Thesis Title Changes in Physico-chemical Characteristics, Organic Acid Contents and Enzyme Activities Related to Citric Acid Metabolism During Growth and Storage of Tangerine Fruit cv. 'Sai Num Phueng' and 'See Thong'

Author Miss Worawaran Roongruangsri

Degree Doctor of Philosophy (Postharvest Technology)

Thesis Advisory Committee

Emeritus Prof. Dr. Nithiya Rattanapanone	Advisor
Assoc. Prof. Dr. Danai Boonyakiat	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Noppol Leksawasdi	Co-advisor

ABSTRACT

The changes in physico-chemical characteristics, organic acid contents and related metabolic enzyme activities at different stages of growth and during on-tree and off-tree storage of two tangerine cultivars, 'Sai Num Phueng' and 'See Thong' were studied. It was found that the physico-chemical changes were quite similar between the two tangerine cultivars from growth to maturation. The fruit weight and size increased in parallel. Chlorophyll degradation and carotenoid accumulation in peel resulted in the change of color from green to yellow-orange throughout fruit development of both cultivars. Carotenoid accumulation in juice resulted in changing color from yellow-orange to deep orange. Titratable acidity (TA) and citric acid contents of both cultivars reached the peak at early growth stage, then rapidly decreased and slightly decreased during maturation. The change in TA was consistent with the change of juice pH. Malic acid and vitamin C contents were very high at early growth stage, and then declined toward fruit maturation. Isocitric acid content

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

gradually decreased during maturation. Total soluble solids (TSS), TSS/TA ratio, sucrose, glucose and fructose contents continually increased during growth and then slowly increased during maturation. During maturation, 'Sai Num Phueng' had higher TA, TSS, citric acid, vitamin C, sucrose, glucose and fructose contents and lower peel carotenoid, isocitric acid contents, juice pH and TSS/TA ratio than those of 'See Thong'. Peel and juice colors, peel chlorophyll, juice carotenoid and malic acid contents did not differ between these two cultivars.

The role of citric acid metabolizing enzymes in the control of citric acid accumulation and reduction from growth to maturation were studied in 'Sai Num Phueng' and 'See Thong' cultivars. The activities of enzymes citrate synthase in mitochondrial fraction, aconitase in both mitochondrial and cytosolic fractions and NADP-isocitrate dehydrogenase (IDH) in cytosolic fraction were determined. The changes in these three enzyme activities followed similar patterns in both cultivars. At early growth stage (16-24 WAF), mitochondrial citrate synthase activity increased while mitochondrial aconitase activity deceased and citric acid content increased to the highest levels. Subsequently, these two enzymes activities in mitochondrial fraction decreased to the low levels and then remained almost constant toward fruit maturation. For 28-34 WAF, aconitase and NADP-IDH activities in cytosolic fraction were induced with the concomitant decrease of citric acid content. During maturation (35-37 WAF), the same enzymes activities decreased and remained constant at the low levels which coincided with the slight decrease in citric acid content. The results in this study can be concluded that citrate synthase and aconitase enzymes in the mitochondria were essential in citric acid accumulation at early growth stage of tangerine fruit. Aconitase in the cytosol played a key role in the reduction of citric acid during growth and maturation. NADP-IDH could be consisted with aconitase for enhancing the reduction of citric acid in the cytosol.

Citrate synthase activity in mitochondrial fraction was not different between both cultivars throughout fruit development while aconitase activity in both mitochondrial and cytosolic fractions were lower in 'Sai Num Phueng' than in 'See Thong' with the concomitance of citric acid content which were higher in 'Sai Num Phueng' than that of 'See Thong'. Therefore, the difference in the level of aconitase activity could account for the difference in citric acid content between the two

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

tangerine cultivars. However, citrate synthase could not have a relationship for citric acid content in different tangerine cultivar.

The influences of on-tree, off-tree and cold storage on physico-chemical and biochemical characteristics were quite similar between the two tangerine cultivars. In both cultivars, the percentage of weight loss increased and the moisture content of the peel (%) decreased at higher temperature and longer storage duration. Low temperature storage at 5°C reduced the losses of fruit weight and moisture content of the peel and preserved the external quality better than at 25°C storage. Both tangerine cultivars could be stored for almost 10 days at 25°C and 28 days at 5°C, and could be left on the tree for 15 days without the loss in visual appearance. The weight loss, moisture content of the peel and visual appearance score were not different between these two cultivars.

During on-tree and off-tree storage at 25 and 5°C, peel chlorophyll content decreased and peel carotenoid content increased, resulting in the changing of color from yellow-orange to orange. TA, citric acid, isocitric acid and vitamin C contents decreased and juice pH increased. Malic acid content remained relatively constant. TSS, TSS/TA ratio and sucrose content continually increased. Glucose and fructose contents slightly increased. The peel chlorophyll content, TA and citric acid content decreased faster during on-tree storage than at 25°C. The peel carotenoid, TSS and sucrose contents increased greater during on-tree storage than at 25°C. The delayed declining of peel chlorophyll, TA and citric acid contents and the slow increasing of the peel carotenoid, TSS and sucrose contents were observed at 5°C storage in comparison to 25°C. Low temperature storage could preserve carotenoid and vitamin C contents in juice better than 25°C storage. Peel and juice colors, peel chlorophyll and juice carotenoid contents were not different between both cultivars. 'Sai Num Phueng' had higher TA, TSS, citric acid, vitamin C, sucrose, glucose and fructose contents and lower peel carotenoid, isocitric acid contents, juice pH and TSS/TA ratio than 'See Thong'. Malic acid content did not differ between these two cultivars.

In both cultivars, the activities of mitochondrial citrate synthase, cytosolic aconitase and cytosolic NADP-IDH continuously decreased throughout on-tree storage and at 25°C storage. The same activities sharply decreased on day 7 and then remained relatively stable at the low levels until the end of storage period at 5°C.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Mitochondrial aconitase activity slightly decreased during on-tree and off-tree storage at 25 and 5°C. The activities of citrate synthase, cytosolic aconitase and cytosolic NADP-IDH were lower and decreased faster during storage at 25°C in comparison to on-tree storage. The activities of these enzymes, which were related to citric acid metabolism, slowed down which resulted in delaying the decrease of citric acid content during storage at 5°C in comparison to 25°C. The activities of citrate synthase, aconitase and NADP-IDH in mitochondrial and cytosolic fractions were not different between both cultivars.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การเปลี่ยนแปลงลักษณะเฉพาะทางเคมีกายภาพ ปริมาณกรดอินทรีย์ และกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของกรดซิตริก ระหว่างการเจริญเติบโต และการเก็บรักษาของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งและสีทอง

ผู้เขียน นางสาววรวลัญช์ รุ่งเรืองศรี

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.นิธิยา รัตนาปนนท์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รองศาสตราจารย์ ดร.ดนัย บุณยเกียรติ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพพล เล็กสวัสดิ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและกายภาพ ปริมาณกรดอินทรีย์ กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของกรดซิตริก ระหว่างการเจริญเติบโตและการเก็บรักษาบนต้นและหลังการเก็บเกี่ยวในผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งและสีทอง ผลการทดลองพบว่าผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งและสีทองมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพในช่วงระยะการเจริญเติบโตต่างๆ เหมือนกัน โดยน้ำหนักของผลส้มเพิ่มขึ้นตามขนาดที่เพิ่มขึ้น มีการสลายคลอโรฟิลล์และการสะสมแคโรทีนอยด์ในเปลือกตลอดระยะการพัฒนาของผลส้มทั้งสองพันธุ์ สีเปลือกจึงเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองส้ม และมีการสะสมแคโรทีนอยด์ในน้ำคั้น ทำให้สีน้ำคั้นของผลส้มเปลี่ยนจากสีเหลืองส้มเป็นสีส้มเข้ม กรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้และกรดซิตริกมีปริมาณเพิ่มขึ้นจนถึงระดับสูงสุดในระยะเริ่มต้นของการเจริญเติบโต หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว และลดลงอย่างช้าๆ เมื่อผลส้มเข้าสู่ระยะการแก่ การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในน้ำคั้นของผลส้ม กรดมาลิกและวิตามินซีมีปริมาณสูงในระยะเริ่มต้นของการเจริญเติบโตและลดลงเมื่อผลส้มเข้าสู่ระยะการแก่ กรดไอโซซิตริกมีปริมาณลดลงเมื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลส้มเข้าสู่ระยะการแก่ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ อัตราส่วนของปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ต่อปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ น้ำตาลซูโครส ฟรักโทส และกลูโคส มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในระยะการเจริญเติบโตและเพิ่มขึ้นช้าลงในระยะการแก่ ในระยะการแก่ของผลส้มปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ ของแข็งที่ละลายน้ำได้ กรดซิตริก วิตามินซี น้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรักโทสของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งมีปริมาณมากกว่าผลส้มพันธุ์สีทอง แต่ปริมาณแคโรทีนอยด์ในเปลือก ปริมาณกรดไอโซซิตริก ค่าพีเอชในน้ำคั้นของผลส้ม และอัตราส่วนของปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ต่อปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ของผลส้มพันธุ์สีทองมีปริมาณมากกว่าผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง สีเปลือกและสีน้ำคั้นของผลส้ม ปริมาณคลอโรฟิลล์ในเปลือก ปริมาณแคโรทีนอยด์ใน น้ำคั้น และปริมาณกรดมาลิก ไม่แตกต่างกันระหว่างผลส้มทั้งสองพันธุ์

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของกรดซิตริกในการควบคุมการสะสมและลดลงของกรดซิตริกที่ระยะการเจริญเติบโตต่างๆ ในผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งและสีทอง โดยวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ซิเทรตซินเทสในส่วนของไมโทคอนเดรีย กิจกรรมของเอนไซม์อะโคนิเทสในส่วนของไมโทคอนเดรียและไซโทซอล และเอ็นเอดีพี-ไอโซ-ซิเทรตดีไฮโดรจีเนส ในส่วนของไซโทซอล พบว่า ผลส้มทั้งสองพันธุ์มีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสามชนิดเหมือนกันตลอดระยะการเจริญเติบโต โดยในระยะเริ่มต้นของการเจริญเติบโต ในช่วงสัปดาห์ที่ 16-24 หลังดอกบาน เอนไซม์ซิเทรตซินเทสในไมโทคอนเดรียมีกิจกรรมเพิ่มขึ้น เอนไซม์อะโคนิเทสในไมโทคอนเดรียมีกิจกรรมลดลง และกรดซิตริกมีปริมาณเพิ่มขึ้นจนถึงระดับสูงสุด หลังจากนั้นเอนไซม์ทั้งสองชนิดดังกล่าวในไมโทคอนเดรีย มีกิจกรรมลดลงและคงที่อยู่ในระดับต่ำต่อไปจนผลส้มเข้าสู่ขั้นตอนการแก่ ระหว่าง 28-34 สัปดาห์หลังดอกบาน เอนไซม์อะโคนิเทสและเอ็นเอดีพี-ไอโซซิเทรตดีไฮโดรจีเนสในไซโตซอลมีกิจกรรมเพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับปริมาณกรดซิตริกที่ลดลง ระหว่างการแก่ (35-37 สัปดาห์หลังดอกบาน) เอนไซม์อะโคนิเทสและเอ็นเอดีพี-ไอโซซิเทรตดีไฮโดรจีเนสในไซโทซอล มีกิจกรรมลดลงและคงที่ในระดับต่ำ สอดคล้องกับปริมาณกรดซิตริกที่ลดลงอย่างช้าๆ ในระยะดังกล่าว ดังนั้น เอนไซม์ซิเทรตซินเทสและอะโคนิเทสในไมโทคอนเดรีย เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสะสมกรดซิตริกในระยะเริ่มต้นของการเจริญเติบโตของผลส้ม เอนไซม์อะโคนิเทสในไซโทซอลเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสลายกรดซิตริกระหว่างการเจริญเติบโตและแก่ของผลส้ม เอนไซม์เอ็นเอดีพี-ไอโซซิเทรตดีไฮโดรจีเนสทำงานร่วมกับเอนไซม์อะโคนิเทสในการสลายกรดซิตริกในไซโทซอล

กิจกรรมของเอนไซม์ซิเทรตซินเทสในไมโทคอนเดรียไม่แตกต่างกันระหว่างผลส้มทั้งสองพันธุ์ตลอดระยะการพัฒนาของผลส้ม แต่ผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งมีกิจกรรมของเอนไซม์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อะโคนิเทสในไมโทคอนเดรียและไซโทซอลต่ำกว่าผลส้มพันธุ์สีทอง สอดคล้องกับปริมาณกรดซิตริกที่ผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งมีปริมาณมากกว่าผลส้มพันธุ์สีทอง ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์อะโคนิเทสที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์ของผลส้ม ทำให้มีปริมาณกรดซิตริกแตกต่างกัน แต่กิจกรรมของเอนไซม์ซิเทรตซินเทสไม่มีผลต่อปริมาณกรดซิตริกที่แตกต่างกัน

ผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งและสีทองที่เก็บรักษาบนต้นและที่อุณหภูมิ 25 และ 5 องศาเซลเซียส มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมี กายภาพ และชีวเคมี เหมือนกัน ผลส้มทั้งสองพันธุ์สูญเสียน้ำหนักเพิ่มขึ้น และมีความชื้นเปลือกลดลงเมื่อเก็บรักษาไว้นานขึ้น การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ช่วยชะลอการสูญเสียน้ำหนักและความชื้นของเปลือกของผลส้มได้ และช่วยรักษาคุณภาพภายนอกได้นานกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ผลส้มทั้งสองพันธุ์สามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 28 วัน ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และภายหลังเก็บเกี่ยวทางการค้าผลส้มยังสามารถเก็บรักษาไว้บนต้นได้อีกประมาณ 15 วัน โดยยังคงมีลักษณะปรากฏที่ดี การสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณความชื้นเปลือกของผลส้ม และลักษณะปรากฏของผลส้มทั้งสองพันธุ์ไม่แตกต่างกัน

ผลส้มที่เก็บรักษาบนต้นและที่อุณหภูมิ 25 และ 5 องศาเซลเซียส เปลือกของผลส้มมีปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง ปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น ทำให้เปลือกของผลส้มเปลี่ยนจากสีเหลืองส้มเป็นสีส้มเข้มขึ้น และเมื่อเก็บรักษาไว้นานขึ้นกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ กรดซิตริก กรดไอโซ-ซิตริก และวิตามินซี มีปริมาณลดลง และค่าพีเอชในน้ำคั้นของผลส้มเพิ่มขึ้น กรดมาลิกมีปริมาณคงที่ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ อัตราส่วนของปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ต่อปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ และน้ำตาลซูโครส มีปริมาณเพิ่มขึ้น น้ำตาลฟรักโทสและกลูโคส มีปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเก็บรักษาไว้นานขึ้น

ผลส้มที่เก็บรักษาบนต้นมีปริมาณคลอโรฟิลล์ในเปลือก กรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ และกรดซิตริกลดลงเร็วกว่าผลส้มที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่มีปริมาณแคโรทีนอยด์ในเปลือก ของแข็งที่ละลายน้ำได้ และน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้นเร็วกว่าผลส้มที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส สามารถชะลอการสลายคลอโรฟิลล์และการเพิ่มขึ้นของแคโรทีนอยด์ในเปลือกของผลส้มได้ ทำให้เปลือกของผลส้มเปลี่ยนสีช้าลง ทำให้ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้และกรดซิตริกลดลงอย่างช้าๆ และยังทำให้ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ และน้ำตาลซูโครส มีปริมาณเพิ่มขึ้นช้าลง เมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำสามารถช่วยรักษาแคโรทีนอยด์และวิตามินซีในน้ำคั้นให้คงอยู่ได้นานขึ้น สีเปลือกและสีน้ำคั้น ปริมาณคลอโรฟิลล์ในเปลือก ปริมาณแคโรทีนอยด์ในน้ำคั้นของผลส้มทั้งสองพันธุ์ไม่แตกต่างกัน ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ ของแข็งที่ละลาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำได้ กรดซิตริก วิตามินซี น้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรักโทส ของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งมีปริมาณมากกว่าผลส้มพันธุ์สีทอง แต่ผลส้มพันธุ์สีทองมีปริมาณแคโรทีนอยด์ในเปลือก กรดไอโซซิตริก ค่าพีเอชในน้ำคั้นของผลส้ม และอัตราส่วนของปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ต่อปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้มากกว่าผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง ปริมาณกรดมาลิกไม่แตกต่างกันระหว่างผลส้มทั้งสองพันธุ์

กิจกรรมของเอนไซม์ซิเทรตซินเทสในไมโทคอนเดรีย และกิจกรรมของเอนไซม์อะโคนิเทสและเอ็นเอดีพี-ไอโซซิเทรตดีไฮโดรจีเนสในไซโทซอลของผลส้มทั้งสองพันธุ์ที่เก็บรักษาบนต้นและที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมลดลงเมื่อเก็บรักษาไว้นานขึ้น ในขณะที่ผลส้มที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 7 และคงที่ในปริมาณที่ต่ำตลอดระยะการเก็บรักษา ส่วนเอนไซม์อะโคนิเทสในไมโทคอนเดรียมีกิจกรรมลดลงเล็กน้อยเมื่อเก็บรักษาไว้นานขึ้น เอนไซม์ซิเทรตซินเทส อะโคนิเทส และเอ็นเอดีพี-ไอโซซิเทรตดีไฮโดรจีเนสในไซโทซอลของผลส้มที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมลดลงเร็วกว่าและมีกิจกรรมต่ำกว่าผลส้มที่เก็บรักษาบนต้น การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำมีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของกรดซิตริกจึงทำให้ปริมาณกรดซิตริกลดลงช้าลง เมื่อเปรียบเทียบกับผลส้มที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ซิเทรตซินเทส อะโคนิเทส และเอ็นเอดีพี-ไอโซซิเทรตดีไฮโดรจีเนสในไมโทคอนเดรียและในไซโทซอลของผลส้มทั้งสองพันธุ์ไม่แตกต่างกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved