

采后两种不同果肉类型油桃软化相关酶活性的变化

彭丽桃^{1,2} 杨书珍² 任小林² 饶景萍^{2*} 王俊宁²

(1.中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650; 2. 西北农林科技大学园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 以软质油桃“秦光”和非软质油桃“阿姆肯”为材料, 研究了果实软化过程中果实硬度和果实软化相关酶活性变化。在果实硬度迅速下降期淀粉酶和蔗糖酶活性较高, 以后酶活性下降。纤维素酶和多聚半乳糖醛酸酶在果实软化前期活性很低, 只有在果实呼吸跃变期这两种酶活性才明显升高。果胶甲酯酶活性极低而且变化不大。“秦光”油桃的这几种酶活性比“阿姆肯”高, 因而果实软化较快。

关键词: 油桃; 果肉软化; 蔗糖酶; 淀粉酶; 多聚半乳糖醛酸酶; 纤维素酶

中图分类号: Q946.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-3395(2002)02-0171-06

Changes in Softening-related Enzymes in Melting- and Nonmelting-flesh Nectarines after Harvest

PENG Li-tao¹ YANG Shu-zhen² REN Xiao-lin² RAO Jing-ping^{2*} Wang Jun-ling²

(1. *South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China*; 2. *College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China*)

Abstract: Two cultivars of nectarine, nonmelting-flesh 'Arm King' and melting-flesh 'Qinguang', were used to investigate the enzyme activities in relation to fruit softening after harvest. Invertase and amylase activities were high during the rapid loss stage of fruit firmness, then decreased gradually during further softening. However, cellulase and polygalacturonase showed low activities, but increased significantly at climacteric stage. The activity of pectin methylesterase was low and showed little change. Activities of all these enzymes were higher in 'Qinguang' than in 'Arm King'.

Key words: Nectarine; Fruit flesh softening; Invertase; Amylase; Cellulase; Polygalacturonase

油桃色鲜味美, 光洁无毛, 深受消费者青睐, 市场前景广阔。但油桃采后易软化腐烂, 不利贮运和销售, 限制了油桃生产和发展。而我国在油桃的贮运保鲜方面研究较少, 有进行研究的必要。

桃及油桃的软化机理, 目前仍不很清楚。Bonghi^[1]、Tanati 等^[2]证实纤维素酶和多聚半乳糖醛酸酶(PG)共同作用导致了果肉软化。周培根等认为 PG 在桃的软化中起主导作

收稿日期: 2001-04-25 接受日期: 2001-09-11

基金项目: 陕西省自然科学基金项目(98SM10)资助

* 通讯联系人 Corresponding author

用^[3]。Dawson 等^[4]发现在油桃果实软化过程中有果胶多聚物增溶、解聚,并有半乳糖基多糖的损失,间接证实 PG 对果实软化的作用。Artes 等^[5]认为油桃早熟品种果胶甲酯酶主导果肉软化,中熟品种则是 PG 的作用更显著。近年来,果肉细胞内含物的变化及相应水解酶如蔗糖酶、淀粉酶等酶的变化,引起了人们的重视^[6-10],但这些酶在油桃软化中的作用,报道尚少。本实验以软质油桃“秦光”和非软质油桃“阿姆肯”为试验材料,研究细胞壁降解酶 PG、果胶甲酯酶、纤维素酶以及细胞内部的水解酶类如淀粉酶、蔗糖酶变化的特点及其与果肉软化的关系,旨在探讨油桃软化的机理,为油桃的保鲜提供理论依据。

1 材料和方法

材料 本试验于 1998-1999 年在西北农林科技大学园艺学院综合实验室进行,实验油桃(*Prunus persica* var. *nucipersica*)品种为“秦光”(软质)和“阿姆肯”(非软质),采自杨凌—5-6 年生油桃园。果实八成熟时采收(“秦光”底色由绿转白,“阿姆肯”底色变黄),采收后立即运回实验室,选择色泽均匀、大小一致的正常果实。每品种设三次重复,每重复 15 kg 果实,用塑料袋包装(敞口),每一袋为一重复,于常温下贮藏。每两天取样一次,测定理化指标。

果实硬度 随机从两品种中选取 5 个果实,于果胴部取 6 点,GY-1 型硬度计测定,取均值。

酶液的提取 随机从两品种中各选取 5 个果实,每品种取 10 g 果肉,在 4℃ 下解冻后,冰浴条件下研磨,加入预冷的 20 ml 提取液(0.2 mol/L 的磷酸二钠-柠檬酸缓冲液, pH 5.5, 含 6% NaCl (w/v)), 4℃ 下放置 30 min, 不断搅动,促进酶蛋白的提取, 10 000 × g 下离心 15 min, 收集上清液, 备用。

淀粉酶活性测定参考王贵禧^[9]的方法,以热杀死酶液为对照,反应时间 30 min。

蔗糖酶测定参考张利平等^[11]的方法。

纤维素酶活性测定参考徐昌杰等^[6]的方法: 1 ml 0.1% 的羧甲基纤维素溶液(Sigma 产品)中加入粗酶液 1 ml, 37℃ 恒温水浴中反应 3 h。用 3,5-二硝基水杨酸测定反应产生的还原糖量。

PG 酶活性测定参考梁小娥的方法^[8], 反应体系为: 1 ml 0.1% 的果胶溶液(Sigma 产品)中加入粗酶液 1 ml, 37℃ 恒温水浴中反应 2 h。用 3,5-二硝基水杨酸测定反应产生的还原糖量。以上四种酶活性以每小时产生 1 mg 葡萄糖为 1 个活性单位。

果胶甲酯酶 取 2 ml 粗酶液, 加入 10 ml 0.1% 的果胶溶液中, 反应 2 h, 采用 0.05 mol/L 的 NaOH 滴定反应释放的游离羧基, 以 1 μmol 羧基 g⁻¹FW h⁻¹ 为一活性单位。

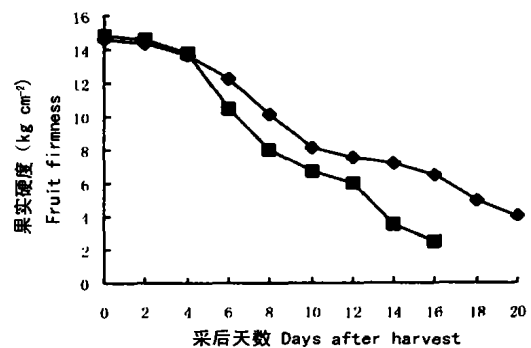


图 1 “秦光”(■)和“阿姆肯”(◆)油桃采后果实硬度的变化
Fig. 1 Changes in fruits firmness in "Qinguang" (■) and "Arm King" (◆) after harvest

以上测定重复三次,取均值。

2 结果和分析

2.1 果肉软化的特点

果实硬度的大小是反应果实耐贮性、判断果肉质地变化的重要指标。如图1所示,软质油桃“秦光”与非软质品种“阿姆肯”在耐贮性上有较大差别:“秦光”贮藏16 d果肉已经完全软化(检测极限为 2 kg cm^{-2}),“阿姆肯”贮藏20 d仍有一定的硬度(约为 4.0 kg cm^{-2})。但两类型果实硬度下降趋势较为相似,贮藏初期(0-4 d)硬度下降缓慢,4-10 d果肉硬度损失幅度显著增加,称为跃变期前软化,以后变慢。果实跃变期再度出现一个稍小的硬度损失峰(“秦光”12-16 d,“阿姆肯”14-20 d,称为跃变期软化)。“秦光”油桃果肉在两个迅速下降期间硬度损失快,“阿姆肯”的下降幅度比“秦光”低。

2.2 细胞内降解酶与果实软化的关系

2.2.1 淀粉酶活性

油桃采后淀粉酶活性变化大致呈下降趋势(图2A)。“阿姆肯”和“秦光”的变化略有不同,在8 d之前“秦光”油桃淀粉酶活性下降较“阿姆肯”油桃缓慢,能维持较高的酶活性。而“阿姆肯”在整个贮藏过程中一直呈下降趋势,至贮藏末期酶活性只有0.21-0.23个活性单位。淀粉酶活性较高时期与果实跃变期前软化时间一致,表明淀粉酶与该阶段果肉软化相关。

2.2.2 蔗糖酶活性

如图2B所示,两品种采后蔗糖酶活性大致相同,呈下降趋势,至后期有小的回升。“阿姆肯”油桃采收时蔗糖酶活性最高,以后酶活性逐渐降低,至采后14 d达到活性最低点(0.059单位),跃变时蔗糖酶活性有所上升。“秦光”油桃采收时蔗糖酶活性较低,但2 d后酶活性上升到最高点,以后回落,8-16 d酶活性基本稳定在0.2单位水平。从两者变化趋势可看出在两品种蔗糖酶较高活性期与果肉硬度迅速下降期吻合,说明蔗糖酶对果实跃变期前的软化(硬度迅速下降阶段)有重要作用。

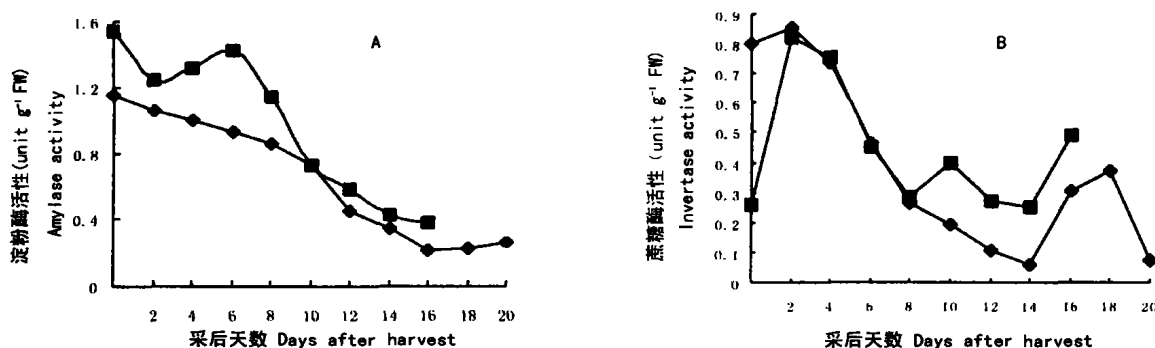


图2 “秦光”(■)和“阿姆肯”(◆)采后淀粉酶(A)和蔗糖酶(B)活性变化

Fig. 2 Changes in amylase (A) and invertase (B) activities in "Qinguang" (■) and "Arm King" (◆) after harvest

2.3 胞壁物质降解酶活性变化与果实软化的关系

2.3.1 纤维素酶活性

纤维素酶是降解纤维素的主要酶，在油桃贮藏过程中的变化如图 3A 所示：“阿姆肯”果实采收时纤维素酶活性极低，贮藏 10 d 酶活性仍维持较低水平，直至呼吸跃变的到来，才有显著上升。贮藏结束时酶活性达最高点（0.814 单位）。“秦光”的纤维素酶活性高于同期的“阿姆肯”，酶活性在迅速上升前也有一平稳期，8 d 后酶活性大幅度上升，16 d 达 1.13 单位。

2.3.2 多聚半乳糖醛酸酶活性

果实软化中另一重要酶，PG 活性随贮藏时间的变化见图 3B。“阿姆肯”果实中 PG 活性变化与纤维素酶活性变化类似，采后 8 d 酶活性只有 0.195 单位，以后上升幅度增大，跃变时上升更显著，贮藏结束时酶活性达到 0.657 单位。“秦光”果实采收时酶活性比“阿姆肯”高，随贮藏时间的增加，酶活性逐渐上升，16 d 后达到最高点（0.745 单位）。结合果实呼吸和乙烯释放的变化特点^[12]，不难发现纤维素酶和 PG 都是在果实呼

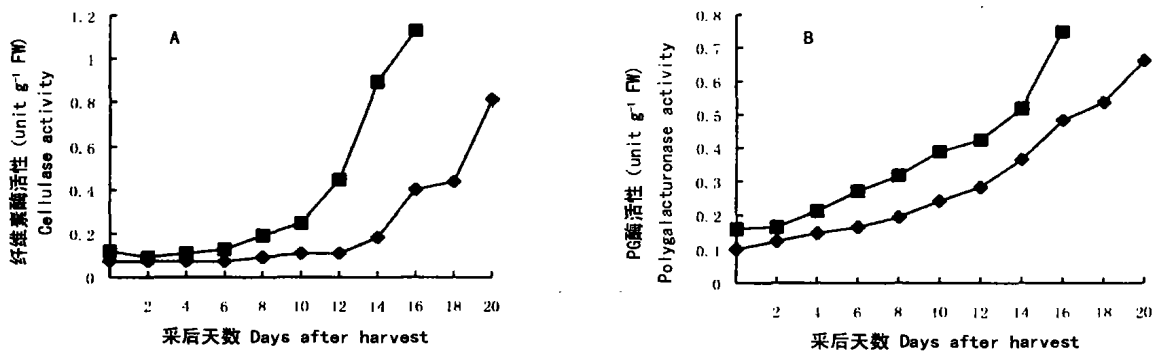


图 3 “秦光”(■)和“阿姆肯”(◆)采后纤维素酶(A)和多聚半乳糖醛酸酶(B)活性变化

Fig. 3 Changes in cellulase (A) and polygalacturonase (B) activities in "Qinguang" (■) and "Arm King" (◆) after harvest

吸高峰后大幅度增加，表明它们受乙烯调控。而果实硬度在贮藏初期即有大幅度的下降，很显然，PG 和纤维素酶对果实软化的作用在贮藏后期。

我们测定的果胶甲酯酶 (pectin methylesterase, PME)活性极低(数据未列出)，而且在贮藏期间变化幅度小，不同软质类型品种之间差异不明显，推测果胶甲酯酶对果实软化的作用不大。

3 讨论

多数研究者认为果实的软化是由于胞壁水解酶降解细胞壁，造成细胞之间连接减少、细胞离散所致^[4,5,13]。引起胞壁变化的水解酶有多种，其中 PME、PG 和纤维素酶较为重要。许多研究均表明 PG 是果实软化的关键酶。周培根等根据“海复早桃”和“白云桃”成熟衰老中 PG 的迅速上升认为桃果肉软化的关键是 PG 作用的结果^[3]，但从其提供的图表显示，果肉硬度由不足 3.0 kg cm⁻² 下降到 0 时，PG 活性才有大幅度上升。我们的

研究曾表明:PG 活性的迅速上升是在果实成熟衰老后期,与呼吸强度和乙烯释放迅速增加在时间上有很强的一致性^[12],而果实硬度在酶活性迅速增加前已经有了大幅度下降;纤维素酶活性特点与 PG 表现相似,其活性的迅速上升也在果实跃变期软化阶段,PME 活性在贮藏期间变化不明显。这说明 PG、纤维素酶对果实迅速软化(第一阶段软化)作用不大,只是在跃变期导致果实硬度的进一步下降。这与分子研究结果相似:转 PG 反义基因的番茄果实中 PG 活性被抑制了 99%,果实成熟初期果肉硬度的下降与对照果一致,只是后期较对照果稍硬;纤维素酶活性被抑制 95%的番茄果实软化与对照无显著区别;PME 酶被抑制的结果只是果胶的分子量、分子中醛酸含量、果胶的甲酯化程度增加,但果实能正常软化^[14-16]。

那么,引起果实呼吸跃变前硬度迅速下降的因子是什么?超微结构研究发现果实软化期间细胞内的淀粉粒迅速降解^[13],表明淀粉酶降解淀粉是果实软化期间细胞内发生的重大变化,在猕猴桃、枣、香蕉果实的软化中淀粉酶有很重要的作用^[8-10];蔗糖酶对柑橘外切纤维素酶和 PG 活性的分析造成很大的干扰^[6],暗示其可能与果实软化相关,而且蔗糖酶在果实成熟期间有较高的表达^[17],Sanchez 等认为蔗糖酶、纤维素酶、半乳糖醛酸酶三者共同作用导致番茄软化^[7]。我们分析果实软化期间淀粉酶和蔗糖酶的活性变化表明,这两种酶在果实贮藏前期果肉硬度迅速下降期间保持较高的活性,而在果实呼吸跃变时,酶活性较低,说明果实前期软化与这两种酶的作用相关。但这两种酶怎样作用导致果肉硬度的下降还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Bonghi C. Peach ripening: the involvement of cellulase and polygalacturonase [A]. In: Hribar J, Johnson D S, Bohling H. The post-harvest treatment of fruit and vegetables: quality criteria [C]. Italy: Bled, Slovenia, 1994, 580-581.
- [2] Tonutti P, Bonghi C, Vidrih R, et al. Biochemical and molecular aspects of peach fruit ripening [A]. In: Hribar J, Johnson D S, Bohling H. The post-harvest treatment of fruit and vegetables: quality criteria [C]. Italy: Bled, Slovenia, 1994, 101-104.
- [3] 周培根, 罗祖友, 吴邦良. 桃成熟期间果实软化与果胶及有关酶的关系[J]. 南京农业大学学报, 1991, 14(2): 33-37.
- [4] Dawson D M, Walkins C B, Melton L D. Intermittent harming affects cell wall composition of 'Frantasia' nectarine during ripening and storage[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1995, 120 (6): 1057-1062.
- [5] Artes F, Salmeron M C. Quality attributes, pectolytic enzyme activities and physiological changes during postharvest ripening of nectarine[J]. J Food Quality, 1996, 19(6): 491-503.
- [6] 徐昌杰, 陈昆松, 张上隆. 蔗糖酶对外切纤维素酶和外切多聚半乳糖醛酸酶活性测定的干扰及排除[J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(1): 43-46.
- [7] Sanchez J A, Zamorano J P, Alique R. Polygalacturonase, cellulase and invertase activities during cherimoya fruit ripening [J]. J Hort Biotech, 1998, 73 (1): 87-92.
- [8] 梁小娥, 王三宝, 赵迎丽, 等. 枣采后果肉软化的生化和细胞超微结构变化 [J]. 园艺学报, 1998, 25(4): 333-337.
- [9] 王贵禧, 韩雅珊, 于梁. 猕猴桃软化过程中阶段性专一酶活性变化的研究[J]. 植物学报, 1995, 7(3): 198-203.
- [10] Kujima K, Sakurai N, Kuraishi S. Fruit softening in banana: correlation among stress-relaxing parameters, cell wall components and starch during ripening[J]. Physiol Plant, 1994, 90(4): 772-778.

- [11] 张利平, 文江祁, 杨成德, 等. 白兰瓜子叶衰老过程中蔗糖同工酶的分离及其活性变化[J]. 植物生理学报, 1993, 19(1): 17-20.
- [12] 彭丽桃, 饶景萍, 杨书珍, 任小林. 油桃后熟衰老期间几个生理指标的变化[J]. 西北农业学报, 2001, 10(4): 37-40.
- [13] 饶景萍, 任小林. 果实成熟过程中组织超微结构变化[J]. 西北植物学报, 1997, 17(1): 128-134.
- [14] Giovannonni J J, Dellapenna D, Benett A B, et al. Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic *rin* tomato fruit: Results in polyuronide degradation but not fruit softening [J]. *Plant Cell*, 1989, 1-53.
- [15] Brummell D A, Hall B D, Bennett A B. Antisense suppression of tomato endo-1,4-beta-glucanase Cel2 mRNA accumulation increases the force required to break fruit abscission zones but does not affect fruit softening[J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 40: 4, 615-622.
- [16] Graff J, Tiznadi M E, Handa A K. Characterization and functional expression of a ubiquitously expressed tomato pectin methylesterase[J]. *Plant Physiol*, 1997, 114(4): 1547-1556.
- [17] Wang F, Smith A G, Brenner M L. Isolation and sequencing of tomato fruit sucrose synthase cDNA [J]. *Plant Physiol*, 1993, 103(4): 1463-1464.