

溫湯處理及冷藏對'台農 17 號'鳳梨果實 有機酸代謝之影響

劉名旂¹⁾ 陳京城²⁾

關鍵字：鳳梨、溫湯處理、冷藏、有機酸代謝

摘要：'台農 17 號'鳳梨果實之檸檬酸含量經貯藏後有降低之趨勢，而溫湯處理後冷藏(36-45°C+8°C)與未經處理者比較，則有提高之趨勢。蘋果酸含量經常溫貯藏後上升，但經溫湯處理後其含量並無顯著之變化。經溫湯處理後(36-45°C)檸檬酸含量與處理前(blank)並無顯著差異，而之後再經冷藏(8°C)後則有較未經處理者高之趨勢。在酵素活性方面，經溫湯處理後之 CS、MDH、cIDH 及 cME 均有上升之情形，而 cACO 及 mME 則下降。經溫湯處理後冷藏之果實其 CS、MDH、mACO、cME、cIDH 及 PEPC 酵素活性均呈現上升之趨勢。CS 酵素活性的提高，可能增加檸檬酸之生合成；MDH、mACO、cIDH、cME 及 PEPC 酵素活性的提高，可能促使蘋果酸生合成，其可作為檸檬酸循環或其他生化合成之原料；cIDH 活性提高亦可將檸檬酸用作胺基酸生合成原料。檸檬酸含量與 cME 活性呈正相關，與 PEPC 活性呈負相關；蘋果酸含量則與 mACO 及 cME 活性呈負相關，與 PEPC 活性呈正相關。從上述結果推測溫湯處理造成之鳳梨果實有機酸含量下降，可能為呼吸作用速率提高所致，但也有可能有部份之有機酸被供作抗逆境蛋白生合成之用，因而造成其含量之下降。

前 言

園產品熱處理(heat treatment)指在園產品貯藏前，利用高溫(約 36°C~50°C)處理以達到防止果實腐敗、延緩後熟、殺死害蟲、維持品質及減輕低溫傷害等目的之處理方式(Lurie, 1998)。熱處理中的溫湯處理又被稱為熱水處理(hot water dipping treatment; HWT)，常被用於對病原菌的控制上，短時間的處理溫度可達 50-70°C，一般以果心溫度達 46-47°C後持

-
- 1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。
 - 2) 國立中興大學園藝學系助理教授，通訊作者。

續 20 分鐘為主要處理方式(官, 2004)。除此之外, 也可利用於防治鳳梨果實黑心病(蘇, 2008)。

熱處理一般會降低果實的酸含量, 而對果實的糖度影響較小, 因此使果實變甜(Paul and Chen, 2000)。蘋果經熱處理後亦會使酸度降低(Klein and Lurie, 1992)。熱處理降低鳳梨果實的可滴定酸含量(Weerahewa and Adikaram, 2005), 而降低的有機酸種類則以檸檬酸及蘋果酸為主(官, 2004)。

檸檬酸主要被用作糖的產生、胺基酸合成及 acetyl-CoA 的代謝(Katz *et al.*, 2007)。檸檬酸在粒線體中經 citrate synthase(CS)催化 oxaloacetate(OAA)及 acetyl-CoA 濃縮產生, 而經 mitochondrion-aconitase(mACO)異構成異檸檬酸後, 再經 mitochondrion-isocitrate dehydrogenase(mIDH)催化生成 2-oxoglutarate(2-OG), 用以繼續檸檬酸循環; 在細胞質中則經 cytosolic-ACO(cACO)與 cytosolic-IDH(cIDH)作用代謝, 而為氨基酸之生合成所用(Sadka *et al.*, 2000; Katz *et al.*, 2007)。因此, 檸檬酸的合成受到 CS 活性所影響, 降解則受到 ACO 及 IDH 的作用所調控。一般認為蘋果酸合成的關鍵酵素為 phosphoenolpyruvate carboxylase(PEPC), 其主要存在於細胞質中, 可催化 phosphoenolpyruvate(PEP)羧化產生 OAA 的反應, OAA 則可經 malate dehydrogenase(MDH)催化產生蘋果酸, 也可經糖質新生作用(gluconeogenesis)而還原成糖類(Beruter, 2004)。另外在粒線體中, 蘋果酸可經檸檬酸循環為 fumarate 催化而產生, 而為 MDH 催化而代謝成 OAA, 但其亦可催化 OAA 產生蘋果酸(Katz *et al.*, 2007)。蘋果酸則可在細胞質或粒線體中經由 ME 或 MDH 催化而代謝(Katz *et al.*, 2007)。

果實酸度是決定鳳梨食用品質的主要因素之一, 而有機酸的含量影響酸度的高低, 故有機酸代謝相關酵素為影響果實酸度之重要因素。本試驗之目的為分析鳳梨果實經溫湯處理及冷藏後之有機酸含量變化與其相關代謝酵素活性之關係, 尋找影響鳳梨果實酸度差異之主要關鍵酵素, 以作為將來利用熱處理改善鳳梨果實黑心病及改良鳳梨果實品質時之參考。

材料與方法

一、試驗材料

試驗材料為台灣主要鳳梨栽培品種'台農 17 號', 來源為南投縣名間鄉陳姓農戶之鳳梨園, 取樣於 2007 年 7 月上旬。採樣依果實成熟度判斷, 以果皮顏色為基準, 選取果實為綠熟期之鳳梨。

二、試驗方法

溫湯處理為果心溫度達到 36°C、39°C、42°C 及 45°C 後立即取出, 取出後於室溫(25±2°C)待其陰乾, 再予以調查, 另有溫湯處理並陰乾後移至 8°C 冷藏 14 天, 再移出至室溫(25±2°C)7

天後調查。CK1 為於室溫(25±2°C)下儲藏 21 天之果實，CK2 為無溫湯處理並 8°C 冷藏 14 天，再移出至室溫(25±2°C)儲藏 7 天之果實。每處理 6 顆果實。果實性狀調查於儲藏結束當天或隔日在實驗室中進行。酵素活性分析用之鳳梨果肉樣品為果實中段去除果心之果肉切成 1-2 cm³，用液態氮急速冷凍之，儲存於-20°C 下備用。酵素分析時將 2 顆果實之果肉樣品混合作 1 重複，共 3 重複。

三、有機酸之分析

檸檬酸、蘋果酸及總有機酸含量：將冷凍之鳳梨果肉樣品以研鉢在液態氮中磨成粉末，取樣品 5 g 加入純水 20 ml，以均質機充分混合 2 分鐘，置於 40°C 溫水浴 30 分鐘，再離心(10,000 ×g) 10 分鐘。取上層液 1.5 ml 後以 0.45 μm 過濾膜(Millex-HV, Millipore)除去雜質，再以高效能液相層析儀(high performance liquid chromatography, HPLC)[幫浦：Hitachi pump L-2130、檢測器：Hitachi UV detector L-2400、column：Waters KC-811]分析之，分析條件為：管柱溫度 60°C，移動相 0.1% phosphoric acid，流速 1 ml min⁻¹，紫外光檢測波長 210 nm，進樣量 20 μl，以百分比表示之。

四、有機酸代謝酵素(CS、MDH、ACO、IDH、ME、PEPC)活性之分析

1. 酵素萃取

酵素之萃取乃參照 Chen 及 Paull (2000)之方法修正。將冷凍之鳳梨果肉樣品以研鉢在液態氮中磨成粉末。依樣品:緩衝液=1:3 的比例，取果肉樣品 5g 加入 15 ml 緩衝液[100 mM 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS，以 5 M NaOH 調整至 pH7.5)，1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)，2.5 mM DL-Dithiothreitol (DTT)，0.05% Triton X-100 (v/v)，1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)，20 μM trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64)，10 mg/ml polyvinyl pyrrolidone (PVPP)]以均質機充分混合 2 分鐘，離心(13,000 ×g) 30 分鐘，其上層液為可溶性酵素萃取液，可測定蛋白質含量、MDH、CS 活性。另外取可溶性酵素萃取液 5 ml，使用去鹽過濾濃縮管(Amicon Ultra 30,000 MWCO, Millipore)純化酵素。以緩衝液[100 mM MOPS (pH 7.5)，2.5 mM DTT]稀釋鹽類濃度 500 倍以上。離心(3500 ×g)濃縮上層液至 1.5 ml，用於測定濃縮蛋白質含量、PEPC、ACO、ME、IDH 活性。全程樣品均置於 4°C 下。萃取酵素之相關藥品購自 Sigma 及 USB 公司。

2. 蛋白質含量測定

參照 Bradford(1976)之方法修正，取 4 ml 反應試劑[0.01% (w/v) brilliant blue G-250, 4.7% (v/v) ethanol, 8.5% phosphoric acid]加入 0.1 ml 可溶性酵素萃取液，反應 2 分鐘後，以分光光度計(Thermo Spectronic, HeLIOSα)測定波長 595 nm 之 OD 值。標準曲線為牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA) 0-125 μg 之 OD 值。

3. 酵素活性之測定

(1) CS (citrate synthase)

本測定方法參考 Morgunov and Srere(1998)修正之。1 ml 反應溶液[100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM OAA, 0.2 mM Acetyl-CoA, 0.2 mM DTNB, 50 μ l 可溶性酵素萃取液]，混合均勻後測定延遲 3 秒，反應 15 秒後，波長 420 nm 之上升 OD 值。

(2) MDH(malate dehydrogenase)

本測定方法參考 Morgunov and Srere(1998)修正之。1 ml 反應溶液[100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 mM NADH, 0.5 mM OAA, 50 μ l 可溶性酵素萃取液]，混合均勻後測定延遲 5 秒，反應 30 秒後，波長 340 nm 之下降 OD 值。

(3) ACO(aconitase)

本測定方法參考 Jenner 等人(2001)修正之。

cACO(cytosolic-aconitase)測定：1 ml 反應溶液[80 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 0.05% Triton X-100, 0.5 mM NADP, 0.2 U NADP⁺-isocitrate dehydrogenase, 8 mM aconitate, 5 mM MnCl₂, 50 μ l 可溶性酵素濃縮萃取液]，混合均勻後測定延遲 10 秒，反應 1 分鐘後，波長 340 nm 之上升 OD 值。

mACO(mitochondrion-aconitase)測定：1 ml 反應溶液[80 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 0.05% Triton X-100, 0.5 mM NAD⁺, 0.2 U NADP⁺-isocitrate dehydrogenase, 8 mM aconitate, 5 mM MnCl₂, 50 μ l 可溶性酵素濃縮萃取液]，混合均勻後測定延遲 10 秒，反應 1 分鐘後，波長 340 nm 之上升 OD 值。

(4) IDH (isocitrate dehydrogenase)

本測定方法參考 Gallardo 等人 (1995)修正之。

cIDH(cytosolic-IDH)測定：1 ml 反應溶液[100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 2 mM isocitrate, 0.5 mM NADP, 50 μ l 可溶性酵素濃縮萃取液]，混合均勻後測定延遲 10 秒，反應 1 分鐘後，波長 340 nm 之上升 OD 值。

mIDH(mitochondrion-IDH)測定：1 ml 反應溶液[100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 2 mM isocitrate, 0.5 mM NAD⁺, 50 μ l 可溶性酵素濃縮萃取液]，混合均勻後測定延遲 10 秒，反應 1 分鐘後，波長 340 nm 之上升 OD 值。

(5) ME(malic enzyme)

本測定方法參考 Knee and Finger (1992)修正之。

cME(cytosolic-malic enzyme)測定：1 ml 反應溶液[100 mM MOPS (pH 7.0), 10 mM malate, 0.5 mM NADP, 5 mM MnCl₂, 50 μ l 可溶性酵素濃縮萃取液]，混合均勻後測定延遲 10 秒，反應 1 分鐘後，波長 340 nm 之上升 OD 值。

mME(mitochondrion-malic enzyme)測定：1 ml 反應溶液[100 mM MOPS (pH 7.0), 10 mM malate, 0.5 mM NAD⁺, 5 mM MnCl₂, 50 μ l 可溶性酵素濃縮萃取液]，混合均勻後測定延遲 10 秒，反應 1 分鐘後，波長 340 nm 之上升 OD 值。

(6) PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase)

本測定方法參考 Merlo 等人(1993)修正之。1 ml 反應溶液[100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl₂, 50 mM NaHCO₃, 3 U malate dehydrogenase, 0.2 mM NADH, 2 mM PEP, 100 μl 可溶性酵素濃縮萃取液]，混合均勻後測定延遲 10 秒，反應 1 分鐘後，波長 340 nm 之下降 OD 值。

(7) 活性換算

參照 Morgunov and Srere(1998)，以 DTNB 於 A₄₂₀ 下之 molar absorption coefficients 為 13,600 M⁻¹ cm⁻¹，NAD(P)於 A₃₄₀ 下之 molar absorption coefficients 為 6,300 M⁻¹ cm⁻¹ 換算之。

五、統計分析

本試驗之數據以 Microsoft Excel 整理並製作試算表及相關性分析，並以 SAS(Statistic Analysis System)套裝軟體進行 ANOVA 分析，以最小顯著差異法(Least Significant Difference method, LSD)做事後比較分析，顯著水準(significance level)為 5%。

結果

'台農 17 號'鳳梨果實經溫湯處理及冷藏後之有機酸含量調查如表 1。未經溫湯處理前之檸檬酸含量為 0.63%，在常溫貯藏後(CK1)約下降 0.12%，經冷藏後(CK2)約下降 0.14%，具顯著差異；溫湯處理後(36-45°C)檸檬酸含量與處理前(blank)並無顯著差異，但有降低之趨勢，而之後再經冷藏除 45°C+8°C 之處理顯著較 CK1 及 CK2 高外，其他處理並無顯著差異，但有提高之趨勢。未經溫湯處理前之蘋果酸含量為 0.19%，在常溫貯藏後(CK1)顯著上升，約上升 0.17%，經冷藏後(CK2)則無顯著差異；溫湯處理後(36-45°C)蘋果酸含量與 blank 並無顯著差異，而之後再經冷藏者均顯著低於 CK1，但與 CK2 差異不顯著。未經溫湯處理前之總酸量為 0.82%，經冷藏後(CK2)顯著下降，約下降 0.09%；溫湯處理後(36-45°C)總酸量與 blank 並無顯著差異，而之後再經冷藏亦與 CK1 及 CK2 無顯著差異，但有降低之趨勢。

'台農 17 號'鳳梨果實於溫湯處理及冷藏後之有機酸相關代謝酵素活性及比活性變化如表 2 及表 3。CS 酵素活性於常溫貯藏(CK1)時活性可上升至 3.77 mmol min⁻¹ g⁻¹ Fw，而經冷藏處理者(CK2)較低，約 2.34 mmol min⁻¹ g⁻¹ Fw，但並未達顯著之差異；比活性變化有類似之情況。經溫湯處理而未貯藏(36-45°C)者，其 CS 酵素活性亦有上升之情形，其中以 36°C 及 42°C 溫湯處理之 CS 酵素活性顯著較 blank 高；比活性變化亦有類似結果，但僅有以 36°C 溫湯處理者具顯著差異。經溫湯處理後冷藏(36-45°C+8°C)之 CS 酵素活性與 CK2 並無顯著差異，但經溫湯處理後有活性較高之情形，且其活性於經 42°C+8°C 處理者與 CK1 較接近；比活性變化有類似情況。MDH 酵素活性於常溫貯藏(CK1)時活性可上升至 3.24 mmol min⁻¹ g⁻¹ Fw，而經過冷藏處理之 CK2 較低，約 2.81 mmol min⁻¹ g⁻¹ Fw，但仍有上升且具顯著差異；比活性變化有類似之趨勢。經溫湯處理而未貯藏(36-45°C)者，其 MDH 酵

素活性有上升之情形，且均顯著較 blank 高；比活性變化有類似結果。經溫湯處理後冷藏(36-45°C+8°C)之 MDH 酵素活性除 42°C+8°C 處理外，均顯著較 CK2 高，且其活性與 CK1 均無顯著差異；比活性則僅有 45°C+8°C 處理顯著較 CK2 高，且均與 CK1 無顯著差異。mACO 酵素活性於 blank、CK1 及 CK2 之間並無顯著差異，但於 CK2 有較高之情形；於比活性亦無顯著差異。經溫湯處理而未貯藏(36-45°C)者，其活性與 blank 間並無顯著差異，但於 39-45°C 有上升之情形；比活性變化有類似情況。經溫湯處理後冷藏(36-45°C+8°C)之酵素活性與 CK2 及 CK1 均無顯著差異，但有經溫湯處理後活性較高之情形，其中於經 36°C+8°C 處理者與 CK1 較接近，經 42°C+8°C 處理者與 CK2 較接近；比活性變化有類似情況。cACO 酵素活性及比活性經貯藏(CK1 及 CK2)後活性降低。經溫湯處理而未貯藏(36-45°C)者，除 39°C 處理者外，其餘處理均顯著較 blank 為低；比活性變化有類似情況，但均顯著較 blank 為低。經溫湯處理後冷藏(36-45°C+8°C)之活性僅有經 45°C+8°C 處理者顯著較 CK2 高，其餘處理與 CK2 並無顯著差異；比活性變化則與 CK2 均無顯著之差異。mIDH 酵素活性及比活性於各處理間並無顯著差異。cIDH 酵素活性貯藏於常溫(CK1)時顯著上升至 $45.3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{Fw}$ ，而經溫湯處理(36-45°C)後其活性亦會顯著上升(除 39°C 處理之外)；比活性變化有類似之趨勢，其中經 39°C 及 42°C 溫湯處理者差異不顯著，但仍有上升之趨勢。經溫湯處理後冷藏(36-45°C+8°C)之酵素活性顯著較 CK2 為高，且與 CK1 較接近，其中僅 42°C+8°C 處理之活性顯著較 CK1 為低；比活性變化有類似情況，但經 36-45°C+8°C 處理之酵素比活性均較 CK1 為低。mME 酵素活性於常溫貯藏(CK1)時會降低，若經冷藏(CK2)可維持其活性；比活性則均有顯著的降低。經溫湯處理而未貯藏(36-45°C)者，其酵素活性與 blank 並無顯著之差異，但其活性有降低之趨勢；比活性變化則有顯著下降之情況。經溫湯處理後冷藏(36-45°C+8°C)之酵素活性與 CK2 並無顯著差異；比活性變化有類似情況。cME 酵素活性於 blank、CK1 及 CK2 之間並無顯著差異，但比活性於 CK1 及 CK2 顯著較低。經溫湯處理而未貯藏(36-45°C)者，其酵素活性有上升之情形，均顯著較 blank 為高；比活性則僅有 36°C 及 39°C 處理與 blank 無顯著差異，而 42°C 及 45°C 處理顯著較 blank 為低。經溫湯處理後冷藏(36-45°C+8°C)之酵素活性除 42°C+8°C 之外，均顯著較 CK2 為高；比活性與 CK2 並無顯著差異，但有比活性較高之趨勢。PEPC 酵素活性於常溫貯藏(CK1)時顯著上升，於冷藏(CK2)後會維持較低之活性，但經溫湯處理後(36-45°C)其活性變化差異不顯著；比活性有類似之趨勢。經溫湯處理後冷藏(36-45°C+8°C)之酵素活性除 42°C+8°C 處理外，均與 CK2 並無顯著差異，而 42°C+8°C 處理顯著較 CK2 為高，但各處理(36-45°C+8°C)之活性均有較 CK2 高之趨勢；比活性變化有類似情況。

'台農 17 號'鳳梨果實於溫湯處理及冷藏後之有機酸含量與其相關代謝酵素活性及比活性之相關性如表 4 所示。在活性方面，檸檬酸含量與 cME($r=0.8585$)($P \leq 0.01$)呈顯著正相關，與蘋果酸含量($r=-0.5525$)($P \leq 0.1$)及 PEPC($r=-0.5575$)($P \leq 0.1$)呈顯著負相關；蘋果酸含量與 PEPC($r=0.5560$)($P \leq 0.1$)呈顯著正相關，與 mACO($r=-0.5438$)($P \leq 0.1$)、mME(r

=-0.7104)($P \leq 0.05$)及 cME($r = -0.5953$)($P \leq 0.1$)呈顯著負相關。在比活性方面，檸檬酸含量與 cME($r = 0.8153$)($P \leq 0.01$)呈顯著正相關，與 PEPC($r = -0.5558$)($P \leq 0.1$)呈顯著負相關；蘋果酸含量與 cIDH($r = 0.6081$)($P \leq 0.05$)及 PEPC($r = 0.6774$)($P \leq 0.05$)呈顯著正相關，與 mACO($r = -0.5463$)($P \leq 0.1$)呈顯著負相關。

表 1. '台農 17 號'鳳梨果實經溫湯處理及冷藏後之有機酸含量

Table 1. The acid contents in 'TN17' pineapple fruit flesh after hot water dipping treatment and cold storage.

Treatment ^z	CA ^y (%)	MA(%)	TA(%)
Blank	0.63±0.07 a ^x	0.19±0.02 bcd	0.82±0.09 ab
CK1	0.51±0.00 c	0.36±0.00 a	0.87±0.00 a
CK2	0.49±0.06 c	0.21±0.02 bc	0.71±0.06 c
36°C	0.64±0.05 a	0.20±0.02 bcd	0.84±0.06 a
39°C	0.58±0.06 abc	0.18±0.02 bcd	0.76±0.07 abc
42°C	0.62±0.06 ab	0.19±0.02 bcd	0.81±0.07 abc
45°C	0.62±0.09 abc	0.18±0.02 d	0.80±0.10 abc
36°C+8°C	0.56±0.10 abc	0.22±0.05 b	0.77±0.13 abc
39°C+8°C	0.58±0.12 abc	0.19±0.02 bcd	0.77±0.13 abc
42°C+8°C	0.54±0.06 bc	0.19±0.04 bcd	0.73±0.07 bc
45°C+8°C	0.60±0.10 ab	0.18±0.03 cd	0.78±0.12 abc

^z Blank: No treatment and storage. CK1: No hot water treatment and stored at room temperature for 3 weeks. CK2: No hot water treatment, fruits were stored at 8°C for 2 weeks followed by at room temperature for 1 week. 36-45°C: After treated with hot water, no storage. 36-45°C+8°C: After treated with hot water, fruits were stored at 8°C for 2 weeks, followed by at room temperature for 1 week.

^y CA: Citric acid, MA: Malic acid, TA: Total acid.

^x Mean± Standard error. Mean separation within columns by Least Significant Difference (LSD) test, $P = 0.05$.

表 2. '台農 17 號'鳳梨果實經溫湯處理及冷藏後之有機酸相關代謝酵素活性變化

Table 2. Changes in activities of organic acid metabolizing enzymes in 'TN17' pineapple fruit after hot water dipping treatment and cold storage.

Treatment ^z	Activity(mmol min ⁻¹ g ⁻¹ Fw)		Activity(μmol min ⁻¹ g ⁻¹ Fw)						
	CS	MDH	mACO	cACO	mIDH	cIDH	mME	cME	PEPC
Blank	1.60±0.08 b ^y	2.24±0.33 f	16.8± 7.4 abc	19.5±2.8 a	9.4±3.6	a 9.1± 2.1 e	54.0±6.5 a	119.8±10.6 c	10.9±1.8 de
CK1	3.77±1.42 ab	3.24±0.16 bcde	15.8± 3.7 c	10.1±1.1 e	8.9±2.9	a 45.3± 2.3 a	37.0±7.4 b	99.1±12.8 c	20.7±1.1 a
CK2	2.34±1.50 ab	2.81±0.31 e	19.4± 3.2 abc	11.5±0.4 de	9.6±3.0	a 21.7± 4.3 d	49.3±7.2 a	101.5±13.4 c	11.8±1.0 bcde
∞ 36°C	3.98±1.91 a	3.77±0.38 a	16.3± 4.1 bc	12.6±3.2 bcde	8.7±1.4	a 23.7± 5.1 cd	45.9±4.0 a	144.8±11.3 a	10.2±2.0 e
39°C	3.01±1.41 ab	2.83±0.35 e	25.8± 3.0 a	16.0±2.4 abc	8.6±2.0	a 14.6± 1.2 de	49.8±3.9 a	126.8± 4.9 ab	9.0±1.4 e
42°C	3.91±1.93 a	3.70±0.45 ab	23.9±10.9 abc	12.2±1.1 cde	10.7±3.4	a 20.1± 6.6 d	46.2±6.0 a	132.1± 8.4 ab	12.7±5.4 bcde
45°C	2.69±1.45 ab	3.02±0.25 de	25.4± 4.6 ab	11.9±0.8 de	10.5±2.2	a 21.8± 4.2 d	48.3±4.2 a	126.5± 4.2 ab	11.1±0.8 cde
36°C+8°C	2.89±0.58 ab	3.63±0.38 abc	15.6± 7.2 c	12.9±3.1 bcde	10.4±2.9	a 44.8± 0.6 a	54.1±6.6 a	125.4±13.9 ab	16.3±6.4 abc
39°C+8°C	2.71±1.42 ab	3.60±0.10 abc	23.2± 5.0 abc	14.6±1.5 bcd	9.8±1.9	a 40.9± 7.2 a	47.2±4.7 a	128.5±18.7 ab	16.8±2.1 ab
42°C+8°C	3.96±1.29 a	3.18±0.29 cde	19.5± 1.5 abc	11.8±2.7 de	11.5±4.1	a 31.5± 5.5 bc	45.3±2.5 ab	111.8±20.0 c	19.3±2.9 a

					9					
45°C+8°C	4.14±0.18 a	3.46±0.05 abc	24.6± 2.6 abc	16.2±3.4 ab	11.8±1.	a	37.2±10.7 ab	50.0±1.2 a	130.6± 3.6 ab	15.7±3.4 abcd
					6					

^z Blank: No treatment and storage. CK1: No hot water treatment and stored at room temperature for 3 weeks. CK2:No hot water treatment, fruits were stored at 8°C for 2 weeks followed by at room temperature for 1 week. 36-45°C:After treated with hot water, no storage. 36-45°C+8°C: After treated with hot water, fruits were stored at 8°C for 2 weeks, followed by at room temperature for 1 week.

^y Mean± Standard error. Mean separation within columns by Least Significant Difference (LSD) test, P=0.05.

表 3. '台農 17 號'鳳梨果實經溫湯處理及冷藏後之有機酸相關代謝酵素比活性變化

Table 3. Changes in specific activities of organic acid metabolizing enzymes in 'TN17' pineapple fruit after hot water dipping treatment and cold storage.

Treatment ^z	Specific activity (mmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)		Specific activity(μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)						
	CS	MDH	mACO	cACO	mIDH	cIDH	mME	cME	PEPC
Blank	1.02±0.16 b ^y	1.42±0.12 d	27.9±12.5 abc	32.2±5.1 a	15.5±5.7 a	15.0± 2.7 g	89.1± 5.9 a	198.9±25.4 a	18.2±4.1 cd
CK1	2.18±0.92 ab	1.86±0.13 bc	21.9± 4.6 bc	14.0±1.0 d	12.5±4.4 a	62.7± 2.9 a	51.0± 8.5 d	136.9±15.2 d	28.7±2.5 a
CK2	1.47±0.98 ab	1.73±0.23 cd	26.1± 4.8 abc	15.4±0.3 cd	13.0±4.3 a	29.3± 6.6 ef	66.0± 8.4 bc	136.7±21.8 d	15.9±0.8 cd
36°C	2.63±1.25 a	2.49±0.37 a	23.6± 6.0 bc	18.3±4.2 bcd	12.6±2.1 a	34.4± 7.6 de	66.7± 6.3 bc	209.8± 9.3 a	14.8±3.0 cd
39°C	1.97±0.94 ab	1.85±0.19 bc	36.9± 5.3 a	22.8±2.7 b	12.3±2.9 a	20.8± 2.1 fg	70.9± 4.1 b	180.9± 7.3 ab	12.8±1.7 d
42°C	2.10±0.99 ab	2.01±0.10 bc	30.8±14.4 abc	15.6±1.8 cd	13.8±5.0 a	25.5± 7.9 efg	58.6± 5.7 cd	168.1± 9.8 bc	16.0±6.1 cd
45°C	1.68±1.03 ab	1.85±0.12 bc	32.4± 8.0 ab	15.2±2.3 cd	13.2±1.3 a	27.4± 3.3 ef	61.8±11.3 bcd	161.2±19.7 bcd	14.1±0.6 cd
36°C+8°C	1.58±0.38 ab	1.97±0.14 bc	19.2± 8.0 c	16.2±3.4 cd	12.9±2.9 a	56.3± 2.9 ab	68.1± 9.1 bc	157.6±17.1 bcd	20.3±7.0 bc
39°C+8°C	1.49±0.85 ab	1.94±0.18 bc	27.6± 5.1 abc	17.4±1.5 cd	11.7±2.1 a	49.2±10.5 bc	56.4± 4.2 cd	153.7±21.5 bcd	20.2±2.7 bc
42°C+8°C	2.26±0.72 ab	1.82±0.16 bc	26.0± 2.7 abc	15.7±3.7 cd	15.2±6.2 a	41.7± 6.0 cd	60.3± 5.0 bcd	148.1±21.9 cd	25.8±4.5 ab
45°C+8°C	2.48±0.31 a	2.07±0.20 b	30.2± 3.5 abc	19.9±3.4 bc	14.5±1.9 a	46.0±14.9 bcd	61.5± 2.2 bcd	160.7±12.8 bcd	19.1±3.4 cd

^z Blank: No treatment and storage. CK1: No hot water treatment and stored at room temperature for 3 weeks. CK2: No hot water treatment, fruits were stored at 8°C for 2 weeks followed by at room temperature for 1 week. 36-45°C: After treated with hot water, no storage. 36-45°C+8°C: After treated with hot water, fruits were stored at 8°C for 2 weeks, followed by at room temperature for 1 week.

^y Mean± Standard error. Mean separation within columns by Least Significant Difference (LSD) test, P=0.05.

表 4. '台農 17 號'鳳梨果實經溫湯處理及冷藏後之有機酸含量與其相關代謝酵素活性及比活性之相關性

Table 4. Correlations between organic acid contents and organic acid metabolizing enzyme activities and specific activities in 'TN17' pineapple fruit after hot water dipping treatment and cold storage.

	Acitivities			Specific activities		
	CA	MA	TA	CA	MA	TA
CA	—			—		
MA	-0.5525*	—		-0.5525*	—	
TA	0.4402	0.5052	—	0.4402	0.5052	—
CS	0.0004	0.1859	0.2006	0.0781	0.1315	0.2225
MDH	0.1208	0.0601	0.1898	0.2902	-0.0358	0.2619
mACO	0.2749	-0.5438*	-0.3012	0.3751	-0.5463*	-0.2002
cACO	0.4927	-0.4750	-0.0016	0.4503	-0.3174	0.1244
mIDH	0.0404	-0.3800	-0.3676	0.2059	-0.2977	-0.1075
cIDH	-0.4496	0.5029	0.0763	-0.4886	0.6081**	0.1492
mME	0.3504	-0.7104**	-0.4025	0.3758	-0.4121	-0.0548
cME	0.8585***	-0.5953*	0.2475	0.8153***	-0.4046	0.4083
PEPC	-0.5575*	0.5660*	0.0325	-0.5558*	0.6774**	0.1544

^z CA: Citric acid, MA: Malic acid, TA: Total acid, CS: Citrate synthase, MDH: Malate dehydrogenase, mACO: Mitochondria-aconitase, cACO: Soluble-aconitase, mIDH: Mitochondria-isocitrate dehydrogenase, cIDH: Soluble-isocitrate dehydrogenase, mME: Mitochondria-malic enzyme, cME: Soluble-malic enzyme, PEPC: Phosphoenolpyruvate carboxylase.

*, **, ***: Coefficient significant at $P \leq 0.1, 0.05, 0.01$, respectively.

討 論

鳳梨果實(Paull and Chen, 2000; 官, 2004)及蘋果果實(Klein and Lurie, 1992)經熱處理後均有酸度降低之情形。然本研究發現溫湯處理後(36-45°C)之'台農 17 號'鳳梨果實其檸檬酸及蘋果酸並沒有顯著之變化(表 1)。經溫湯處理後冷藏之檸檬酸含量有較未經處理者高之趨勢,可知溫湯處理後可減緩於貯藏期間對於檸檬酸的消耗,推測經溫湯處理後會產生熱休克蛋白以抵抗熱逆境,另本試驗中之溫湯處理有助於提升 CS 的活性(表 2 及表 3),而減緩了檸檬酸的消耗。蘋果酸含量經溫湯處理後顯著較未經處理且常溫貯藏之果實低,由

於植物組織若暴露於高於生長溫度約 10°C 時，會誘導生成熱休克蛋白以抗熱逆境(蘇，2008)，因此推測蘋果酸有可能被供作抗逆境蛋白生合成之用，而造成其含量之下降。

在酵素活性方面，經溫湯處理後之 CS、MDH、cIDH 及 cME 有上升之情形，cACO 及 mME 則有下降之現象，而 mACO 在溫度較高時有上升之情形(表 2 及表 3)。其中 CS 酵素活性的提高，可能增加檸檬酸之生合成，但此時有機酸含量下降，推測其活性之上升可減緩因呼吸作用速率提高所造成的有機酸含量下降；MDH、cIDH 及 cME 酵素活性的提高，可促使 OAA 為 MDH 催化形成蘋果酸後再為 cME 催化產生 pyruvate，而 pyruvate 可以作為檸檬酸循環之原料被利用，亦可被用作於其他物質的合成；如蛋白質的生合成(Borsani *et al.*, 2009)。cIDH 活性提高亦可將檸檬酸用作胺基酸生合成原料，增加胺基酸的生合成(Sadka *et al.*, 2000; Katz *et al.*, 2007)，推測可能與高溫逆境相關蛋白之生合成有關。mME 酵素活性的下降減少了蘋果酸於粒線體中被催化成 pyruvate 供作呼吸作用基質的機會，而增加蘋果酸被運送至細胞質內供 cME 作用催化成 pyruvate 用以其他生化合成的可能性，另外 mACO 酵素活性在溫度較高時的上升，可增加蘋果酸之生合成。因此有機酸在溫湯處理時可能被用作呼吸基質而消耗掉，亦有可能被作用其他生化合成之基質；如蛋白質及胺基酸之生合成。

溫湯處理後經冷藏之果實，其 CS、MDH、mACO 及 cIDH 酵素活性均呈現上升之趨勢，但與常溫貯藏者(CK1)較為接近，cME 及 PEPC 酵素活性亦呈現上升之趨勢(表 2 及表 3)。其中 CS 酵素活性提高，且溫湯溫度越高者活性越高，其可增加檸檬酸之生合成，且其有機酸含量較 CK2 為高，推測此時其較高之活性可減少檸檬酸於貯藏期間之消耗；MDH、cME 及 PEPC 酵素活性之提高有助於將糖酵解作用所得之 PEP 轉換成 OAA，並由 MDH 將其催化成蘋果酸，再經 cME 催化形成 pyruvate，其亦可催化貯藏於液胞之蘋果酸成為 pyruvate，而 pyruvate 可以作為檸檬酸循環之原料被利用，亦可被用作於其他的生化合成；如蛋白質的生合成(Borsani *et al.*, 2009)。溫湯處理後冷藏之果實，其蛋白質含量亦較 CK2 為高(data not showed)。另外 mACO 酵素活性的上升，亦可增加蘋果酸之生合成。cIDH 活性的提高則有助於代謝檸檬酸，並可促進胺基酸之生合成。另外可觀察到 mME 酵素活性之下降及 cME 酵素活性上升時，有機酸含量有下降之趨勢，此所產生之相關性與前述相同。

在本試驗中可發現檸檬酸含量與 cME 活性呈顯著正相關，與 PEPC 活性呈顯著負相關(表 4)，PEPC 活性提高可能導致 PEP 往生合成蘋果酸之方向移動，減少 PEP 往生合成檸檬酸之路徑的機會，因此呈現負相關。而 cME 可催化蘋果酸形成 pyruvate，用以進行 TCA cycle 或其他生化合成，因此可能有利檸檬酸之生合成，而呈現正相關。蘋果酸含量與 cME 及 mACO 活性呈顯著之負相關，而與 PEPC 活性呈顯著正相關(表 4)，PEPC 可將糖酵解得之 PEP 催化生成 OAA，並可進一步由 MDH 催化生成蘋果酸，而 cME 可直接利用蘋果酸(Borsani *et al.*, 2009)，將蘋果酸催化成 pyruvate 供利用，而 mACO 活性上升可促使檸檬酸代謝，往蘋果酸生合成路徑前進，雖其有利蘋果酸生合成，但 cME 對蘋果酸的

直接消耗較 mACO 的影響大，因此促使蘋果酸含量的下降，因此使 cME 及 mACO 均呈現負相關，在枇杷(Chen *et al.*, 2009)的研究中 cME 及 PEPC 也有同樣之相關性。

由酸含量與有機酸相關代謝酵素活性變化可知，經溫湯處理之鳳梨果實，其有機酸可能有機被供作呼吸作用基質或是其他生化合成所利用而消耗。有機酸之消耗，可能為鳳梨果實提供所需之能量或胺基酸(Sadka *et al.*, 2000; Katz *et al.*, 2007)及蛋白質之生合成(Borsani *et al.*, 2009)，於蛋白質含量方面，經溫湯處理者確有提升(data not showed)，其是否作為生合成抗逆境蛋白之用則有待進一步之研究。

誌 謝

本研究承蒙行政院農業委員會 95 農科-1,3,2-糧-Z1(10)計劃補助經費，謹致謝忱。

參 考 文 獻

- 官青杉。2004。降低冬果鳳梨酸度之研究。國立嘉義大學農學研究所碩士論文。p. 1-77。
- 蘇俊麟。2008。植物生長調節劑與溫湯處理對鳳梨黑心劣變發生之影響。國立中興大學園藝學研究所碩士論文。p. 1-91。
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Beruter, J. 2004. Carbohydrate metabolism in two apple genotypes that differ in malate accumulation. *J. Plant Physiol.* 161: 1011-1029.
- Borsani, J., C. O. Buddle, L. Porrini, M. A. Lauxmann, V. A. Lombardo, R. Murray, C. S. Andreo, M. F. Drincovich and M. V. Lara. 2009. Carbon metabolism of peach fruit after harvest: changes in enzymes involved in organic acid and sugar level modifications. *J. Exp. Bot.* 60: 1823-1837.
- Chen, C.-C. and R. E. Paull. 2000. Sugar metabolism and pineapple flesh translucency. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125: 558-562.
- Chen, F.-X., X.-H. Liu, and L.-S. Chen. 2009. Developmental changes in pulp organic acid concentration and activities of acid-metabolising enzymes during the fruit development of two loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars differing in fruit acidity. *Food Chem.* 114: 657-664.
- Gallardo, F., S. Gálvez, P. Gadál, and F. M. Cánovas. 1995. Changes in NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase during tomato fruit ripening. *Planta* 196: 148-154.

- Jenner, H. L., B. M. Winning, A. H. Millar, K. L. Tomlinson, C. J. Leaver, and S. A. Hill. 2001. NAD⁺ malic enzyme and the control of carbohydrate metabolism in potato tubers. *Plant Physiol.* 126: 1139-1149.
- Katz, E., M. Fon, Y. J. Lee, B. S. Phinney, A. Sadka and E. Blumwald. 2007. The citrus fruit proteome: insights into citrus fruit metabolism. *Planta* 226: 989-1005.
- Klein, J. D. and S. Lurie. 1992. Prestorage heating of apple fruit for enhanced postharvest quality: interaction of time and temperature. *Hort Sci.* 27: 326-328.
- Knee, M. and F. L. Finger. 1992. NADP⁺-malic enzyme and organic acid levels in developing tomato fruits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117: 799-801.
- Lurie, S. 1998. Postharvest heat treatments. *Postharvest Biol. Technol.* 14:257-269.
- Merlo, L., P. Geigenberger, M. Hajirezaei, and M. Stitt. 1993. Changes of carbohydrates, metabolites and enzyme activities in potato tubers during development, and within a single tuber along a Stolon-Apex gradient. *J. Plant Physiol.* 142: 392-402.
- Morgunov, I. and P. A. Srere. 1998. Interaction between citrate synthase and malate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 273: 29540-29544.
- Paull, R. E. and N. J. Chen. 2000. Heat treatment and fruit ripening. *Postharv. Biol. Technol.* 14: 257-269.
- Sadka, A., E. Dahan, E. Or., and L. Cohen. 2000. NADP⁺-isocitrate dehydrogenase gene expression and isozyme activity during citrus fruit development. *Plant Sci.* 158: 173-181.
- Weerahewa, D. and N. K. B. Adikaram. 2005. Heat-induced tolerance to internal browning of pineapple (*Ananas comosus* cv. Mauritius) under cold storage. *J. Hort. Sci. Biotech.* 80: 503-509.

Effect of Hot Water Dipping Treatment and Cold Storage on Organic Acid Metabolism in 'Tainung-17' Pineapple Fruit

Ming-Chi Liu¹⁾ Ching-Cheng Chen²⁾

Key words: pineapple; hot water dipping treatment; cold storage; organic acid metabolism

Summary

Citric acid contents in 'Tainung-17' pineapple fruit decreased after room temperature storage or cold storage. After hot water dipping treatment and cold storage (36-45°C+8°C), citric acid contents increased. Malic acid contents increased after room temperature storage, but there were no significant changes after hot water dipping treatments. After hot water dipping treatment, citric acid contents was not significantly different from the blank, but was higher than non-treated fruits after cold storage. After hot water dipping treatments, CS, MDH, cIDH and cME activities increased, but cACO and mME decreased. After cold storage, CS, MDH, mACO, cME, cIDH and PEPC activities in heat treated fruits increased. Higher CS activity favored citric acid synthesis and higher activities of MDH, mACO, cIDH, cME and PEPC favored malic acid synthesis, which could be used in the TCA cycle or other biosynthesis pathways. An increase in cIDH activity might increase amino acid biosynthesis. Citric acid contents was positively correlated with cME activity and negatively correlated with PEPC activity. Malic acid contents was negatively correlated with mACO and cME activities and positively correlated with PEPC activity. The results suggested that organic acid contents in pineapple fruit decreased after hot water dipping treatment maybe due to an increase in respiration rate or be used for stress responsive protein biosynthesis.

1) Graduate student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Assistant Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

Corresponding author.