

จุลกายวิภาคและองค์ประกอบทางชีวเคมีของเปลือกผลลำไยปกติและที่เกิดอาการสะท้อนหนาว
Microscopic Anatomy and Biochemical Components of Normal and Chilling Injured of Longan Pericarp

สมคิด ใจตรง¹ นิธิยา รัตนพานนท์² จอห์น แมนที่³ อลิธซาเบต บาลด์วิน³ และ ดนัย บุญเกียรติ⁴
Somkit Jaitrong¹, Nithiya Rattanapanone², John A. Manthey³, Elizabeth A. Baldwin³ and Danai Boonyakiat⁴

Abstract

Microscopic anatomy of longan fruit cv. Daw and Biew Kiew were assessed using stereo microscopy, light microscopy (LM), scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). It was found that there were many natural opening on the outer surface of longan pericarp. The thin discontinuous cuticle covered the surface, and there were trichomes and a few stomata scattered on the pericarp. The transverse section was observed by LM, SEM and TEM. Pericarp thickness in cv. Daw was about 518-644 μm (average 575 μm) and about 475-630 μm (average 552 μm) in cv. Biew Kiew. The pericarp of both cultivars had similar structure and consisted of three layers consisted of exocarp, mesocarp (thickness was about 70% of the total pericarp) and endocarp. The layers differed by cell shape and arrangement. In addition, the inner side was slightly curved when assessed by SEM. The longan pericarp exhibits discoloration (water-soaking and/or browning). Pericarp from fruit with CI induced by storage at $5\pm 1^{\circ}\text{C}$, $90\pm 2\%$ RH for 14 days, showed flaking of the cuticle, damaged trichomes and damaged parenchyma cell walls in the mesocarp. Polyphenol oxidase (PPO) activity, total phenolic content, electrolyte leakage and soluble protein content of fruit with CI were also studied. There were increases in PPO activity and electrolyte leakage in CI fruit pericarp. However, total phenolic compounds and protein content decreased in both varieties of longan fruit with CI compared to non-injured fruit. The pericarp of both normal and CI fruits were freeze-dried and subsequently extracted with 80% aqueous methanol to evaluate the number of phenolic compounds. High performance liquid chromatography – photodiode array (HPLC-PDA) analysis of the methanol extracts showed a very large number of phenolic compounds. The main classes of phenolic compounds were tentatively identified as ellagic acid, quercetin and kaempferol. They were detected by HPLC-Electrospray ionization (ESI)-MS analysis. Both kaempferol and quercetin slightly decreased in fruit with CI compared to non-injured fruit.

Key words: Anatomy, chilling injury, longan pericarp, PPO, SEM, TEM, HPLC-ESI-MS.

บทคัดย่อ

ผลการศึกษาลักษณะจุลกายวิภาคของเปลือกผลลำไยพันธุ์ดอและเบี้ยวเขียวด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscopy) กล้อง light microscopy (LM) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscopy; SEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (transmission electron microscopy; TEM) พบว่าผิวเปลือกของผลลำไยมีรูเปิดธรรมชาติมีลักษณะเป็นรอยแตกทั่วผิวผล มีคิวติเคิลบางๆ ปกคลุมอย่างไม่ต่อเนื่อง มีไตรโคม (trichomes) และสโตมาตา (stomata) กระจายเป็นกลุ่มบนผิวเปลือกผลลำไย เมื่อตัดตามขวางและดูภายใต้กล้อง LM, SEM และ TEM พบว่าโครงสร้างเปลือกทั้ง 2 พันธุ์คล้ายกัน ความหนาของเปลือกผลลำไยพันธุ์ดอและเบี้ยวเขียว อยู่ในช่วง 518-644 (เฉลี่ย 575) และ 475-630 (เฉลี่ย 552) ไมโครเมตร ตามลำดับ สามารถแบ่งชั้นของเปลือกตามรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ได้เป็น 3 ชั้น คือ เปลือกชั้นนอก (exocarp) เปลือกชั้นกลาง (mesocarp) มีความหนาประมาณ 70% ของความหนาทั้งเปลือก

¹ สถานีวิจัยการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

¹ Postharvest Technology Institute, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200.

² ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50100

² Department of Food Science and Technology, Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100

³ USDA/ARS Citrus & Subtropical Product Laboratory, Winter Haven, Florida 33881, USA.

⁴ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

⁴ Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200.

และเปลือกชั้นใน (endocarp) ขณะที่ผิวด้านในของเปลือกผลลำไยมีลักษณะเป็นคลื่นเล็กน้อยเมื่อดูภายใต้กล้อง SEM ผลลำไยสดพันธุ์ดอ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 ± 1 °C ความชื้นสัมพัทธ์ $90 \pm 2\%$ เป็นเวลา 14 วัน พบว่าผลลำไยเริ่มแสดงอาการสะท้อน-หนาวซึ่งมีลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาลฉ่ำน้ำบนเปลือกผลลำไยเมื่อเก็บรักษานาน 6 วัน และเกิดอาการสะท้อนหนาวทั่วทั้งผลเมื่อเก็บรักษานาน 14 วัน เปลือกผลลำไยที่เกิดอาการสะท้อนหนาวจะพบความเสียหายของชั้นคิวติเคิลที่ผิว ไตรโคม และผนังเซลล์ของเนื้อเยื่อพื้นฐาน (parenchyma cell) เมื่อระดับความรุนแรงของอาการสะท้อนหนาวเพิ่มขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์ PPO และการรั่วไหลของสารอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นแต่ปริมาณสารประกอบฟีนอลและโปรตีนลดลงระหว่างเกิดอาการสะท้อนหนาว ในการจำแนกชนิดของสารประกอบฟีนอลในเปลือกผลลำไยปกติและเปลือกที่เกิดอาการสะท้อนหนาว ใช้เปลือกผลลำไย freeze-dried และสกัดด้วย 80% methanol จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไป hydrolysis ด้วยกรด แล้ววิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลด้วย HPLC-ESI-MS พบว่าสารประกอบฟีนอลที่จำแนกได้ คือ ellagic acid, quercetin และ kaempferol เมื่อผลลำไยเกิดอาการสะท้อนหนาว พบว่าปริมาณของ quercetin และ kaempferol ลดลง

คำนำ

ปัจจัยหลักที่ส่งผลทำให้อายุการเก็บรักษาของผลลำไยสดหลังการเก็บเกี่ยว คือ การเน่าเสีย และการเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผลลำไย (Jiang *et al.*, 2002) ซึ่งการเกิดสีน้ำตาลของเปลือกนี้มีสาเหตุหลักมาจาก การสูญเสียน้ำ และการเกิดอาการสะท้อนหนาว ซึ่งมีลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาลฉ่ำน้ำกระจายบนเปลือก (Wang, 1990) ส่งผลให้ไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค ปัจจัยที่สำคัญต่อการเกิดสีน้ำตาล คือ เอนไซม์ PPO สารประกอบฟีนอล และ ออกซิเจนที่จะใช้ในการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลขึ้นได้ tissue (Martinez and Whitaker, 1995) การที่ผลลำไยมีเปลือกแห้งอย่างรวดเร็ว และการเกิดอาการสะท้อนหนาว น่าจะสัมพันธ์กับโครงสร้างของเปลือก การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ และสารประกอบฟีนอลในเปลือก แต่ยังไม่มียานการวิจัยในประเทศไทย งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาลักษณะกายวิภาคของเปลือกผลลำไย และการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ PPO และสารประกอบฟีนอลในเปลือกผลลำไยปกติเปรียบเทียบกับที่เกิดอาการสะท้อนหนาว

อุปกรณ์และวิธีการ

ผลลำไยสดระยะเก็บเกี่ยวทางการค้าพันธุ์ดอ และเบี้ยวเขียว จากสวนเกษตรกรในจังหวัดลำพูน มาตัดให้มีเหลี่ยมติดกับผลประมาณ 0.5 ซม. นำมาศึกษาภายใต้กล้องสเตอริโอทัศน์ที่ และเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาทางกายวิภาคตามวิธีการของ Bozzola and Russell (1999) แล้วนำมาศึกษาทางกายวิภาคด้วยกล้อง LM (Olympus AX70TF, Olympus optical Co., Ltd, Japan) SEM และ TEM (JEOL, Model JSM-840A, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) ตามวิธีการของ Bozzola and Russell (1999) วัดค่าการรั่วไหลของสารอินทรีย์ที่วัดตามวิธีการของ King and Ludford (1983) สกัดและวัดกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ตามวิธีการของ Jiang (1999) วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดตามวิธีการของ Bradford (1976) สกัดสารประกอบฟีนอลตามวิธีการของ Amiot *et al.* (1992) และ Sun *et al.* (2002) และวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดตามวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric ส่วนการจำแนกชนิดของสารประกอบฟีนอลในเปลือกผลลำไยปกติและเปลือกที่เกิดอาการสะท้อนหนาว ใช้เปลือกผลลำไย freeze-dried และสกัดด้วย 80% methanol (Manthey and Busling, 2003) จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไป hydrolysis ด้วยกรด (Mabry *et al.*, 1970) แล้ววิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลด้วย HPLC-ESI-MS (An Alliance 2695, Waters, Milford, Mass)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการศึกษาลักษณะจุลกายวิภาคของเปลือกผลลำไยพันธุ์ดอและเบี้ยวเขียวด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscopy) กล้อง light microscopy (LM) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscopy; SEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (transmission electron microscopy; TEM) พบว่าผิวเปลือกของผลลำไยมีรูเปิดธรรมชาติมีลักษณะเป็นรอยแตกทั่วผิวผล มีคิวติเคิลบางๆ ปกคลุมอย่างไม่ต่อเนื่อง มีไตรโคม (trichomes) และสโตมาตา (stomata) กระจายเป็นกลุ่มบนผิวเปลือกผลลำไย เมื่อตัดตามขวางและดูภายใต้กล้อง SEM, LM และ TEM พบว่าโครงสร้างเปลือกทั้ง 2 พันธุ์คล้ายกัน ความหนาของเปลือกผลลำไยพันธุ์ดอและเบี้ยวเขียว อยู่ในช่วง 518-644 (เฉลี่ย 575) และ 475-630 (เฉลี่ย 552) ไมโครเมตร ตามลำดับ สามารถแบ่งชั้นของเปลือกตามรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ได้เป็น 3 ชั้น ซึ่งแยกกันอย่างไม่ชัดเจน คือ เปลือกชั้นนอก (exocarp) ประกอบด้วยชั้นคิวติเคิล อีพิเดอมิส จนถึงเซลล์รูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้าเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ 2-3 ชั้นเซลล์ เปลือกชั้นกลาง (mesocarp) มีความหนาประมาณ 70% ของความ

หน้าทั้งเปลือก พบเซลล์ที่มีรูปร่างและขนาดแตกต่างกัน คือ พบทั้งรูปร่างยาวรีและค่อนข้างกลม stone cells กลุ่มท่อน้ำท่ออาหาร และมีช่องว่างระหว่างเซลล์ขนาดใหญ่กระจายอยู่ทั่วไป ส่วน stone cells มีผนังเซลล์หนา เปลือกชั้นใน (endocarp) เป็นเซลล์รูปร่างสี่เหลี่ยมจัตุรัสชั้นเดียวเรียงต่อกันอย่างเป็นระเบียบ ขณะที่ผิวด้านในของเปลือกผลลำไยมีลักษณะเป็นคลื่นเล็กน้อยเมื่อดูภายใต้กล้อง SEM ผลลำไยสดพันธุ์ดอ (Fig. 1) เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ $90 \pm 2\%$ เป็นเวลา 14 วัน พบว่าผลลำไยของผลลำไยเริ่มแสดงอาการสะท้อนหนาวที่เปลือกด้านใน ซึ่งมีลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาลจ้ำน้ำ เมื่อเก็บรักษานาน 6 วัน และเกิดอาการสะท้อนหนาวทั่วทั้งผลเมื่อเก็บรักษานาน 14 วัน เปลือกผลลำไยที่เกิดอาการสะท้อนหนาวจะพบความเสียหายของชั้นคิวติเคิลที่ผิว ไตรโคม และผนังเซลล์ของเนื้อเยื่อพื้นฐาน (parenchyma cell) เมื่อระดับความรุนแรงของอาการสะท้อนหนาวเพิ่มขึ้น กิจกรรมของ PPO และการรั่วไหลของสารอีเล็กโตรไลต์เพิ่มขึ้น แต่ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลและโปรตีนลดลงระหว่างเกิดอาการสะท้อนหนาว (Fig. 2) ส่วนการจำแนกชนิดของสารประกอบฟีนอลในเปลือกผลลำไยปกติและเปลือกที่เกิดอาการสะท้อนหนาว โดยใช้เปลือกผลลำไย freeze-dried และสกัดด้วย 80% methanol จากนั้น นำสารสกัดที่ได้ไป hydrolysis ด้วยกรด แล้ววิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลด้วย HPLC-ESI-MS พบว่าสารประกอบฟีนอลที่จำแนกได้ คือ ellagic acid, quercetin และ kaempferol conjugates (Fig. 3) เมื่อผลลำไยเกิดอาการสะท้อนหนาว พบว่าปริมาณของ quercetin และ kaempferol ลดลง

สรุป

เปลือกของผลลำไยด้านนอกมีลักษณะเป็นรอยแตกตามธรรมชาติ และมีคิวติเคิลบางๆ ปกคลุม ผลลำไยต่างพันธุ์กัน มีโครงสร้างเปลือกคล้ายกัน สามารถแบ่งโครงสร้างของเปลือกผลลำไยตามรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ได้เป็น 3 ชั้น คือ ชั้นนอก ชั้นกลาง และชั้นใน เมื่อผลลำไยเกิดอาการสะท้อนหนาว เปลือกของผลลำไยจะเกิดจุดสีน้ำตาลจ้ำน้ำ และกิจกรรมของ PPO และการรั่วไหลของสารอีเล็กโตรไลต์เพิ่มขึ้น แต่ปริมาณโปรตีนและสารประกอบฟีนอลลดลง และสารประกอบฟีนอลที่จำแนกได้ในเปลือกลำไย คือ ellagic acid, quercetin และ kaempferol ซึ่งปริมาณของ quercetin และ kaempferol ลดลงเมื่อผลลำไยเกิดอาการสะท้อนหนาว

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนสนับสนุนในการวิจัยครั้งนี้ ในนามทุน "คปก. รุ่นที่ 6." สัญญาเลขที่ PHD/0011/2546

เอกสารอ้างอิง

- Amiot, M. J., M. Tacchini, S. Aubert, and J. Nicolas. 1992. Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J. Food Sci.* 57(4): 958-962.
- Bozzola, J. J., and L. D. Russell. 1999. Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists. 2nd ed., Jones and Bartlett Publishers, Massachusetts, USA. 17-47 pp.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitative of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Jiang, Y. M. 1999. Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit. *Food Chem.* 66: 75-79.
- Jiang, Y. M., Z. Zhang, D. C. Joyce, and S. Ketsa. 2002. Postharvest biology and handling of longan fruit (*Dimocarpus longan* Lour.). *Postharvest Biol. Technol.* 26: 241-252.
- King, M. M., and P. M. Ludford. 1983. Chilling injury and electrolyte leakage in fruit of different tomato cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108 (1): 74-77.
- Mabry, T. J., K. R. Markham and M. B. Thomas. 1970. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag, New York. pp 24-25.
- Martinez, M. V., and J. R. Whitaker. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology.* 6: 195-200.
- Sun, J., Y. F. Chu, X. Wu, and R. H. Liu. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7449-745
- Wang, C. Y. 1990. Chilling Injury of Horticultural Crops. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 313p.

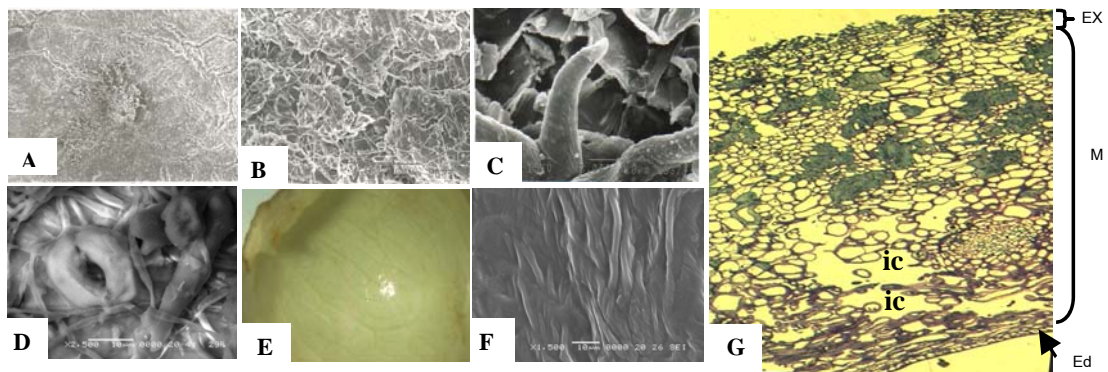


Figure 1. Scanning electron, stereo and light micrograph of pericarp. A = pericarp surface (Mag. x70), B = natural openings (Mag. x350), C = trichome (Mag. x3000), D = stomata (Mag. x2500), E = shiny inner side of pericarp (Mag. x4), F = slightly curve of inner side of pericarp (Mag. x1500) and G= transverse section of pericarp (Mag.x10). Ex= exocarp, M= mesocarp, Ed= endocarp, Ic= intercellular space, the green color is stone cells.

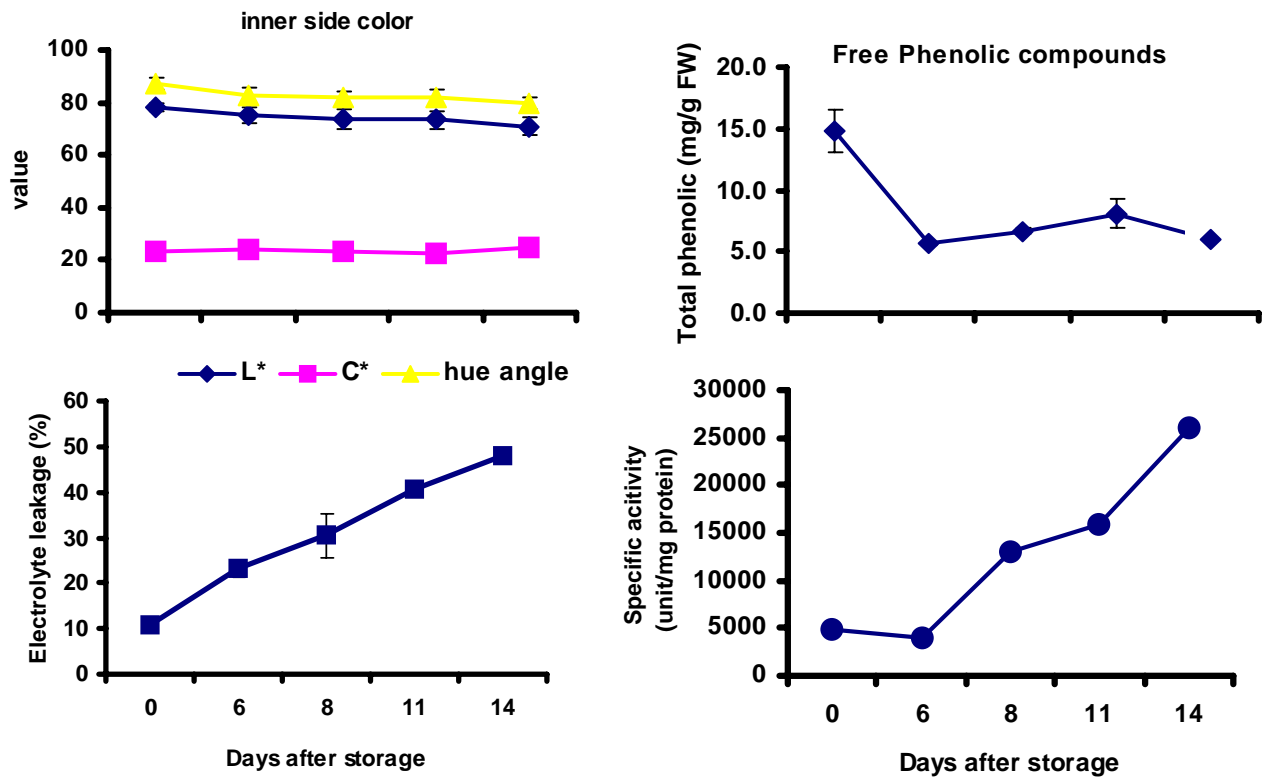


Figure 2. Physico-chemical changes of longan pericarp during chilling injury (storage at 5°C for 14 days).

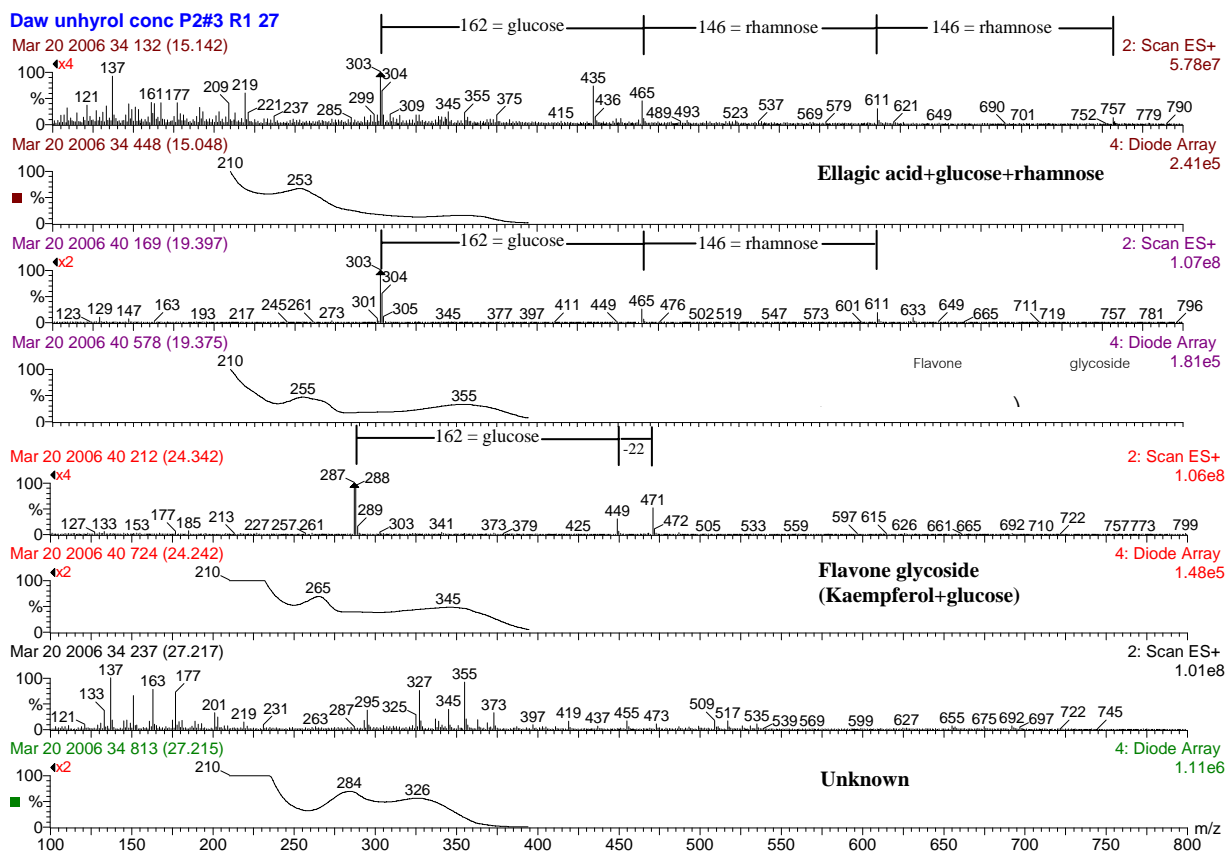


Figure 3. UV and Mass Spectra of 4 main class of phenolics including ellagic acid, flavone glycosides, and unknowns in longan pericarp.