

17 MAY 2002



**THE NATURE OF ENZYMATIC BROWNING REACTION IN
SOYBEAN PASTE**

KIETTIPUM PHONTREE

**With compliments
of**

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2002

ISBN 974-041-271-8

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH

K477

2002

C.2

Copyright by Mahidol University

4036467 SCBT/M : MAJOR : BIOTECHNOLOGY ; M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)
KEY WORD : POLYPHENOL OXIDASE / ENZYMATIC BROWNING /
SOYBEAN PASTE

KIETTIPUM PHONTREE : THE NATURE OF ENZYMATIC
BROWNING REACTION IN SOYBEAN PASTE. THESIS ADVISORS: SITTIWAT
LERTSIRI, Ph.D., APINYA ASSAVANIG, Ph.D., AMARET BHUMIRATANA,
Ph.D. 116 P. ISBN 974-041-271-8

The enzymatic browning reaction occurs in various vegetables, fruits, and mushrooms. Soybean paste is a mold-fermented food which is used as a condiment. During soybean paste fermentation, browning development appears. This browning reaction is possibly caused by the non-enzymatic and enzymatic browning reactions. The non-enzymatic browning reaction is caused by the interaction between amino compounds and reducing sugars.

This thesis investigated the polyphenol oxidase activity in moromi and the culture broth of *A. oryzae* MUTK which is used as a mold koji for soybean paste and soy sauce. The changes of polyphenolic compounds as substrates of polyphenol oxidase, and carbonyl compounds, which were oxidized products of the polyphenolic compounds were monitored. The effect of some chemical and physical conditions such as NaCl concentrations, enzyme concentrations, substrate concentrations, temperature, oxygen, light, and the soybean extract in the culture broth of *A. oryzae* MUTK were investigated. In addition, the influence of the water from the factory used in the manufacturing of soybean paste on the polyphenol oxidase activity was investigated in *A. oryzae* MUTK culture broth.

During the moromi fermentation, the moromi samples were withdrawn on the 1st, 2nd, and 6th day of the fermentation. The native moromi and the moromi in phosphate buffer (pH 6.0) were determined for their enzyme activity. The highest activity was on the 2nd day of the fermentation.

The results showed that the most active compound among substrates tested in both moromi and the culture broth of *A. oryzae* MUTK was hydroquinone, while sodium sulfite showed the highest inhibitory effect on enzyme activity. The NaCl inhibited polyphenol oxidase activity in the culture broth of *A. oryzae* MUTK. Along with the progress of the browning reaction, polyphenolic compounds decreased, while carbonyl compounds tended to increase. The browning was dependent on both protein and substrate concentrations.

The temperature at 37°C showed the highest enzyme activity and oxygen enhanced the enzyme activity. On the other hand, light had no effect on enzyme activity. In the dialysate of the culture broth of *A. oryzae* MUTK, the enzyme specific activity was lower than in the native cultured broth. The soybean extract which supplemented the culture broth of *A. oryzae* MUTK promoted the growth of mold and enzyme activity. The water from the factory used for manufacturing of soybean paste had no effect on browning development in the *A. oryzae* MUTK culture broth.

These findings indicate that enzymatic browning reaction can be increased best by using hydroquinone, whereas sodium sulfite inhibited enzyme activity.

4036467 SCBT/M สาขาวิชา: เทคโนโลยีชีวภาพ; วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

เกียรติภูมิ พลตรี : การศึกษาการเกิดสีน้ำตาล โดยเอ็นไซม์ในเต้าเจี้ยว (THE NATURE OF ENZYMATI
BROWNING REACTION IN SOYBEAN PASTE). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : สิทธิวัฒน์ เลิศศิริ,
Ph.D., อภิญญา อิศวานิก, Ph.D., อมเรศ ภูมิรัตน, Ph.D. 116 หน้า ISBN 974-041-271-8

ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลแบบใช้เอ็นไซม์พบได้ทั่วไปทั้งในผักและผลไม้ เอ็นไซม์ที่มีส่วนร่วมในการเร่ง
ปฏิกิริยาดังกล่าวคือเอ็นไซม์ polyphenol oxidase (PPO) เต้าเจี้ยวเป็นเครื่องปรุงแต่งอาหารชนิดหนึ่งซึ่งทำมาจาก
การหมักถั่วเหลืองกับเชื้อรา ในขั้นตอนของการหมักเต้าเจี้ยว จะพบปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลเกิดขึ้น ซึ่งปฏิกิริยาการ
เกิดสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นนี้อาจเกิดขึ้นมาจากทั้งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลแบบไม่ใช้เอ็นไซม์และใช้เอ็นไซม์ โดย
ปฏิกิริยาแบบไม่ใช้เอ็นไซม์จะเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบอะมิโนและน้ำตาลรีดิวซ์

การวิจัยนี้ทำการศึกษากิจกรรมของเอ็นไซม์ PPO ในเต้าเจี้ยว โดยจะทำการศึกษากิจกรรมของเอ็นไซม์
ชนิดนี้ทั้งในโมโรมิซึ่งได้มาจากโรงงานอุตสาหกรรมผู้ผลิตและในน้ำเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* MUTK ซึ่งเป็น
ราที่ใช้ในการผลิตโคจิของเต้าเจี้ยวและซีอิ๊ว นอกจากนั้นยังทำการศึกษการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารประกอบ
ฟีนอลซึ่งเป็นสับสเตรทของเอ็นไซม์ และสารประกอบคาร์บอนิล ซึ่งเป็นสารมัธยคันค้ของปฏิกิริยาที่เกิดจากการถูก
ออกซิไดซ์ของสารประกอบฟีนอล อีกทั้งยังศึกษาผลของปัจจัยทางเคมีและทางกายภาพบางอย่างเช่น ความเข้มข้น
ของโซเดียม คลอไรด์, ความเข้มข้นของเอ็นไซม์และสับสเตรท, อุณหภูมิ, ออกซิเจน, แสง, และสารสกัดจากถั่ว
เหลืองต่อกิจกรรมของเอ็นไซม์ PPO ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *A. oryzae* MUTK นอกจากนี้ได้ศึกษาอิทธิพลของน้ำที่ใช้
ผลิตเต้าเจี้ยวในโรงงาน ว่ามีผลกระทบต่อกิจกรรมของเอ็นไซม์ PPO ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *A. oryzae* MUTK อย่างไร

โมโรมิที่ได้จากการหมักเต้าเจี้ยวทั้งที่เติมและไม่ถูกเติมด้วยบัฟเฟอร์ (pH 6.0) ของวันที่ 1, 2 และ 6 ของ
การหมัก จะพบกิจกรรมของเอ็นไซม์ PPO และในวันที่ 2 ของการหมักจะพบกิจกรรมของเอ็นไซม์สูงสุด จากผล
การทดลองพบว่าสับสเตรทที่ดีที่สุดในกลุ่มของสับสเตรทที่ทำการศึกษา ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์สูงสุดทั้งใน
โมโรมิและน้ำเลี้ยงเชื้อ *A. oryzae* MUTK คือสารประกอบไฮโดรควิโนน และสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งกิจกรรมของ
เอ็นไซม์ได้มากที่สุดคือ สารโซเดียม ซัลไฟด์ โซเดียม คลอไรด์มีผลในการยับยั้งกิจกรรมของเอ็นไซม์ PPO ในน้ำ
เลี้ยงเชื้อของ *A. oryzae* MUTK

ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ PPO ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *A. oryzae* MUTK พบว่า สารประกอบ
ฟีนอลลดลง ในขณะที่สารประกอบคาร์บอนิลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และยังพบว่ากิจกรรมการเกิดสีน้ำตาลโดยเอ็น
ไซม์จะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของโปรตีนและสับสเตรท

อุณหภูมิที่ 37 °C เป็นอุณหภูมิที่ทำให้เกิดกิจกรรมของเอ็นไซม์ PPO สูงสุด และพบว่าอากาศจะช่วย
เสริมกิจกรรมของเอ็นไซม์ ในขณะที่แสงไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอ็นไซม์ การทำ dialysis น้ำเลี้ยงเชื้อของ *A.*
oryzae MUTK และทำให้ dialysate ที่ได้ ให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอ็นไซม์ต่ำกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ผ่านการ
ทำ dialysis สารสกัดจากถั่วเหลืองที่เติมลงไปใ้ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *A. oryzae* MUTK จะช่วยสนับสนุนทั้งการเจริญ
เติบโตของ *A. oryzae* MUTK และกิจกรรมของเอ็นไซม์ PPO น้ำที่ใช้ในโรงงาน ไม่มีผลกระทบต่อปฏิกิริยาการ
เกิดสีน้ำตาลในน้ำเลี้ยงเชื้อ *A. oryzae* MUTK