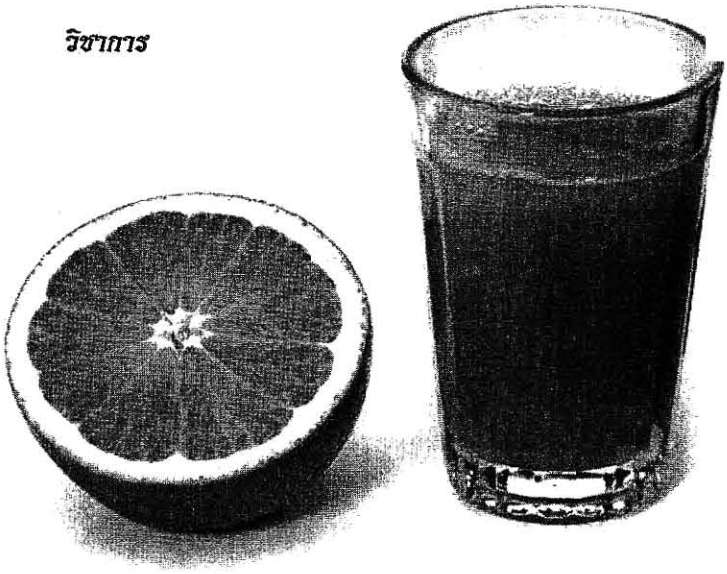
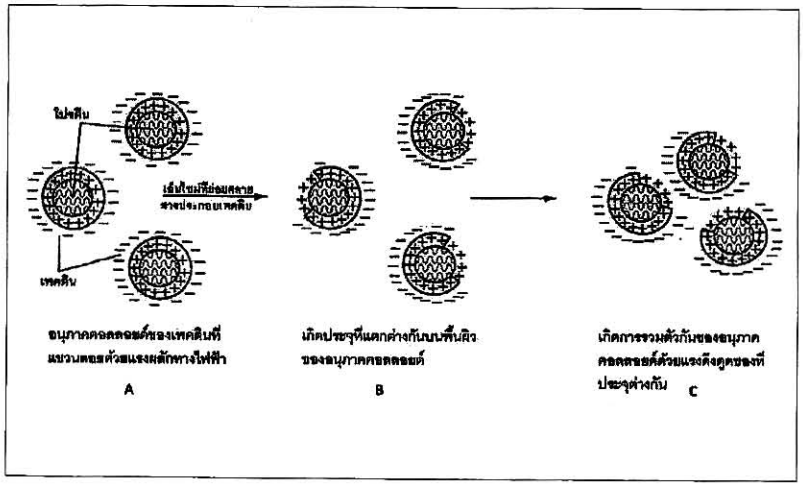


ผลของการใช้ความดันสูงและอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ PME ในน้ำผลไม้แบบขุ่น

(Effect of high pressure and temperature treatment on PME activity in cloudy fruit juice)

□ รัชฎา ตั้งวงศ์ไชย*
ชัชวาลัย อรรถพลไพศาล
คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

น้ำผลไม้เป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน ซึ่งแบ่งตามลักษณะปรากฏออกได้เป็น 2 ประเภท คือ น้ำผลไม้แบบใส (clear juice) และน้ำผลไม้แบบขุ่น (cloudy juice) และจากการที่ผู้บริโภคในปัจจุบันหันมาใส่ใจกับอาหารและเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ ทำให้น้ำผลไม้แบบขุ่นได้รับความนิยมจากผู้บริโภคมากขึ้น เนื่องจากน้ำผลไม้แบบขุ่นมีเนื้อผลไม้หรืออนุภาคแขวนลอยอยู่ รวมทั้งมีคุณภาพด้านลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส และกลิ่นรส คล้ายกับน้ำผลไม้ที่คั้นสดใหม่มากกว่าน้ำผลไม้แบบใส Oszmianski และคณะ (2007) รายงานว่า น้ำแอ๊ปเปิ้ลชนิดขุ่นมีสารฟีโนลิคซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มากกว่าน้ำแอ๊ปเปิ้ลชนิดใสถึงสี่เท่า นอกจากนี้ยังมีสารที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพมากกว่า เช่น อนุภาคเส้นใยอาหารที่แขวนลอยอยู่ อย่างไรก็ตาม ปัญหาในการเก็บรักษาน้ำผลไม้แบบขุ่น คือ การตกตะกอนหรือการสูญเสียความขุ่น ทำให้เกิดการแยกชั้นและไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค



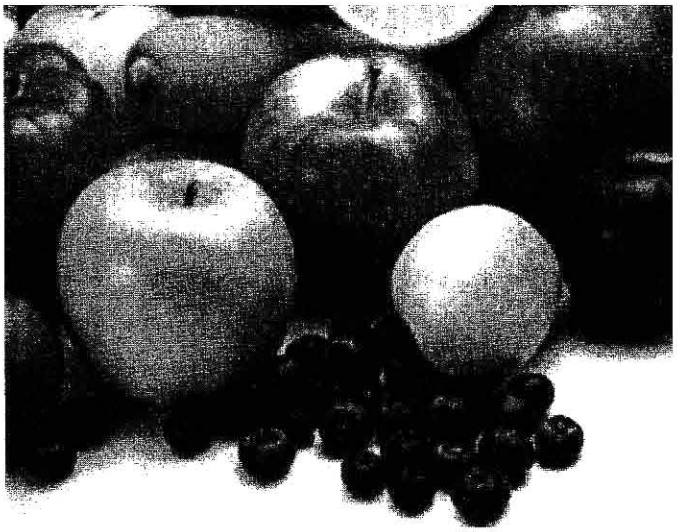
รูปที่ 1 การตกตะกอนเนื่องจากการรวมตัวของอนุภาคความขุ่น (ที่มา : Lea (1995))

ความขุ่นของน้ำผลไม้
(Cloudiness of fruit juice)

ความขุ่นในน้ำผลไม้เกิดขึ้นจากโครงสร้างของเนื้อเยื่อและองค์ประกอบในผลไม้ รวมถึงสารประกอบเพคตินถูกสกัดออกมาแขวนลอยในน้ำผลไม้ในระหว่างกระบวนการคั้นน้ำผลไม้ ทำให้น้ำผลไม้ที่คั้นได้มีลักษณะขุ่นและมีความหนืด โดยสารประกอบเพคตินที่แขวนลอยและกระจายตัวในน้ำผลไม้ เป็นอนุภาคคอลลอยด์ที่พื้นผิวมีประจุลบ ซึ่งสามารถล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีนซึ่งแขวนลอยในน้ำผลไม้ที่มีประจุบวกได้ จึงทำให้โมเลกุลเชิงซ้อนเหล่านี้มีแรงผลักทางไฟฟ้าของประจุลบ ทำให้

รัชฎา ตั้งวงศ์ไทย และ ชัชวาลัย อรรถพลไพศาล. "ผลการใช้ความดันสูงและอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ PME ในน้ำผลไม้แบบขุ่น" *อาหาร* 40, 2 (เม.ย.-มิ.ย. 2553) 42-46

สามารถแขวนลอยอยู่ในน้ำผลไม้ได้ ด้วยการเคลื่อนที่แบบบราวเนียน (brownian) ทำให้เกิดความขุ่นของน้ำผลไม้ (รูปที่ 1A) ประกอบกับความหนืดของน้ำผลไม้ ก็มีผลในการช่วยพยุงอนุภาคเหล่านี้ให้สามารถแขวนลอยอยู่ในน้ำผลไม้ได้ดีขึ้น นอกจากนี้ขนาดอนุภาค (particle size) ความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) และความหนืดที่เหมาะสม เป็นปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของอนุภาค ในการแขวนลอยอยู่ในน้ำผลไม้ได้เช่นเดียวกัน (Lea, 1995)



เอนไซม์เพคติน เมทธิล เอสเตอร์เรส (pectin methylesterase, PME (EC 3.1.1.11)) และเอนไซม์พอลิกาแลคทูโรเนส (polygalacturonase, PG (EC. 3.2.1.15)) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเพคติเนส (pectinase) ที่พบทั่วไปในผัก และผลไม้ทำหน้าที่เร่งการย่อยสลายสารประกอบเพคตินเป็นผลให้เนื้อสัมผัสของผักและผลไม้นิ่มขึ้นในระหว่างการสุก นอกจากนี้ยังมีผลต่อการสูญเสียความขุ่น ของน้ำผลไม้ในระหว่างการเก็บรักษาคือ โดยเอนไซม์ PME จะเร่งปฏิกิริยาการสลายของหมู่เอสเตอร์ (deesterification) ของสารประกอบเพคตินที่แขวนลอยในน้ำผลไม้ เกิดเป็นสารประกอบเพคตินที่มีหมู่เมทอกซิลต่ำ (low methoxy pectin) หรือ กรดเพคติค (pectic acid) ในขณะที่เอนไซม์ PG จะเร่งการสลาย พันธะ α-1,4-glycosidic ซึ่งเชื่อมระหว่างโมเลกุลของกรด กาแลคทูโรนิค (galacturonic acids) ที่มีหมู่คาร์บอกซิล ในสายโซ่พอลิเมอร์ของสารประกอบเพคตินทำให้สายโซ่ยาวของสาร ประกอบเพคตินสั้นลง จนได้เป็นโมเลกุลกรดกาแลคทูโรนิคในที่สุด ทั้งนี้เอนไซม์ PG ไม่สามารถเร่งการสลายพันธะ α-1,4-glycosidic ระหว่างโมเลกุลของกรดกาแลคทูโรนิคที่เกิดพันธะแอสเตอร์กับหมู่เมทอกซิล (methylated pectin) ได้ ดังนั้นเอนไซม์ PG จะมีกิจกรรมต่อจากกิจกรรมของเอนไซม์ PME ซึ่งเป็นเหตุ ให้ความหนืดของน้ำผลไม้ลดลง จนไม่สามารถพยุงอนุภาคเพคตินให้แขวนลอย ทำให้เกิดการตกตะกอนและแยกชั้นในน้ำ ผลไม้

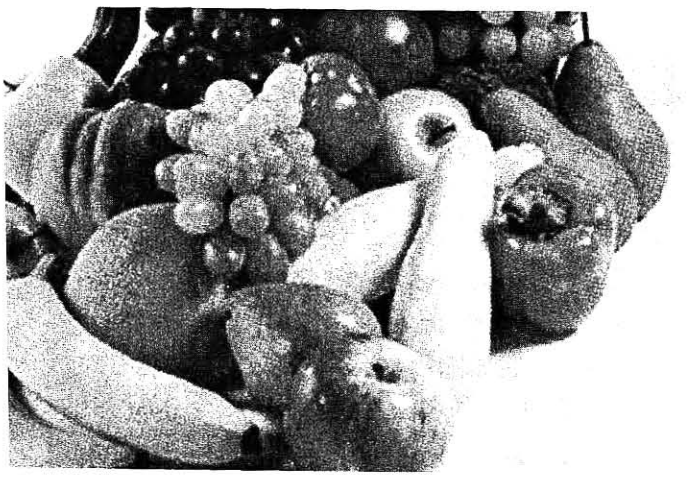
อย่างไรก็ตาม การย่อยสลายของสารประกอบเพคตินเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถทำให้น้ำผลไม้ใสได้ในทันที เนื่องจากอนุภาคแขวนลอยเหล่านี้ เป็นอนุภาคคอลลอยด์ที่มีขนาดเล็กมาก (<1μm) ทั้งนี้กลไกในการสูญเสียความขุ่นเกิดจากกรดเพคติคทำปฏิกิริยากับอิออนที่มีประจุบวกสอง (divalent ions) ได้ดี เช่น แคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนของแคลเซียมเพคเตต ที่มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำและเกิดการตกตะกอนอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้กิจกรรมของเอนไซม์ PME/PG ที่ย่อยสลายสารประกอบเพคตินบางส่วน ที่ล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีนที่แขวนลอยอยู่ (รูปที่ 1B) ทำให้ประจุบวกของโปรตีนที่อยู่ภายในถูกเปิดออกและสามารถเกิดแรงดึงดูดทางไฟฟ้ากับประจุลบของอนุภาคความขุ่นที่อยู่ข้างเคียงได้ และเกิดการรวมตัวขึ้นเป็นอนุภาคที่ใหญ่ขึ้น (รูปที่ 1C) สามารถตกตะกอนแยกชั้นออกมาด้วยแรงโน้มถ่วง เป็นผลทำให้น้ำผลไม้สูญเสียความขุ่น จะเห็นได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ PME และ PG เป็นสาเหตุสำคัญของการไม่คงตัวในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ชนิดขุ่น ดังนั้นในการแปรรูปน้ำผลไม้ชนิดขุ่นจึงจำเป็นต้องยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองนี้ การให้ความร้อนเป็นกระบวนที่ใช้ทั่วไปเพื่อยับยั้งเอนไซม์และจุลินทรีย์ ทำให้อาหารมีอายุการเก็บนานขึ้นและปลอดภัยต่อการบริโภค แต่ในขณะเดียวกันความร้อนที่ใช้มีผลให้กลิ่นรส สี และสารอาหารเกิดการสลายตัวได้ ซึ่งจะทำให้อาหารนั้นด้อยคุณภาพลง

ปัจจุบันผู้บริโภคได้ตระหนักถึงความสำคัญของคุณภาพด้านโภชนาการ และประโยชน์ที่ร่างกายจะได้รับจากการบริโภคอาหาร อาหารธรรมชาติหรืออาหารสดจึงได้รับความสนใจมากขึ้น รวมถึงผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปที่ต้องมีคุณภาพ เช่น มีกลิ่นรส สี ลักษณะเนื้อสัมผัส และสารสำคัญให้ใกล้เคียงกับผลผลิตสดจากธรรมชาติได้มากที่สุด นอกจากนี้ผู้บริโภคยังต้องการ อาหารที่มีความปลอดภัยจากสารพิษและจุลินทรีย์ที่เป็นอันตราย ดังนั้นการพัฒนากระบวนการแปรรูปเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค และสามารถนำเสนอผลิตภัณฑ์อาหารที่มีคุณลักษณะใกล้เคียงกับอาหารสด จึงจำเป็นต้องมีเทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร ที่สามารถรักษาคุณค่าทางอาหารและคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสเอาไว้ได้ใกล้เคียงธรรมชาติ และสามารถยืดอายุการเก็บรักษาให้นานขึ้น เช่น การใช้ความดันสูง ซึ่งเป็นกระบวนการแปรรูป ที่มีผลในการทำลายจุลินทรีย์และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ การใช้ความดันสูงได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นในการนำมาแปรรูปอาหารต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ สัตว์น้ำ ผักและผลไม้ เป็นต้น ซึ่งอาจใช้ร่วมกับปัจจัยอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาคุณภาพ และยืดอายุการเก็บ เช่น ใช้ร่วมกับอุณหภูมิ หรือใช้ที่

pH ต่ำ ในที่นี้จะกล่าวถึงกระบวนการใช้ความดันสูง เพื่อคงความสดและคุณภาพของน้ำผลไม้ชนิดขุ่น ให้ใกล้เคียงลักษณะธรรมชาติมากที่สุด รวมถึงการยืดอายุการเก็บรักษาให้ยาวนานขึ้น

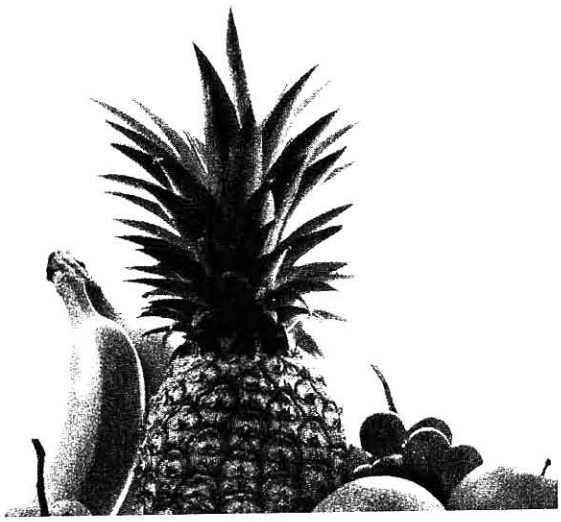
การแปรรูปด้วยความดันสูง (High Pressure Processing)

การแปรรูปอาหารด้วยความดันสูง เป็นการใช้ความดันสูงในช่วง 100-1000 MPa ผ่านของเหลว เช่น น้ำ เพื่อเป็นตัวกลางในการส่งผ่านความดันสู่อาหาร และให้อาหารอยู่ภายใต้สภาวะความดันสูงเป็นระยะเวลานานพอที่จะก่อให้เกิดผลในการยับยั้งจุลินทรีย์และเอ็นไซม์ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของโปรตีน และโพลีแซคคาไรด์ในอาหาร โปรตีนอาจเกิดการเสียสภาพภายใต้ความดันสูง โดยความดันที่เพิ่มขึ้น จะมีผลให้ระบบมีปริมาตรลดลง ก่อให้เกิดปฏิกิริยาตามหลักของ Le Chatalier ซึ่งกล่าวไว้ว่า ปฏิกิริยาใดก็ตามที่เกิดขึ้นแล้วมีผลให้ปริมาตรของระบบลดลง ปฏิกิริยานั้นถูกเร่งให้เกิดภายใต้ความดัน และในทางตรงกันข้ามปฏิกิริยาใดที่เกิดขึ้นแล้วทำให้ปริมาตรของระบบเพิ่มขึ้น (+ΔV) จะถูกยับยั้งภายใต้ความดัน รวมไปถึงพันธะเคมีใดที่มีระยะห่างของพันธะมาก จะถูกทำลายได้ง่ายภายใต้ความดัน พันธะนอนโควาเลนซ์ (non-covalent bonds) เช่นพันธะไฮโดรเจนพันธะไอออนิกพันธะอิเลคโตรสเตติก และพันธะไฮโดรโฟบิก) ซึ่งเป็นพันธะเคมีที่สำคัญในโครงสร้างเชิงหน้าที่ของชีวโมเลกุล จะถูกทำลายได้ง่ายภายใต้ความดันสูง ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงหน้าที่ของชีวโมเลกุล (เช่น กรดนิวคลิอิค โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น) ทำให้เกิดการทำลายจุลินทรีย์และยับยั้งกิจกรรมของเอ็นไซม์ (Earnshaw, 1996) ในขณะที่พันธะโควาเลนซ์จะค่อนข้างทนต่อความดันสูง สารประกอบจำพวกวิตามินและกลิ่นรสซึ่งประกอบด้วยพันธะโควาเลนซ์จึงไม่เปลี่ยนแปลงภายใต้ความดัน ดังนั้นการแปรรูปอาหารด้วยความดัน จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของเทคโนโลยีการแปรรูปที่สามารถรักษาคุณภาพของอาหารให้ใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติ (Hoover, 1993)



ผลของการใช้ความดันสูงต่อกิจกรรมของเอ็นไซม์ PME ในน้ำผลไม้

Van Den Broeck และคณะ (1999) รายงานว่า เอ็นไซม์ PME ที่ทนต่อความร้อนมักจะทนต่อความดันด้วย ในน้ำผลไม้ที่ผ่านการให้ความดัน ยังคงมีกิจกรรมของ PME ในรูปที่ทนต่อความร้อนเหลืออยู่ ซึ่งจะทำให้เกิดการสูญเสียความขุ่นในระหว่างการเก็บรักษา การใช้ความร้อนร่วมกับการใช้ความดันจะเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการในการยับยั้งกิจกรรมของเอ็นไซม์ PME Cano และคณะ (1997) รายงานว่า น้ำส้มที่ผ่านการให้ความดันที่ 200 MPa เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ มีกิจกรรมของเอนไซม์ PME ลดลงมากกว่าร้อยละ 75 และพบว่า น้ำส้มที่ผ่านการให้ความดันที่ 700 MPa เป็นเวลา 1 นาที เมื่อการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ มีความคงตัวของความขุ่นนานมากกว่า 50 วัน ในขณะที่น้ำส้มที่ไม่ผ่านกระบวนการจะสูญเสียความขุ่นภายใน 2-3 วัน Bayindirli และคณะ (2006) รายงานว่า เมื่อให้ความร้อนแก่น้ำส้มที่อุณหภูมิ 40-50 °ซ นาน 1 ชั่วโมง (โดยไม่ได้ใช้ร่วมกับความดัน) มีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ PME ลดลงเล็กน้อย แต่เมื่อใช้อุณหภูมิ 40-50 °ซ ร่วมกับความดันสูงจะสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ PME ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ตารางที่ 1) การใช้ความดันที่ 450 MPa ที่ 50 °ซ นาน 30 นาที สามารถยับยั้ง กิจกรรมของเอนไซม์ PME ได้ร้อยละ 93 โดยประมาณ โดยระดับที่สูงขึ้นของความดัน อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการให้ความดัน จะมีผลเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเอ็นไซม์ได้มากขึ้น ทั้งนี้กิจกรรมของเอ็นไซม์ที่เหลืออยู่จะเป็นไอโซไซม์ (isoenzymes) ที่ทนต่อความดัน (Goodner และคณะ 1998) น้ำส้มคั้นจะสูญเสียความขุ่นภายใน 2-3 วัน เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ในขณะที่น้ำส้มที่ผ่านการให้ความดันสูงที่สภาวะ 350 MPa ที่ 40 °ซ นาน 30 นาที และ 450 MPa ที่ 25 °ซ นาน 30 นาที สามารถคงความขุ่นของน้ำส้มไว้ได้นาน 2 สัปดาห์ เมื่อเก็บรักษาที่ 4 °ซ (ตารางที่ 2)



ตารางที่ 1 กิจกรรมที่เหลือของเอนไซม์เพคตินเมทธิลเอสเตอร์เรสในน้ำส้มที่ผ่านการใช้ความดันสูงในสภาวะต่างๆ

ความดัน (MPa)	อุณหภูมิ(°ซ)	เวลา (นาที)	กิจกรรมเอ็นไซม์ที่คงเหลือ (%)
350	40	30	24 ± 1.6
350	40	60	14 ± 2.3
350	50	30	13 ± 1.1
350	50	60	11 ± 0.1
450	40	30	20 ± 0.2
450	40	60	12 ± 0.2
450	50	30	7 ± 1.6
450	50	60	7 ± 0.2

ที่มา : Bayindirli และคณะ (2006)

ตารางที่ 2 ความคงตัวความขุ่นของน้ำส้มที่เก็บรักษานาน 1 และ 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 °ซ

สิ่งทดลอง	ความคงตัวของความขุ่นa (ร้อยละการส่องผ่านของแสง ที่ 650 nm)			
	การเก็บรักษานาน 1 สัปดาห์		การเก็บรักษานาน 1 สัปดาห์	
	4 °ซ	25 °ซ	4 °ซ	25 °ซ
น้ำส้มสด (ไม่ผ่านกระบวนการ)	48±4.2	83±2.0	59±3.1	86±4.1
350 MPa + 25°ซ + 30 นาที	33±4.3	73±1.2	39±3.7	81±2.8
450 MPa + 25°ซ + 30 นาที	17±3.3	39±1.9	21±0.6	49±3.9
350 MPa + 40°ซ + 30 นาที	23±1.3	29±4.2	27±2.9	31±3.5
450 MPa + 25°ซ + 30 นาที	11±4.1	17±0.7	9±4.1	15±0.2

[a] ร้อยละการส่องผ่านของแสงที่ 650 nm (ระยะผ่านแสง 1 ซม.) ที่ต่ำกว่าร้อยละ 36 (ค่าเฉลี่ยใต้เส้นทึบ) แสดงความคงตัวของความขุ่นน้ำส้ม
ที่มา : Bayindirli และคณะ (2006)

ในขณะที่ Baron และคณะ (2006) รายงานว่า การเพิ่มระดับความดัน หรือระยะเวลาในการใช้ความดันสูง ที่อุณหภูมิ 15-40 °ซ มีผลในการเพิ่มกิจกรรมของเอ็นไซม์ PME ในน้ำแอ๊ปเปิ้ลคั้น (cloudy apple juice) โดยเอ็นไซม์ PME ที่สกัดได้จากแอ๊ปเปิ้ลสามารถทนต่อความดันสูง (100-600 MPa ที่อุณหภูมิ 25 °ซ) การใช้ความดันสูง 650 MPa ไม่สามารถคงรักษาความขุ่นในน้ำแอ๊ปเปิ้ลไว้ได้ แม้ว่าจะใช้เวลานานขึ้น (0.5-10.5 นาที) หรืออุณหภูมิสูงขึ้น (15-65 °ซ) อย่างไรก็ตามที่ความดัน 200-300 MPa จะกระตุ้นกิจกรรมของเอ็นไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenoloxidase; PPO) เป็นผลให้ปริมาณสารประกอบที่เกิดจากการออกซิเดชั่นของสาร catechin เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสารเหล่านี้มีผลในการยับยั้งกิจกรรมของเอ็นไซม์ PME ได้

จากงานวิจัยข้างต้นจะเห็นได้ว่า การใช้ความดันสูงสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอ็นไซม์ PME ในน้ำส้มได้ เป็นผลให้น้ำส้มคงความขุ่น ซึ่งเป็นลักษณะคุณภาพที่ดีของน้ำส้มไว้ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอ็นไซม์ PME ในน้ำแอ๊ปเปิ้ลได้ ทั้งนี้การใช้ความดันสูงอาจกระตุ้นหรือยับยั้งเอนไซม์ขึ้นกับชนิดและแหล่งของเอ็นไซม์ โครงสร้างของเอนไซม์ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความเข้มข้นของสารตั้งต้น และอุณหภูมิในระหว่างการให้ความดัน (Hoover, 1993) โดยทั่วไปการใช้ความดันที่ 100-300 MPa จะให้ผลในการยับยั้งเอ็นไซม์ ที่สามารถเกิดการผันกลับได้ (reversible inactivation) โดยเอนไซม์อาจกลับมามีกิจกรรมอีกครั้งหลังจากลดความดัน หรือในระหว่างการเก็บรักษา ทั้งนี้ขึ้นกับระดับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ

โมเลกุลเอนไซม์ แต่การเพิ่มความดันให้สูงกว่า 300 MPa จะเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอ็นไซม์อย่างถาวร (irreversible inactivation) ทำให้เอ็นไซม์ไม่สามารถ กลับมามีกิจกรรมได้อีก (Jaenicke,1981) ดังนั้นการใช้ความดันสูง จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการแปรรูปน้ำผลไม้ ซึ่งนอกจากจะชะลอการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของน้ำส้ม เนื่องจากความดันสูงสามารถยับยั้งเอ็นไซม์ PME ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการตกตะกอน หรือแยกชั้นของน้ำผลไม้ชนิดขุ่นแล้ว การใช้ความดันสูงยังสามารถคงคุณภาพความหนืด กลิ่นรส สี และคุณค่าทางโภชนาการได้ใกล้เคียงกับธรรมชาติมากกว่าการใช้ความร้อน

เอกสารอ้างอิง

Baron, A., Dénes, J. and Durier, C. 2006. High pressure treatment of cloudy apple juice. LWT. 39: 1005-1013.

Bayındırlı, A., Alpas, H., Bozoğlu, F. and Hızal, M. 2006. Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. Food Control. 17: 52-58.

Hernandez, A. and De Ancos, B. 1997. High and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products. J. Food Sci. 62(1): 85-88.

Earnshaw, R. 1996. High Pressure Food Processing. Nutrit. Food Sci. 2: 8-11.

Goodner, J., Braddock, R. and Parish, M. 1998. Inactivation of pectinesterase in orange and grapefruit juice by high pressure. J. Food chem. 46: 1997-2000.

Hoover, D. 1993. Pressure effects on biological system. J. Food Technol. 47(6): 150-155.

Jaenicke, R. 1981. Enzymes under extremes of physical conditions. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 10: 1-67.

Lea, A. 1995. Enzymes in the production of beverages and fruit juices. In Tucker, G. and Woods, L. Enzymes in Food Processing. 2nd Eds. Blackie Academic & Professional. Glasgow: UK. pp. 223-249.

Oszmianski, J., Wolniak M., Wojdylo, A. and Wawer, I. 2007. Comparative study of polyphenolic content and antiradical activity of cloudy and clear apple juices. J. Sci. of Food and Agri. 87(4): 573-579.

Van den Broeck, I., Ludikhuyze, L., Van Loey, A., Weemaes, C. and Hendrickx, M. 1999. Thermal and combined pressure–temperature inactivation of orange pectinesterase: influence of pH and additive. J. Agri. Food Chem. 47,(7),2950-2958.