

梨果实在贮藏过程中果胶分解酶活性的变化

朴 一龙, 赵 兰 花, 吴 荣 哲

(延边大学 农学院 吉林 龙井 133400)

摘 要:以苹果梨和新高梨为试材, 测定了梨贮藏过程中果胶分解酶的活性变化。结果表明: 2 品种果实在软化过程中多聚半乳糖醛酸酶(PG)活性均增加且在贮藏后期新高梨的 PG 活性极显著($p < 0.01$)高于苹果梨; 贮藏性强的苹果梨的 β -半乳糖苷酶(β -Gal)活性很低且在贮藏中减少, 但贮藏性相对较弱的新高梨的 β -Gal 活性极显著($p < 0.01$)高于苹果梨且在可溶性果胶增加的时期达活性高峰; 苹果梨的果胶甲基酯酶(PME)活性在贮藏后期有所增加, 但新高梨减少。可见, 在贮藏过程中 PG 和 β -Gal 酶均是梨果实软化的重要酶, 但 β -Gal 的作用比 PG 酶更重要; PME 的活性变化因品种而异, 与耐贮性关系不大。

关键词: 梨果实; 采后; 果胶分解酶

中图分类号: S 661.209⁺.3 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2009)04-0050-04

苹果梨是吉林省的梨主栽品种, 果实酸甜可口, 品质优良, 耐贮性很强(8~9 个月)^[1]; 新高梨是韩国的主栽梨品种, 果实多汁, 品质优良, 但耐贮性相对较弱(3~5 个月)^[2]。在果实成熟和贮藏过程中发生的软化现象是细胞壁组成成分在各种酶的作用下分解或水溶性成分增加的结果。果实的软化与细胞壁结构的变化密切相关, 这些变化由酶或非酶作用引起。Huber^[3]认为影响植物组织软化的较重要的酶有 PG、 β -Gal 等, 特别是为了使 PG 的水解作用顺利进行, 需要 PME 的作用。

国内外研究结果表明, 苹果果实在成熟和软化过程中 β -Gal 持续增加且一致认为在苹果果实软化中起重要作用, 但对 PG 存在与否及活性强弱有不同的解释^[4-6]; 桃和油桃果实中的 PG 和 β -Gal 的活性在成熟后期和贮藏过程中显著增加, 但 PME 活性变化不明显^[7-9]; β -Gal 是柿果实细胞壁成分可溶化和果胶分解的重要酶, 但未检测出 PG 酶的活性^[10]。在西洋梨‘Bartlett’等果实在成熟和软化过程中 PG 活性增加^[11-12]; ‘长把梨’在贮藏过程中 PG 活性急速增加, 而 PME 活性在整个贮藏过程中变化较为平缓^[13]。对东洋梨成熟和软化过程中 β -Gal 酶活性的研究较少^[14], 且对 PG 和 PME 的活性变化上有不同的解释^[15-17]。但对苹果梨果胶分解酶活性方面的研究尚未见文字报道。

研究以耐贮性和生理生化特性不同的苹果梨和新高梨为试材, 比较 2 品种在贮藏过程中果胶分解酶活性

的变化, 为梨果实的贮藏、加工和运输提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

试验于 2001~2002 年在韩国忠南大学进行。以苹果梨和新高梨为试材, 选择树冠大小和树势相对一致的 19 a 生新高梨和苹果梨高接树各 10 株进行采样。2 品种的土壤条件和管理情况完全相同。试验用果实于 2001 年 10 月 19 日(常规采收期)采自韩国农村振兴厅罗洲梨研究所的梨试验圃, 采后立即运回实验室, 挑选大小均匀、成熟度一致、无机械损伤和无病虫害的果实装入硬质塑料带孔箱, 经 1 周的预冷处理后在(1 ± 0.5)℃、相对湿度(99 ± 0.5)%条件下贮藏, 每隔 30 d 进行取样, 每次重复随机取果实 10 个, 重复 3 次。取得的鲜果洗净、切分、液氮处理后, 置-80℃超低温冰箱中保存待用。

1.2 方法

1.2.1 PG 酶的提取与活性测定 在 5 g 冷冻果实组织中加入 20 mL 50 mmol/L 的 Na-醋酸缓冲液(pH 6.0, 含 2.4 mol/L NaCl)和少量石英砂及 0.5 g PVP 进行研磨, 搅拌 4 h 后在 4℃条件下以 15 000 r/min 离心 30 min, 上清液利用透析膜(MW cut-off 12800 纤维素膜, Sigma)在 50 mmol/L Na-醋酸缓冲液(pH 4.5, 含 150 mmol/L NaCl)里透析 24 h(透析液更换一次), 透析后的上清液即为粗酶液。经酒精精制过的多聚半乳糖醛酸溶解在分析用缓冲液里制作 0.2%的溶液作为基质。在 0.2 mL 基质里加入 0.3 mL 粗酶液在 30℃条件下反应 2 h, 然后根据还原糖测定方法^[18]利用 2-萘基乙酰胺在 276 nm 波长中测定 OD 值。把 30℃条件下 1 h 生成 1 μ mol 还原糖的酶活性定为 1 个酶单位, 结果以

第一作者简介: 朴一龙(1962-), 男, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事果树栽培生理和果实老化生理方面的研究工作。E-mail: piaoly@ybu.edu.cn.

收稿日期: 2008-11-10

units/g FW 表示。对照在终止反应后加入酶液进行测定。酶提取的所有过程在低于 4℃的条件下进行。

1.2.2 β-Gal 酶的提取与活性测定 在 5 g 冷冻果实组织中加入 20 mL 1.4 mol/L NaCl(pH 6.0)和少量石英砂及 0.5 g PVP 进行研磨,在冰池中搅拌 1 h 后在 4℃条件下以 12 000 r/min 离心 20 min,上清液用上述的透析膜在 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 4.0)中透析 24 h(透析液更换 1 次),透析后的上清液即为粗酶液。0.1 mL 酶液+0.5 mL 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 4.0)+0.4 mL BSA(0.1% 清蛋白)+0.4 mL ρ-硝基酚 galactopyranoside(13 mmol/L 柠檬酸缓冲液中溶解)混合液作为反应液。反应液在 37℃条件下反应 5 min,之后加入 2 mL 0.2 mol/L 的 Na₂CO₃ 终止反应。在 400 nm 波长中测定游离的 ρ-硝基酚浓度。把 37℃条件下 1 min 生成 1 mmol 的 ρ-硝基酚的酶活性定为 1 个酶单位,结果以 units/g FW 表示。对照用 ρ-硝基酚。酶提取的所有过程是在低于 4℃的条件下进行。

1.2.3 PME 酶提取与活性测定 在 10 g 冷冻果实组织中加入 20 mL 冷凉的 2 mol/L 的 NaCl 溶液和少量石英砂及 0.5 g PVP 进行研磨,然后在 4℃条件下以 12 000 r/min 离心 20 min。取上清液用上述透析膜在 100 mmol/L Na-磷酸缓冲液(pH 7.5)中透析 24 h(透析液更换 1 次),透析后的上清液即为粗酶液。以 0.1 mol/L 醋酸缓冲液(pH 5.5)溶解的果胶(甲基化程度 80%)为基质。25 mL 基质里加 0.25 mL 粗酶液在 30℃条件下反应 1 h 后在冰池中加 1 mol/L 的硫酸 0.5 mL 以终止反应。为了着色加入 2%的高锰酸钾 0.2 mL,15 min 后加溶解在 0.06 mol/L H₂SO₄ 中的 0.5 mol/L 亚砷酸钠 0.2 mL,再加入 0.6 mL 蒸馏水后在 60℃水浴锅中加热 5 min。反应产物冷却至室温后在 420 nm 波长中测定 OD 值。加入煮熟的粗酶液作对照。标准曲线利用无水甲醇。把 30℃条件下 1 h 生成 1 μg 甲醇定为 1 个酶单位,结果以 units/g FW 表示。酶提取的所有过程是在低于 4℃的条件下进行。

2 结果与分析

2.1 PG 活性变化

PG 是果胶的主要水解酶之一,在多种果实组织软化中起重要的作用。试验结果表明,在整个贮藏过程中新高梨的 PG 活性高于苹果梨。在贮藏初期 2 品种的 PG 活性差异不大,活性也较低,活性随贮藏天数的增加而增加。在贮藏过程中苹果梨的 PG 活性增加幅度不大;但是新高梨在贮藏 60 d 以后 PG 活性急剧增加,在贮藏 90 d 达到活性高峰且一直维持到贮藏 150 d。贮藏 60 d 以后新高梨的 PG 活性是苹果梨的 2 倍以上(图 1)。经显著性测验,新高梨与苹果梨 PG 酶活性在贮藏 60 d 达差异显著水平($p<0.05$),而贮藏 90 d 以后达差异极

显著水平($p<0.01$)。

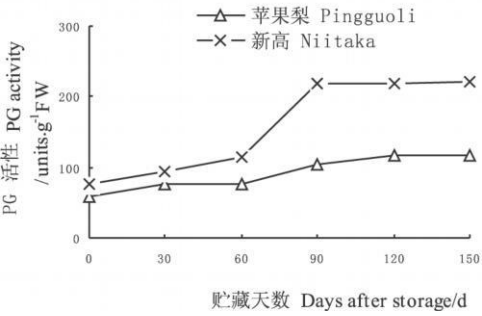


图 1 梨果实贮藏过程中 PG 活性的变化
Fig. 1 Change in PG activities during storage of pear fruits.

2.2 β-Gal 酶的活性变化

β-Gal 酶是起水解果胶支链分子半乳糖的作用,所以预测在一部分作物组织软化中的作用比 PG 重要^[6,19]。试验结果表明,在贮藏中耐贮性强的苹果梨的 β-Gal 酶活性很低而且随着贮藏天数的增加逐渐减少,但变幅很小。而耐贮性相对较弱的新高梨的 β-Gal 酶活性在贮藏初期急剧增加,贮藏 60 d 达高峰,然后急剧减少,贮藏 90~120 d 保持基本稳定,然后又急剧减少,但始终保持较高的水平,最高高出苹果梨 7 倍以上(图 2),极显著高于苹果梨($p<0.01$)。从时期上看,β-Gal 酶活性高峰与果胶溶解性增加的时期相一致^[20]。

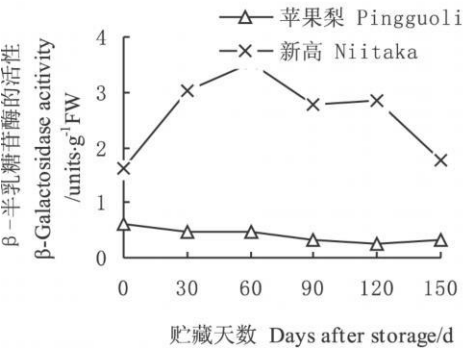


图 2 梨果实贮藏过程中β-半乳糖苷酶活性变化
Fig. 2 Change inβ-Galactosidase activity during storage of pear fruits.

2.3 PME 酶的活性变化

为了使 PG 水解作用顺利进行需要 PME 的作用,但该研究观察到的 PME 活性与 PG 活性变化不一致。苹果梨的 PME 酶的活性在贮藏 30 d 小幅的减少后一直增加且在贮藏 120 d 达高峰,然后再下降。而新高梨的 PME 活性在 PG 活性增加的始点反而减少(图 3)。

3 讨论

Ahmed 等^[11] 和 Ben-Arie 等^[12] 一致认为梨成熟过

程中果胶水解的同时 PG 活性增加,对组织的软化起重要作用;而 YOO 等^[16] 研究认为黄金梨果实在贮藏中 PG 活性低且变化较小。该研究中耐贮性强的苹果梨 PG 活性比起耐贮性相对较弱的新高梨低,PG 活性在水溶性果胶增加的始点^[20] 均增加,说明 PG 活性与水溶性果胶的含量变化密切相关。但由于低水平(20%)的 PG 也能强烈催化果胶降解^[21],由此可以推断 PG 并不是梨果实软化中最重要的酶。

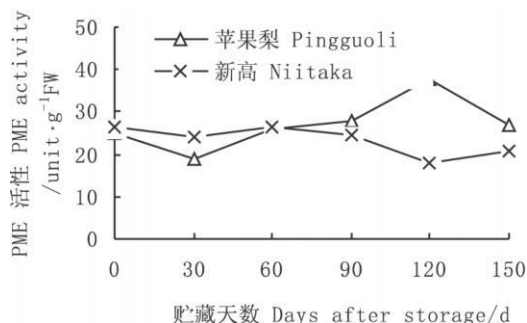


图3 梨果实在贮藏过程中PME酶活性变化

Fig. 3 Change in PME activity during storage of pear fruits

β -Gal 在苹果^[46]、桃^[8]和柿^[19]等果实软化中的重要作用已得到证实。新高梨的 β -Gal 酶活性极显著高于苹果梨,苹果梨的 β -Gal 酶活性又很低,与这两种梨的耐贮性相一致,说明梨果实软化与 β -Gal 酶活性密切相关。这个研究结果与 KIM 等^[15] 在‘幸水’上、YOO 等^[16] 在‘黄金梨’上的研究结果相一致。从中可以推断 β -Gal 酶是梨果实软化的重要酶,比 PG 更重要。

新高梨的 PME 活性在贮藏初、中期变化不大,但后期减少,这个结果与周宏伟等^[13] 在长把梨上的研究结果相一致,而与刘剑锋等^[17] 在黄花梨和湘南梨上的研究结果相反,说明新高梨的果胶水解与 PME 活性变化关系不大;而苹果梨的 PME 活性在贮藏过程中虽与 PG 活性变化不完全同步,但有类似的趋势,说明 PME 对苹果梨果实的果胶水解有一定的影响。可见,梨果实中的 PME 活性变化因品种而异,与梨的耐贮性关系不大。

4 结论

2 个梨品种果实在软化过程中 PG 活性均增加且在贮藏后期新高梨的 PG 活性极显著($p < 0.01$)高于苹果梨,贮藏性强的苹果梨的 β -Gal 活性很低且在贮藏中减少,但贮藏性相对较弱的新高梨的 β -Gal 活性极显著($p < 0.01$)高于苹果梨且在可溶性果胶增加的时期达活性高峰;苹果梨的 PME 活性在贮藏后期有所增加,但新高梨减少。可见,在贮藏过程中 PG 和 β -Gal 酶均是梨果实软化的重要酶,但 β -Gal 的作用比 PG 酶更重要;PME 的活性变化因品种而异,与耐贮性关系不大。

参考文献

- [1] 荆子然 金东权. 苹果梨[M]. 延吉: 延边人民出版社, 1989: 93.
- [2] Kim H G, She Z S, Kim S K, et al. High efficiency planting technology and manage of pear[M]. Korea Seoul: Peasantry newspaper office, 1997: 1.
- [3] Huber D J. The role of cell wall hydrolases in fruit softening[J]. Hort Rev, 1983(5): 169-219.
- [4] Kang I K, Kim H Y, Kweon H J, et al. Changes in ethylene production, respiration rates and cell wall hydrolase activities during storage of apples[J]. J Kor Hort Sci, 1999, 40(4): 451-454.
- [5] 金昌海 水野雅史 汪志君, 等. 苹果 β -galactosidase 以细胞壁多糖降解特性的研究[J]. 扬州大学学报, 2002, 23(4): 71-74, 78.
- [6] Byun J K, Her J S, Chang K H, et al. Changes in pectic substances and cell wall hydrolases during ripening and storage of apple fruits[J]. J Kor Soc Hort Sci, 1993, 34(1): 46-53.
- [7] 薛炳辉 束怀瑞. 肥城桃两品系果实细胞壁成分和水解酶活性的比较[J]. 园艺学报, 2004, 31(4): 499-501.
- [8] Kim M H, Shin S R, Kim J G, et al. Changes in the cell wall components, enzyme activities and cell structure of peach during maturation[J]. Kor J Post-harvest Sci Technol Agri Products, 1994, 2(1): 107-116.
- [9] 彭丽桃 杨书珍, 任小林, 等. 采后两种不同果肉类型油桃软化相关酶活性的变化[J]. 热带亚热带植物学报, 2002, 10(2): 171-176.
- [10] Kang I K, Chang K H, Byun J K. Changes in activities of cell wall hydrolases during ripening and softening in persimmon fruits[J]. J Kor Soc Hort Sci, 1998, 39(1): 55-59.
- [11] Ahmed E R, John M L. Cell wall metabolism in ripening fruit. II. Changes in carbohydrate-degrading enzymes in ripening Bartlett pears[J]. Plant Physiol, 1980, 65: 1014-1016.
- [12] Berrane R, Sonogo L, Frenkel C. Changes in pectic substances in ripening pears[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1979, 104(4): 500-505.
- [13] 周宏伟 吴耕西. 长把梨贮藏中多聚半乳糖醛酸酶与果胶甲酯酶的作用[J]. 山东农业大学学报, 1992, 23(1): 23-26.
- [14] Kim J S, Byun J K. Role of β -galactosidase on the solubilization and degradation of pectin in pear fruit[J]. J Kor Hort treatise point, 1995, 13(1): 394-395.
- [15] Park Y M, and Kim J K. Characterization of the Degradation of pear fruit cell wall by pectolytic enzymes and their use in fruit tissue liquefaction[J]. J Kor Soc Hort Sci, 1997, 38(3): 255-262.
- [16] Yoo W J, Kim D H, Lee D H, et al. Changes in respiration rates, cell wall components and their hydrolase activities during the ripening of 'WhangKeumbae' pear fruit[J]. J Kor Hort Sci, 2002, 43(1): 43-46.
- [17] 刘剑锋, 程云清 彭抒昂. 2004. 梨采后细胞壁成分及果胶酶活性与果肉质地的关系[J]. 园艺学报, 2004, 31(5): 579-583.
- [18] Gross K C. A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide[J]. HortScience, 1982, 17: 933-934.
- [19] Bartley M. Exo-polygalacturonase of apple[J]. Phytochemistry, 1978, 17: 213-216.
- [20] 朴一龙 赵兰花, 薛桂新. 梨贮藏中细胞壁成分变化[J]. 果树学报, 2006, 23(6): 880-883.
- [21] 寇晓虹 罗云波. 植物多聚半乳糖醛酸酶研究进展[J]. 山西农业大学学报, 2004, 24(4): 411-415.

寒兰组培苗生根培养的多因子正交试验研究

黄 闽 敏, 刘 晓 芳, 曹 青 爽

(新疆林业科学院测试中心 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘 要:应用正交试验设计对寒兰组培苗的生根培养进行研究。结果表明:寒兰组培苗生根的最佳培养基为花宝 2 号培养基+NAA 0.1 mg/L+IBA 0.5 mg/L+香蕉 50 g/L,其中培养基种类和天然复合物对其影响最大,通过方差分析达到了极显著水平。

关键词:寒兰;生根培养;正交试验

中图分类号:S 682.31;S 603.6 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2009)04-0053-03

寒兰(*Cymbidium kanran* Makino)属兰科兰属,在我国主要分布在福建、浙江、江西、湖南、广东等地,四川及云贵高原时有发现。寒兰是珍贵的观赏花卉,由于在自然状态下繁殖困难,故传统栽培靠分株繁殖,周期长,繁殖率低^[1]。从 1960 年 Morel^[2] 开创兰花快速组织培养技术以来,兰花的快速繁殖尤其在中国兰的组织培养方法上有许多突破。以往关于国兰的快繁研究多集中在对春兰、剑兰、蕙兰和墨兰等组织培养,并且建立了相应的离体快繁技术体系,有关寒兰的组织培养却鲜有报道。该试验通过对无毒寒兰苗培养基中不同激素配比生根壮苗影响的研究,筛选出有利于生根壮苗的培养基

配方,为逐步建立稳定的高频再生系统、实现无毒工厂化、规模化快速培育优良种苗提供科技支撑。

1 材料与方法

1.1 材料的获取

1.1.1 材料 寒兰(紫燕品种)无根组培苗。

1.1.2 获取的方法 利用植物组织培养技术,经过继代培养后获取。继代培养:MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L,培养基中加蔗糖 30 g/L、琼脂 5 g/L, pH 值调至 5.8。将初代培养后的小苗在无菌条件下转接到继代培养基中进行继代培养;在培养 40 d 后,苗高达 3~5 cm,叶浓绿,长势良好,符合生根要求,可以进行生根培养。

1.1.3 实验地点 在新疆林业科学研究院植物组织培养实验室。

1.2 试验方法

第一作者简介:黄闽敏(1980-),女,乌鲁木齐人,助理研究员,现主要从事植物生理生态等研究工作。

基金项目:国家“948”计划资助项目(20040423)。

收稿日期:2008-11-02

Change in Pectin Decomposition Enzyme During Storage of Pear Fruits

PIAO Yi-long, ZHAO Lan-hua, WU Rong-zhe

(Agricultural College of Yanbian University, Longjing, Jilin 133400, China)

Abstract: Compared the variety of pectin decomposition enzyme during fruit softening stage in two ‘Pingguoli’ and ‘Niitaka’ species that have different storage potential and investigated the activity change in pear pectin decomposition enzyme during storage stage. The results showed that the polygalacturonase (PG) activity was increased in two species during fruit softening and to the end of storage PG activity in ‘Niitaka’ was significantly ($P<0.01$ =higher than ‘Pingguoli’; β -Galactosidase (β -Gal) activity was lower and reduced during storage in high storage potential ‘Pingguoli’, in contrast, β -Gal activity in low storage potential ‘Niitaka’ was significantly ($P<0.01$) higher than ‘Pingguoli’ and the highest activity represented with increasing soluble pectin content; the activity of pectin methyl esterase (PME) was increased during end of storage stage in ‘Pingguoli’, however, reduced in ‘Niitaka’. Several evidences indicated that both PG and β -Gal play role in fruit softening during storage stage and β -Gal more important; the activity of PME variety depended species during storage stage and not strongly influence storage potential.

Key words: Pear fruit; After harvest; Pectin decomposition enzyme