

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

มะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง

มะม่วงนับเป็นผลไม้ที่ชาวตะวันออกนิยมรับประทานมากที่สุด โดยเฉพาะสำหรับชาวเอเชียแล้ว มะม่วงจัดเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญมากที่สุด เท่าเทียมกับแอปเปิลที่มีความสำคัญต่อชาวอเมริกันและยุโรป ชาวอินเดียเชื่อว่ามะม่วงเป็นไม้ผลที่มีการเพาะปลูกมาแล้วไม่น้อยกว่า 4,000 ปี (เกศินี, 2530) มะม่วงน้ำดอกไม้ สีทองเป็นมะม่วงสายพันธุ์ที่รับประทานผลสุก โดยเป็นสายพันธุ์ที่กลายจากพันธุ์น้ำดอกไม้เป็นพันธุ์เบา มีสีผิวเหลืองนวลตั้งแต่ยังไม่สุกจัด เมื่อนำไปป่มจะมีสีเหลืองสดใสมากขึ้น (ธวัชชัยและศิวาพร, 2542) มะม่วงน้ำดอกไม้สีทองดิบจะมีรสเปรี้ยว แต่เมื่อสุกจะมีรสหวาน มีกลิ่นหอม มีเนื้อมาก มีสีเหลืองอมส้ม มีเมล็ดบาง เนื้อไม่มีเส้น และมีน้ำหนักต่อผลประมาณ 300-400 กรัม (ธนวิตต, มปป) มะม่วงน้ำดอกไม้สีทองมีข้อดีกว่ามะม่วงน้ำดอกไม้ธรรมดา คือ มีเปลือกหนา บ่มง่าย ทนต่อแมลงวันทอง และการขนส่ง (พานิชย์, 2544) มะม่วงน้ำดอกไม้สีทองมีระยะการวางจำหน่ายหลังสุกก่อนข้างนาน ให้ผลผลิตเฉลี่ย 300 ผลต่อต้น มีอายุการเก็บเกี่ยว 115 วัน นับตั้งแต่ออกดอกร้อยละ 50 หรือ 93 วันหลังจากติดผล จึงเหมาะสำหรับการส่งออกจำหน่ายต่างประเทศ มะม่วงน้ำดอกไม้สามารถปลูกได้คุณภาพดีในดินร่วนเหนียวและดินร่วนปนทราย (กรมวิชาการเกษตร, 2545) จึงนับว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่สามารถทำรายได้ให้กับเกษตรกร พ่อค้าและประเทศ ได้เป็นจำนวนมากในแต่ละปี การส่งออกเพื่อหารายได้ให้กับประเทศจึงมีความหมายมากสำหรับประเทศไทย อย่างไรก็ตาม มะม่วงน้ำดอกไม้ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากสามารถปลูกได้ในเฉพาะบางพื้นที่เท่านั้น และยังมีปริมาณไม่เพียงพอกับความต้องการของตลาด นอกจากนี้มะม่วงในรูปผลสด ยังเป็นผลผลิตที่เน่าเสียได้ง่าย (perishable) ซึ่งเนื่องจากการชอกช้ำระหว่างการเก็บเกี่ยวและการขนส่ง ตลอดจนการเกิดโรคระหว่างการเก็บรักษา จึงทำให้มีอายุการวางจำหน่ายสั้นลง โดยทั่วไปมะม่วงเป็นผลไม้ที่มีการเสื่อมสภาพหลังการเก็บเกี่ยวอย่างรวดเร็ว เพราะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาจากการหายใจ การคายน้ำ และการผลิตก๊าซเอทิลีน (ethylene) (คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, 2546) ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของสี กลิ่น และเนื้อสัมผัส ทำให้คุณภาพของมะม่วงลดลง และมีอายุการเก็บรักษาที่สั้น

เอทิลีนเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชตั้งแต่ระยะการเจริญเติบโต การพัฒนา การแก่ การสุก และการเสื่อมสภาพ (दनัย, 2540) ทั้งนี้เพราะเอทิลีนสามารถกระตุ้นเนื้อเยื่อทุกชนิดให้มีอัตราการหายใจสูงขึ้น และจะกระตุ้นให้ผลมะม่วงเกิดการสุกได้เร็วขึ้น (จรัสแท้, 2544) การสังเคราะห์เอทิลีนของมะม่วงจะมีสารเริ่มต้นคือ เมทไธโอนีน (methionine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่ง โดยที่เมทไธโอนีนจะเปลี่ยนไปเป็น S-adenosyl methionine แล้วเปลี่ยนต่อไปเป็น 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid และเป็นเอทิลีน ตามลำดับ โดยที่คาร์บอนอะตอมที่ 3 และ 4 ของเมทไธโอนีนจะกลายเป็นคาร์บอนของเอทิลีน ในการสังเคราะห์นี้จะผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา การสังเคราะห์เอทิลีนจะหยุดชะงักเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ดังนั้นการรักษาคุณภาพของผลมะม่วงสดให้มีอายุการเก็บนานขึ้นตลอดระยะเวลาการขนส่ง จึงสามารถทำได้โดยการชะลอการสุก

ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีมาใช้เพื่อลดการสูญเสียดังกล่าว ซึ่งทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาของมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยวได้ยาวนานขึ้น เช่น การเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำร่วมกับสภาพบรรยากาศดัดแปลง (Modified Atmosphere : MA) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความสะดวกในการจัดการ และทำให้อัตราการหายใจของผลผลิตลดลง มีอัตราการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีลดลง รวมทั้งมีการสุกได้ช้าลง MA เป็นเทคนิคที่มี

การปรับสัดส่วนบรรยากาศภายในบรรจุภัณฑ์ให้มีก๊าซออกซิเจน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซเอทิลีน และความชื้นผ่านด้วยอัตราที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังเป็นการลดปริมาณออกซิเจน และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ ได้แก่ รา (mold) และแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ (aerobic bacteria) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสีย การลดออกซิเจนยังช่วยลดอัตราการหายใจ (respiration rate) ช่วยชะลอการสุกของมะม่วงได้ (พรชัย และ ดวงใจ, มปป)

อย่างไรก็ตาม การเก็บรักษามะม่วงในบรรจุภัณฑ์ดัดแปลงบรรยากาศ อาจจะทำให้ผลไม้มีการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน ทำให้ผลไม้มีกลิ่นและมีรสชาติที่ผิดปกติที่ไม่สามารถระบุความผิดปกติจากการสังเกตภายนอกได้ ผู้ผลิตจึงไม่สามารถจัดการกับผลผลิตได้อย่างเหมาะสม ทำให้ต้องสูญเสียผลไม้ออกไปจำนวนมาก และผู้บริโภคก็อาจจะได้ผลไม้ที่ด้อยคุณภาพ เนื่องจากไม่อาจทราบได้ว่าผลไม้เน่าเสียแล้ว ซึ่งส่งผลกระทบต่อความน่าเชื่อถือของผู้ผลิตอย่างมาก ปัจจุบันความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีการบรรจุแบบฉลาด (intelligent packaging technology) ทำให้ระบบบรรจุสามารถตรวจติดตามและบันทึกสถานะของอาหารในภาชนะบรรจุแบบดัดแปลงบรรยากาศได้ โดยแสดงข้อมูลด้วยป้ายสัญลักษณ์ที่อยู่บนภาชนะบรรจุ (Kerry et al., 2006; Nopwinyuwong et al., 2010) หรือด้วยการใช้แถบชี้วัด (Indicators label) ซึ่งจะให้ข้อมูลเกี่ยวกับคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร เมื่ออาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากปฏิกิริยาทางเคมีหรือจากเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Nopwinyuwong et al., 2010)

เทคโนโลยีการบรรจุแบบฉลาด

เทคโนโลยีการบรรจุแบบฉลาดหรืออินเทลลิเจนท์ (Intelligent Packaging Technology) คือรูปแบบการบรรจุที่สามารถตรวจสอบการรับรู้ บันทึก ติดตาม และสืบค้นสถานะของอาหารในภาชนะบรรจุเพื่อทราบข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพของอาหาร ในระหว่างการขนส่งการเก็บรักษา หรือเป็นการสื่อสารข้อมูลด้วยป้ายสัญลักษณ์ ที่อยู่บนภาชนะบรรจุแก่ผู้บริโภคและผู้ผลิต ซึ่งจะช่วยให้ผู้บริโภคลดความเสี่ยงในการบริโภคอาหารที่ไม่ปลอดภัยลงได้ เทคโนโลยีการบรรจุแบบฉลาดยังช่วยในการตัดสินใจเลือกซื้อของผู้บริโภค ทั้งนี้ โดยทั่วไปการบรรจุอาหารแบบฉลาดมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร ปรับปรุงคุณภาพ ให้ข้อมูล และเพิ่มความปลอดภัยให้กับอาหาร ที่การบรรจุอาหารแบบฉลาดที่ได้รับความนิยมในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น อินดิเคเตอร์การเน่าเสียของอาหาร (food spoilage indicator) อินดิเคเตอร์ความสด (freshness indicator) อินดิเคเตอร์ความสุก (ripeness indicator) อินดิเคเตอร์รอยรั่ว (leak indicator) และอินดิเคเตอร์เวลา-อุณหภูมิ (time temperature indicator) เป็นต้น (Yam et al., 2005; Kerry et al., 2006; Nopwinyuwong et al., 2010)

อินดิเคเตอร์การเน่าเสียของอาหาร

ภาณุวัฒน์ (2549) ได้รายงานว่าการบรรจุแบบวินิจฉัย (diagnostic packaging) เป็นรูปแบบหนึ่งของการบรรจุแบบฉลาดที่สามารถพัฒนาต่อไปในเชิงธุรกิจ วัสดุแบบวินิจฉัยจะใช้ข้อมูลภายในภาชนะบรรจุอาหาร ซึ่งผู้บริโภคไม่สามารถรับรู้ได้จากภายนอก มาแสดงให้ผู้บริโภครับรู้ถึงคุณภาพหรือการเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์อาหารภายในโดยผ่านตัวชี้วัด (Indicator) ซึ่งวัสดุบรรจุนี้ สามารถสร้างประโยชน์ให้แก่ผู้บริโภคหลายประการ เช่น ให้ความสะดวก ความปลอดภัยของอาหาร หรือคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ตัวอย่างของวัสดุบรรจุแบบวินิจฉัยได้แก่ ตัวชี้วัดการเน่าเสียของอาหาร (food spoilage indicators) ตัวชี้วัดเวลาและอุณหภูมิ

(time temperature indicators) ตัวชี้วัดแก๊ส/ไอระเหย (gas/vapor indicator) ตัวชี้วัดชีวภาพ (bio indicators) ตัวชี้วัดความพร้อมในการบริโภค (ready-to-serve indicators) ตัวชี้วัดความสุกของผลไม้ (ripeness indicators) เป็นต้น

อินดิเคเตอร์หรือตัวชี้วัดการเน่าเสียของอาหาร เป็นระบบการบรรจุหรือวัสดุบรรจุซึ่งอาศัยสารเมแทบอลิต์เป็นข้อมูลในการติดตามสภาพของการเน่าเสียของอาหาร การบ่งชี้คุณภาพทางจุลินทรีย์เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างตัวชี้วัดกับสารเมแทบอลิต์ ซึ่งผลิตระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้ ตัวชี้วัดจะแสดงความจำเพาะถึงการเน่าเสีย หรือการสูญเสียความสดใหม่ของผลิตภัณฑ์ ตลอดจนการเน่าเสียของผลไม้ ที่เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ก่อให้เกิดการไม่ยอมรับของผู้บริโภค เช่น การเปลี่ยนสี กลิ่น รส หรือเนื้อสัมผัส ซึ่งไม่ใช่ลักษณะปกติของผลไม้ต่างๆ (บุษกร, 2547) ทั้งนี้ สาเหตุที่ผลไม้เกิดการเน่าเสียอาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมี การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ การเจริญของจุลินทรีย์ หรือความเสียหายจากแมลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ การเจริญของจุลินทรีย์ หรือความเสียหายจากแมลง ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ แต่การเปลี่ยนแปลงทางเคมี หรือการเน่าเสียทางเคมีอาจไม่สามารถรับรู้ หรือมองเห็นได้เมื่อผลิตภัณฑ์อยู่ในภาชนะบรรจุ ดังนั้นดัชนีการเน่าเสียทางเคมี (chemical spoilage index) จึงเป็นสิ่งสำคัญในการพัฒนาตัวชี้วัดการเน่าเสียของผลไม้

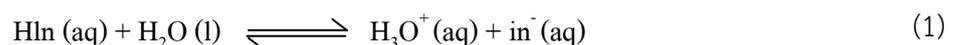
องค์ความรู้เกี่ยวกับสารเมแทบอลิต์ที่บ่งชี้ถึงคุณภาพของอาหารนั้น มีความสำคัญมากในการพัฒนาตัวชี้วัดการเน่าเสียของผลไม้ (Smolander, 2003) ปัจจุบันการใช้สารเมแทบอลิต์เพื่อบ่งชี้ถึงคุณภาพของอาหาร เริ่มได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากเป็นทางเลือกที่มีความเป็นไปได้ ในการบ่งชี้ถึงคุณภาพของอาหารแทนการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์และทางประสาทสัมผัส ซึ่งเป็นวิธีการดั้งเดิมที่สิ้นเปลืองเวลา (Dainly, 1996) อย่างไรก็ตาม การเลือกชนิดของสารเมแทบอลิต์นั้นจะมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของผลิตภัณฑ์อาหาร จุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และชนิดของบรรจุภัณฑ์

รูปแบบของตัวชี้วัดการเน่าเสียและกลไกการเปลี่ยนแปลงสีย้อม

1. สีย้อมพีเอช (pH dye)

สีย้อมพีเอชส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นกรดอ่อน มีโครงสร้างซับซ้อน เป็นสารที่มีสี และสามารถเปลี่ยนสีได้เมื่อ pH ของสารละลายเปลี่ยนไป เป็นสารที่ใช้บอกความเป็นกรด-เบสของสารละลายได้ อย่างหนึ่ง ตามทฤษฎีของ Ostwald กล่าวว่า เมื่อสีย้อมพีเอชอยู่ในรูปของโมเลกุลและเมื่ออยู่ในรูปของไอออนจะมีสีต่างกัน (Wallach, 1996)

สีย้อมพีเอช โดยทั่วไปมีอยู่ 2 รูปคือ รูปกรด (acid form) มีลักษณะเป็น HIn และรูปเบส (basic form) มีสัญลักษณ์เป็น In⁻ ซึ่งทั้งสองรูปนี้มีภาวะสมดุล (ประภาณีและคณะ, 2533) สามารถเขียนแสดงได้ด้วยสมการที่ (1) และหาค่า K_{ind} ได้จากสมการที่ (2)



$$K_{\text{ind}} = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{In}^-]}{[\text{HIn}]} \quad (2)$$

Hln และ \ln^- มีสีต่างกันและปริมาณต่างกัน จึงทำให้สีของสารละลายเปลี่ยนแปลงได้ ถ้าปริมาณ Hln มากก็จะมีสีของรูปกรด ถ้ามีปริมาณ \ln^- มากก็จะมีสีของรูปเบส การที่จะมีปริมาณ Hln หรือ \ln^- มากกว่าหรือน้อยกว่านั้นขึ้นอยู่กับปริมาณ H_3O^+ ในสารละลาย ถ้ามี H_3O^+ มากก็จะรวมกับ \ln^- ได้เป็น Hln มาก แต่ถ้า H_3O^+ อยู่ในสารละลายที่มี OH^- มาก จะทำให้ H_3O^+ ลดลง เนื่องจาก OH^- ทำปฏิกิริยากับ H_3O^+ และมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาไปข้างหน้าได้ \ln^- มากขึ้น

เมื่อเติม (H_3O^+) ทำให้ปริมาณ H_3O^+ ทางขวาของสมการมีมากขึ้น ปฏิกิริยาจะเกิดย้อนกลับ ทำให้มี Hln มากขึ้นจึงเห็นเป็นสีของกรด Hln

เมื่อเติมเบส (OH^-) OH^- จะทำปฏิกิริยากับ H_3O^+ ทำให้ H_3O^+ น้อยลง ปฏิกิริยาจะไปข้างหน้ามากขึ้น ทำให้มี \ln^- มากขึ้น จึงเห็นเป็นสีเบสของ \ln^-

ถ้า $[\text{Hln}] > [\ln^-] 10$ เท่าขึ้นไปจะเห็นสีของรูปกรด (Hln)

ถ้า $[\ln^-] > [\text{Hln}] 10$ เท่าขึ้นไปจะเห็นสีของรูปเบส (\ln^-)

ช่วง pH ของอินดิเคเตอร์ เป็นช่วง pH ของสารละลายที่อินดิเคเตอร์ค่อยๆ เปลี่ยนสีจากสีหนึ่งไปยังอีกสีหนึ่ง หรือเป็นส่วนของ pH ที่อินดิเคเตอร์มีทั้งสีของ Hln และสีของ \ln^- ผสมกันในการบอกช่วง pH ของอินดิเคเตอร์ เช่น เมทิลเรด มีช่วง pH 4.4-6.2 หมายความว่า ถ้าสารละลายมี pH น้อยกว่า 4.4 อินดิเคเตอร์จะให้สีแดง ถ้าสารละลายมี pH มากกว่า 6.2 อินดิเคเตอร์จะให้สีเหลือง และถ้าสารละลายมี pH อยู่ระหว่าง 4.4-6.2 อินดิเคเตอร์จะให้สีส้ม ซึ่งเป็นสีผสมของ Hln และ \ln^- ตัวอย่างสีของอินดิเคเตอร์แต่ละชนิดจะเปลี่ยนในช่วง pH ที่ต่างกัน (ตารางที่ 1)

สภาวะในการทดลองมีผลของการเปลี่ยนสีของสีย้อมพีเอชมาก โดย Wallach (1996) ได้รายงาน ว่าปัจจัยที่สำคัญได้แก่

(1) ความเข้มข้นของสีย้อมพีเอช ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีมากที่สุด สำหรับสีย้อมพีเอชชนิด 2 สี การเปลี่ยนสีจะมีความชัดเจนน้อยลงที่ความเข้มข้นสูง เนื่องจากการดูดกลืนแสงของสีแต่ละตัวจะมีการซ้อนกัน ยิ่งมีการซ้อนกันมากความไวของการเปลี่ยนแปลงสีจะยิ่งลดลง

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนสีของสีย้อมพีเอชที่มีช่วงพีเอชต่างกัน

สีย้อมพีเอช	สีแรก	สีที่สอง	ช่วงพีเอชที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสี
บรอมไพนอลบลู	เหลือง	ม่วงอ่อน	3.0-4.6
บรอมไครโซลกรีน	เหลือง	น้ำเงิน	3.8-5.4
เมทิลเรด	แดง	เหลือง	4.8-6.0
ลิตมัส	แดง	น้ำเงิน	5.0-8.0
บรอมไครโซลเพอร์เฟิล	เหลือง	ม่วง	5.2-6.8
บรอมโทมอลบลู	เหลือง	น้ำเงิน	6.0-7.6
ฟีนอลเรด	เหลือง	แดง	6.8-8.4

ที่มา: Wallach (1996)

2. การละลายของคาร์บอนไดออกไซด์ มีผลต่อค่า pH ของสารละลายในสภาวะสมดุลกับคาร์บอนไดออกไซด์มีค่า pH ประมาณ 6 ในสารละลายเบสการละลายของคาร์บอนไดออกไซด์จะสูงขึ้นสมดุลในสารละลายเบสจึงอยู่ที่ pH มากกว่า 4

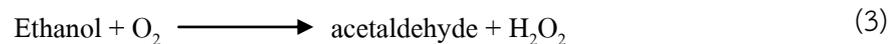
3. ตัวละลาย ส่งผลต่อสีย้อมพีเอชแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของสีย้อมพีเอชนั้น สำหรับสารละลายเมทานอลหรือเอทานอลไม่ส่งผลต่อสีย้อมพีเอชมากนัก ในขณะที่สารในกลุ่มแอนไฮดริสแอลกอฮอล์จะส่งผลต่อสีย้อมพีเอชมากกว่า

4. อุณหภูมิ สีของสีย้อมพีเอชหลายชนิดขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของสารละลาย โดยในสารละลายที่มีความร้อนสูง พบว่าสีย้อมพีเอชที่มีความไวต่อเบส จะมีการเปลี่ยนสีไปทางด้านเบส ในขณะที่สีย้อมพีเอชที่มีความไวต่อกรดจะมีการเปลี่ยนสีไปทางด้านกรด

2. ตัวชี้วัดการนำเสียที่ไวต่อเอทานอล

การใช้เอทานอลเป็นสารเมแทบอลิต์ที่บ่งชี้ถึงคุณภาพของอาหารนั้น ได้นำแนวคิดมาจากการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ออกจากลมหายใจของผู้ขับขี่ยานพาหนะที่ดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ซึ่ง Barzana et al. (1989) ได้ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณของเอทานอลในลมหายใจ โดยใช้เอ็นไซม์ 2 ชนิดคือ แอลกอฮอล์ออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส พร้อมทั้งใช้สีย้อม 2,6-ไดคลอโรไอโอดีนอล (DCIP) ซึ่งสีย้อมนี้ จะมีการเปลี่ยนสี เมื่อลมหายใจมีปริมาณของเอทานอลเกินกว่าระดับที่กฎหมายกำหนด

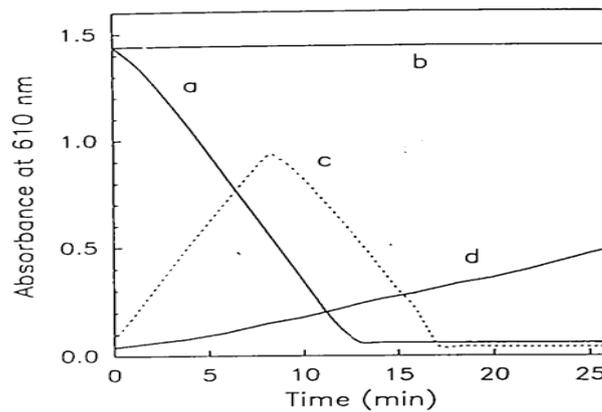
การเปลี่ยนสีของตัวชี้วัดการนำเสียที่ไวต่อเอทานอลใช้หลักการที่ว่า เอ็นไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส จะทำหน้าที่เปลี่ยนแอลกอฮอล์สายสั้น (short linear alcohol) ให้เป็นแอลดีไฮด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide; H_2O_2) จากนั้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะเปลี่ยนสีของสีย้อม DCIP จากรูปออกซิไดส์ ($DCIP_{ox}$) ไปเป็นรูปที่สลายตัวแล้ว ($DCIP_{decomp}$) โดยมีเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่ง ดังแสดงในสมการที่ (3) และ (4)



จากผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสีย้อม DCIP (ภาพที่ 1) โดย Barzana et al. (1989) พบว่า DCIP มีอยู่ 2 รูป คือ รูปออกซิไดส์ (oxidized forms) และรูปรีดิวซ์ (reduced forms) เมื่อ DCIP ถูกรีดิวซ์ด้วยกรดแอสคอร์บิก จะเกิดการเปลี่ยนสีเป็นสารประกอบสีเหลืองอ่อน โดยทั่วไป DCIP ในรูปรีดิวซ์จะไม่เสถียร มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอทานอลและออกซิเจน โดยมีเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (สมการที่ 3) ดังนั้น DCIP ที่อยู่ในสารละลายซึ่งประกอบด้วยเอ็นไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส เอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส และเอทานอล จะได้สารประกอบสีน้ำเงินอย่างรวดเร็ว ซึ่งเมื่อนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) จะได้ค่าสูงที่สุด (กราฟ c) หลังจากนั้นค่าการดูดกลืนแสงจะลดลงไปอย่างรวดเร็ว ได้สารประกอบที่มีสีม่วงอ่อน ทั้งนี้เมื่อสารประกอบเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่า DCIP เริ่มถูกทำลายแล้ว แต่ถ้าในสารละลายมีเฉพาะเอ็นไซม์ทั้งสองชนิดแต่ไม่มีเอทานอล พบว่า DCIP จะยังคงเสถียรอยู่ในรูปออกซิไดส์ นั่นคือ DCIP ไม่ถูกทำลาย ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าคงที่ (กราฟ b)

จากกราฟ d แสดงว่าถ้า DCIP ถูกรีดิวซ์ด้วยกรดแอสคอร์บิก จะทำให้สารละลายเกิดการเปลี่ยนสี ซึ่งทำให้ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเปลี่ยนไป สำหรับกราฟ a แสดงให้เห็นว่า เมื่อ $DCIP_{ox}$ อยู่ในสารละลายเอทานอล จะเกิดการเปลี่ยนสีได้เช่นกัน ฉะนั้นจึงกล่าวได้ว่าเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสจะเป็นตัวสำคัญ

ในการเปลี่ยนสี ในทางตรงกันข้าม DCIP ในรูปรีดิวซ์จะถูกออกซิไดซ์ด้วยอากาศอย่างช้าๆ ถ้าระบบอยู่ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน (anaerobic conditions) จะไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้สารประกอบยังคงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ฉะนั้นจึงนิยมเลือก DCIP ในรูปออกซิไดซ์มาเป็นสารประกอบที่ให้สี (Barzana et al.,1989)



ภาพที่ 1 ช่วงเวลาในการเปลี่ยนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร ของสีย้อม DCIP ในสารละลายบัฟเฟอร์ (a: DCIPox + เอทานอล, b: DCIPox + สารละลายบัฟเฟอร์, c: DCIP ถูกรีดิวซ์ด้วยกรดแอสคอร์บิก + เอทานอล, d: DCIP ถูกรีดิวซ์ด้วยกรดแอสคอร์บิก + สารละลายบัฟเฟอร์)

ที่มา: Barzana et al. (1989)