใน Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> มีปริมาณมากในบริเวณรอยแตก โดยในระยะฝักอ่อนมีปริมาณมากที่สุด คือ 21.74  $\mu$ g galacturonic acid/mg AIS และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างบริเวณรอยแตกและบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตก ในระยะฝักอ่อนและฝักเริ่มเปลี่ยนสี

ส่วนปริมาณเพกทินที่ละลายในสารละลาย CDTA และ KOH มีค่าไม่แตกต่างกันระหว่างบริเวณรอยแตกและบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตกของฝักในทุกระยะของการเก็บเกี่ยว (Table 1)

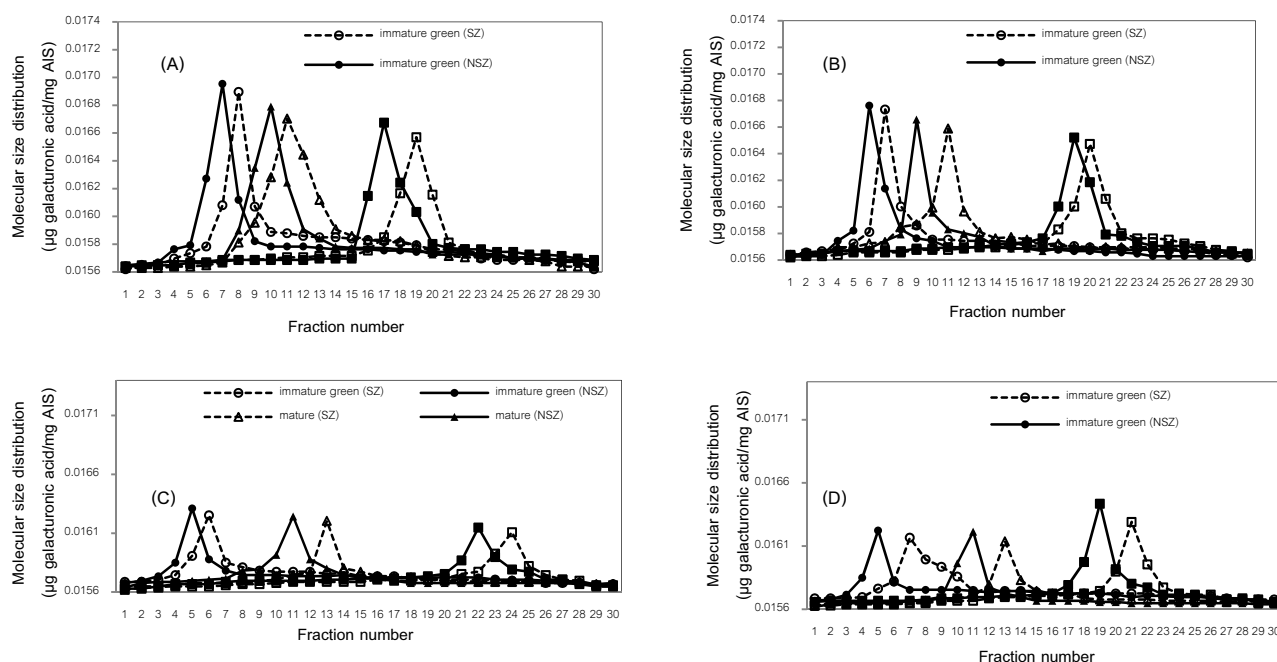
### การเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวโมเลกุลของเพกทิน

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวโมเลกุลของเพกทิน พบว่าระยะฝักแก่มีการกระจายตัวโมเลกุลของเพกทินที่ละลายในน้ำ CDTA,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  และ KOH ลดลงมากกว่าระยะฝักเริ่มเปลี่ยนสีและฝักอ่อน ตามลำดับ และบริเวณรอยแตกของฝักวานิลลา มีการกระจายตัวโมเลกุลของเพกทินลดลงมากกว่าบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตกในทุกระยะของการเก็บเกี่ยว (Figure 1)

**Table 1** Changes in pectin content in shattering zone (SZ) and non-shattering zone (NSZ) from three maturity stages of vanilla pods

	Stages of harvest					
	Immature green 0% yellow		Mature 10% yellow		Over mature 50% yellow	
	SZ	NSZ	SZ	NSZ	SZ	NSZ
Total pectin	50.22±1.2 bB <sup>1</sup>	52.79±1.6 bA	53.65±0.5 aB	55.32±0.1 abA	52.82±0.3 aB	56.98±0.3 aA
Water soluble pectin	36.53±0.5 aA	35.49±0.8 aA	34.45±0.1 bA	30.52±0.5 bB	31.63±0.5 cA	30.28±0.1 bA
CDTA soluble pectin	28.13±1.9 aA	29.42±1.8 aA	25.84±0.7 bA	23.20±1.0 bA	18.58±0.5 cA	17.50±0.2 cA
$\text{Na}_2\text{CO}_3$ soluble pectin	21.74±1.7 aA	16.60±0.5 aB	17.09±0.5 bA	13.69±1.4 bB	15.04±0.3 cA	14.59±0.5 abA
KOH soluble pectin	6.05±0.2 aA	5.21±0.2 aA	5.73±0.4 abA	5.25±0.3 aA	4.83±0.4 bA	4.00±0.8 bA

<sup>1</sup> Mean ± SD followed by different small or capital letters within row are significantly different by DMRT,  $P < 0.05$



**Figure 1** Molecular size distribution of water (A), CDTA (B),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (C) and KOH (D) soluble fraction in shattering and non-shattering zone from three maturity stages of vanilla pods

### วิจารณ์ผล

จากการทดลอง พบว่าระยะการเก็บเกี่ยวของฝักวานิลลา มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณและการกระจายตัวโมเลกุลของเพกทิน รวมทั้งบริเวณรอยแตกและบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตก โดยบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตกมีปริมาณเพกทินรวมมากกว่าบริเวณรอยแตกของฝักในทุกระยะของการเก็บเกี่ยว สอดคล้องกับปริมาณเพกทินที่ละลายได้ในน้ำ ในบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตกมีค่าน้อยกว่าในบริเวณรอยแตกของฝักในทุกระยะของการเก็บเกี่ยว นอกจากนี้ในระยะเวลาฝักแก่เพกทินที่ละลายได้ในน้ำจะมากกว่าระยะฝักเริ่มเปลี่ยนสีและระยะฝักอ่อน เนื่องจากปริมาณของเพกทินที่ละลายได้ในน้ำเพิ่มขึ้นตามการพัฒนาของการ

สูง โดยมีค่าเพิ่มมากขึ้นที่ระยะผลสุกหรือฝักแก่ ส่วนเพกทินที่ละลายใน CDTA และ  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  มีปริมาณลดลงเมื่อความสูงเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับพีชชนิดอื่น เช่น มะเขือเทศ (Huber, 1983) องุ่น (Nunan *et al.*, 1998) ทุเรียน (Khumpoon *et al.*, 2008) และมะละกอ (วิชชา และคณะ, 2554) เป็นต้น และในขณะที่ระยะฝักแก่มีปริมาณเพกทินที่ละลายได้ในน้ำเพิ่มมากขึ้น ส่วนที่ไม่ละลายลดลง เช่นเดียวกับแกนของโมเลกุลของเพกทินก็จะถูกสลายให้เล็กลงเช่นกัน (จริงแท้, 2550; Rugkong *et al.*, 2010) โดยพบว่าการกระจายตัวโมเลกุลของเพกทินบริเวณรอยแตกของฝักวานิลลาที่มีการกระจายตัวลดลงมากกว่าบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตก และการกระจายตัวโมเลกุลของเพกทินที่ละลายในน้ำ CDTA,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  และ KOH ในระยะฝักแก่ลดลงมากกว่าในระยะฝักเริ่มเปลี่ยนสีและระยะฝักอ่อน แสดงให้เห็นว่าการแตกของฝักวานิลลาเกี่ยวข้องกับการสลายโมเลกุลของผนังเซลล์ โดยเฉพาะเพกทิน

### สรุป

บริเวณที่เกิดรอยแตกมีปริมาณเพกทินรวมน้อยกว่าบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตก ส่วนบริเวณรอยแตกมีปริมาณเพกทินที่ละลายได้ในน้ำมากกว่าบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตกของฝักในทุกระยะของการเก็บเกี่ยว โดยระยะฝักแก่มีปริมาณเพกทินรวมในบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตกมากที่สุด ในขณะที่ระยะฝักอ่อนมีปริมาณเพกทินที่ละลายได้ในน้ำบริเวณรอยแตกมากที่สุด และบริเวณรอยแตกมีการกระจายตัวโมเลกุลของเพกทินที่ละลายได้ในสารละลายชนิดต่างๆ ลดลงมากกว่าบริเวณที่ไม่เกิดรอยแตก โดยในระยะฝักแก่มีการกระจายตัวโมเลกุลของเพกทินลดลงมากกว่าระยะฝักเริ่มเปลี่ยนสีและฝักอ่อน ตามลำดับ

### คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง อ. แม่วาง จ. เชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างฝักวานิลลาและขอขอบคุณห้องปฏิบัติการหลังการเก็บเกี่ยว หลักสูตรพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร ที่สนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ในการทำงานวิจัยครั้งนี้

### เอกสารอ้างอิง

- จริงแท้ ศิริพานิช. 2550. ชีววิทยาหลังการเก็บเกี่ยวและการหายใจของพืช. โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ, นครปฐม. 453 หน้า.
- วิชชา ครอบงูติ วาริช ศรีละออง และ ศิริชัย กัลยาณรัตน์. 2554. การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของผนังเซลล์ของมะละกอพันธุ์แขกดำและเรดมาราดอลที่ระยะความแก่ต่างๆ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 42: 107-110.
- สิริพร สีแดง, อติมา วงษ์ศรี, สุเมธ ทานเจริญ, วันเพ็ญ วรวงศ์พงศา และ ชนะ พรหมทอง. 2553. การผลิต การตลาดและการวิจัยวานิลลาในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 41: 469-472.
- Brummell, D.A. and J.M. Labavitch. 1997. Effect of antisense suppression of endopolygalacturonase activity on polyuronide molecular weight in ripening tomato fruit and in fruit homogenates. *Plant Physiology* 115: 717-725.
- Huber, D. J. 1983. The role of cell wall hydrolases in fruit softening. *Horticulture Review Journal* 5: 169-215.
- Khurnpoon, L., J. Siriphanich and J. M. Labavitch. 2008. Cell wall metabolism during durian fruit dehiscence. *Postharvest Biology and Technology* 48: 391-401.
- Minoo, D., N. K. Babu and K. V. Peter. 2006. Conservation of vanilla species, in vitro. *Scientia Horticulturae*. 110: 175-180.
- Nunan, J.K., I.M.Sims, A. Bacic, S. P. Robinson and G. B. Fincher. 1998. Change in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiology* 118: 783-792.
- Patterson, S. E. 2001. Cutting loose: Abscission and dehiscence in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 126: 494-500.
- Rugkong, A., J. K. C. Rose, S. J. Lee, J. J. Giovannoni, M. A. O'Neill and C. B. Watkins. 2010. Cell wall metabolism in cold-stored tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* 57: 106-113.