

普通型和大果芽变型苹果梨不同发育时期果实有机酸组分差异性

张 微, 刘 迪, 于 婷 婷, 刘 晓 羽, 孟 义 淳, 王 甜 元

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002)

摘 要:为明确苹果梨普通型和大果型芽变果实有机酸品质形成的差异及其产生的原因,以苹果梨及其大果型芽变果实为试材,采用高效液相色谱法(HPLC)测定了果实不同发育时期(细胞分裂期、果实迅速生长期和果实成熟期)中的柠檬酸、苹果酸、琥珀酸、奎宁酸和莽草酸含量。结果表明:1)苹果梨果实主要有机酸为苹果酸和柠檬酸,可分为柠檬酸型果实和苹果酸型果实,普通型苹果梨为柠檬酸型果实,大果型芽变果实为苹果酸型果实。2)无论是普通型苹果梨还是大果型芽变苹果梨在细胞分裂期均不产生柠檬酸;二者在细胞分裂期时奎宁酸含量最高;芽变型苹果梨其苹果酸含量在成熟期最高,普通型苹果梨其柠檬酸含量在成熟期最高;普通型苹果梨及芽变型苹果梨莽草酸含量均在细胞分裂期最高。

关键词:苹果梨;芽变;果实;有机酸;柠檬酸;苹果酸

中图分类号:S 661.201 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2019)12-0014-06

苹果梨(*Pyrus bretschneideri* Rehd. cv. 'Pingguoli')属蔷薇科梨属植物,于1921年由朝鲜引入并成功嫁接成苹果梨,是优良的耐寒梨品种,是延边地区梨主栽品种之一。苹果梨具有消痰止咳、燥湿健脾等功效,其贮藏期长、品质优良、果肉多汁可口。苹果梨芽变是其发生新变异的重要来源,它为苹果梨杂交育种亲本的选择提供新的种质资源。

通过田间调查和品质分析,研究发现大果型芽变苹果梨中可溶性固形物和糖酸比明显高于普通型苹果梨,而果实中糖酸比主要受有机酸的影

响^[1]。目前在荔枝、苹果、杏、猕猴桃等果实中采用HPLC法测定果实中有机酸组分及含量已得到广泛的应用^[2-5]。关于梨果实有机酸形成与组分分析方面也有部分研究,如胡红菊等^[6]研究发现砂梨可分为苹果酸优势型和柠檬酸优势型的品种。姚改芳等^[7]对98个不同栽培地区梨果实中的有机酸组成与含量进行了分析。岳英等^[8]研究发现柠檬酸、苹果酸和琥珀酸在不同品系的梨汁中起主要的作用。

该试验采用HPLC法测定普通型苹果梨及其大果型芽变果实不同发育时期主要的5种有机酸含量及组分,以期为进一步探讨普通型苹果梨和大果型芽变果实酸品质性状机理及其产生差异的原因提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

普通型苹果梨和芽变型苹果梨均取自吉林省延边州农业科学院果树园20年生苹果梨树。

第一作者简介:张微(1995-),女,硕士研究生,研究方向为果树发育生物学。E-mail:zwybu234@163.com

责任作者:刘迪(1973-),男,博士,副教授,现主要从事果树及菌物发育生物学等研究工作。E-mail:liudi@ybu.edu.cn

基金项目:吉林省教育厅“十三五”科学技术资助项目(JJKH20170462KJ);吉林省科技厅自然科学基金资助项目(20170101022JC)。

收稿日期:2018-11-26

分别于细胞分裂期(2017年6月19日)、果实迅速生长期(2017年9月3日)和果实成熟期(2017年9月27日)选取果形正常、无病虫害的果实采摘。

标准品:奎尼酸、琥珀酸、苹果酸、柠檬酸、莽草酸均购自北京坛墨质检中心;甲醇(购自上海阿拉丁有限公司)为色谱纯;磷酸氢二钠、磷酸为色谱级以及其它常规的化学试剂。

高效液相色谱:日立高新技术公司的 Primaide 系统;色谱柱:美国 Agilent 公司的色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m);高速冷冻离心机、真空旋转蒸发仪、恒温水浴锅、漩涡混合器以及其它常规仪器。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的绘制

将标准品分别配置:琥珀酸 10 mg·mL⁻¹、奎宁酸 8 mg·mL⁻¹、苹果酸 10 mg·mL⁻¹、莽草酸 2 mg·mL⁻¹、柠檬酸 10 mg·mL⁻¹加磷酸氢二钠溶液溶解装在容量瓶中待用,分别经过 0.45 μ m 微孔滤膜过滤后,进行分析。制作标准曲线时,分别取 2.00、1.00、0.75、0.50、0.25 mL 加磷酸氢二钠溶液定容在 5 mL 容量瓶中,进行液相色谱分析,再根据 5 种不同浓度的混合标样的色谱图,记录色谱保留时间(RT 值)及不同浓度的峰面积,建立线性回归方程。

1.2.2 有机酸的提取与测定

有机酸的提取参照姚改芳^[9]的方法,并加以改良。称取 2 g 果肉加入液氮进行研磨,然后将粉末状果肉放入烧杯内加入 80% 的乙醇提取液,37℃ 恒温水浴加热 30 min,将样品震荡 2 min,随后超声波提取 15 min,4℃ 条件下 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,将上清液经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤到 25 mL 的容量瓶中,重复提取 3 次,定容,取一定的溶液经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤用旋转蒸发仪蒸发至无水状态并用超纯水定容,上机检测。每个样品重复测定 3 次。

流动相:甲醇:2%,磷酸氢二钠缓冲液:98% (pH 2.6,用磷酸调配),流速:0.3 mL·min⁻¹,柱温:35℃,波长 210 nm,进样量:5 μ L。

1.3 项目测定

采摘后马上测定果实的各项发育指标,包括

单果质量、果实横径和果实纵径。同时选取部分样品装入冰盒带回实验室,用液氮速冻后放入-80℃冰箱中保存,用于测定果实中奎尼酸、琥珀酸、苹果酸、柠檬酸和莽草酸含量。测量各个阶段单果质量、果实大小及横纵径时,每个时期重复 3 次,每次重复取 5 个果实。

1.4 数据分析

采用 SPSS 22.0 软件进行差异显著性分析。采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行图形制作。

2 结果与分析

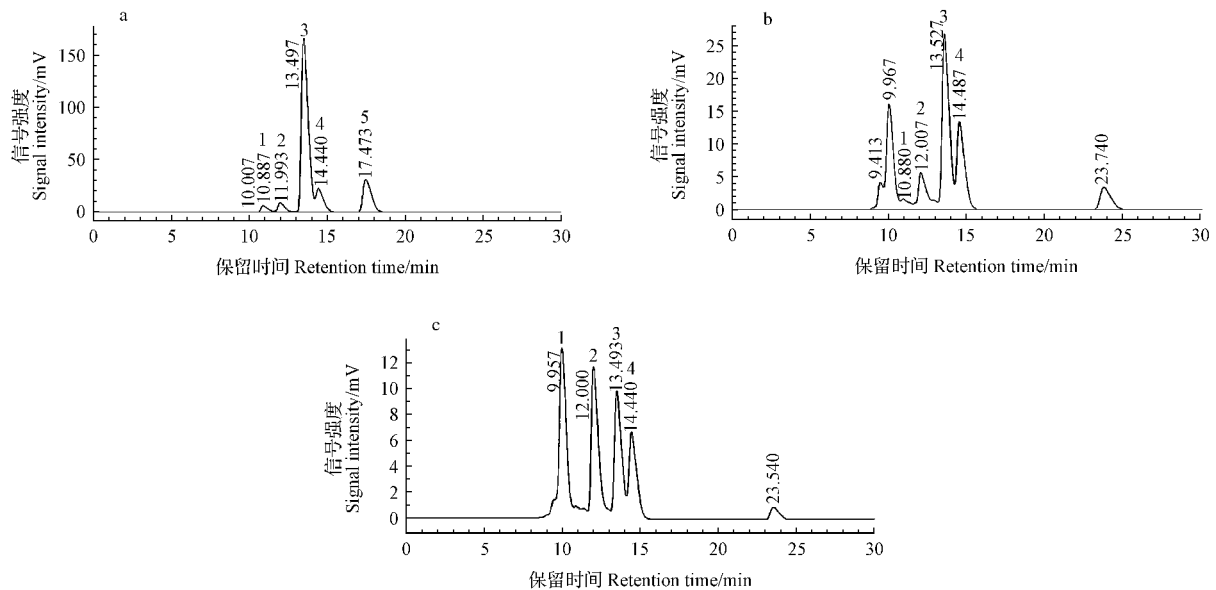
2.1 苹果梨中主要有机酸组分鉴定

由图 1 可知,采用 HPLC 法可以较好地分离混合标准样品中的各个有机酸组分。标准样品中各个有机酸的出峰顺序依次为奎宁酸、苹果酸、莽草酸、柠檬酸、琥珀酸,其出峰保留时间分别为 10.887、11.993、13.497、14.440、17.473 min (图 1a)。普通型苹果梨果实中 4 种有机酸出峰时间依次为 10.880、12.007、13.527、14.487 min (图 1b);大果型芽变果实中 4 种有机酸出峰时间依次为 9.957、12.000、13.493、14.440 min (图 1c)。所有样品均在 30 min 内出峰完毕,普通型苹果梨及其大果型芽变果实中琥珀酸未出明显峰值,可能是由于二者中琥珀酸含量极低。对照标准品出峰图,可以确定普通型和大果型芽变苹果梨果实中检测出的 4 种有机酸分别为奎宁酸、苹果酸、莽草酸、柠檬酸,从图 1 也可以看出,普通型苹果梨及大果型芽变果实中含有未检测出的成分。此外,通过不同浓度的混合标准样品得到 5 种有机酸浓度与峰面积回归方程见表 1。

2.2 苹果梨果实发育过程中各有机酸组分含量变化

2.2.1 苹果酸

由图 2A 可知,在苹果梨果实发育过程中,无论是普通型苹果梨还是大果型芽变果实其苹果酸含量的变化随果实的生长发育而不断增加,由于酸优势性的不同,其中最明显的差异主要出现在成熟期,大果型芽变果实其苹果酸含量显著高于普通型苹果梨。通过对样品中的有机酸进行分析计算^[10],发现普通型苹果梨属于柠檬酸型果实,在果实的迅速生长期和成熟期其柠檬酸与苹果酸



注:a. 有机酸混合标准品;b. 普通型苹果梨果实样品;c. 大果型芽变苹果梨果实样品;1. 奎宁酸;2. 苹果酸;3. 莽草酸;4. 柠檬酸;5. 琥珀酸。

Note:a. Reference standard of organic acids; b. The normol 'Pingguoli' pear; c. Large-fruited mutant from 'Pingguoli' pear; 1. Quinic acid; 2. Malic acid; 3. Shikimic acid; 4. Citrate acid; 5. Succinic acid.

图1 高效液相色谱有机酸组分出峰图

Fig. 1 HPLC-chromatogram of organic acids components

表1 各组分色谱分析得保留时间、线性方程、相关系数

Table 1 Retention time, linear equation and correlation coefficient with different components by HPLC analysis

化合物 Compound	保留时间 Retention time/min	线性方程(n=6) Linear equation	相关系数 Coefficient of correlation
奎宁酸 Quinic acid	10.887	$y=336.79x+9.6473$	0.9995
苹果酸 Malic acid	12.007	$y=495.23x+14.8850$	0.9994
莽草酸 Shikimic acid	13.487	$y=5523.1x+353.4600$	0.9979
柠檬酸 Citrate acid	14.420	$y=642.65x+25.6840$	0.9992
琥珀酸 Succinic acid	17.433	$y=2338.6x+71.7860$	0.9979

的比值均大于1,参考霍月青等^[10]的研究在细胞分裂期时其苹果酸含量为 $0.29 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,快速生长期升至 $0.391 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,到达成熟期时其含量缓慢增加至 $0.402 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。大果型芽变则属于苹果酸型果实,在果实的迅速生长期和成熟期其柠檬酸与苹果酸的比值均小于1。并且初期苹果酸含量为 $0.351 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,到成熟期时急剧增加到 $0.788 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.2.2 柠檬酸

由图2-B可知,在普通型苹果梨和大果型芽变2个果实中,初期即果实细胞分裂时期时并没有形成柠檬酸,迅速成长期时二者没有明显区别,

进入成熟期后由于二者酸优势型的不同,二者的差异也较显著,大果型芽变果实中的柠檬酸含量为 $0.310 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,而普通型果实中的柠檬酸含量为 $0.668 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.2.3 奎宁酸

由图2-C可知,果实发育初期普通型苹果梨奎宁酸含量为 $0.906 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,而大果型芽变果实奎宁酸含量为 $0.936 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,随着果实的生长,奎宁酸含量急剧下降,与此同时,苹果酸优势型的大果型芽变果实其苹果酸含量随果实的发育而不断增加,柠檬酸优势型的普通型苹果梨果实其柠檬酸含量也随果实的生长而不断增加。

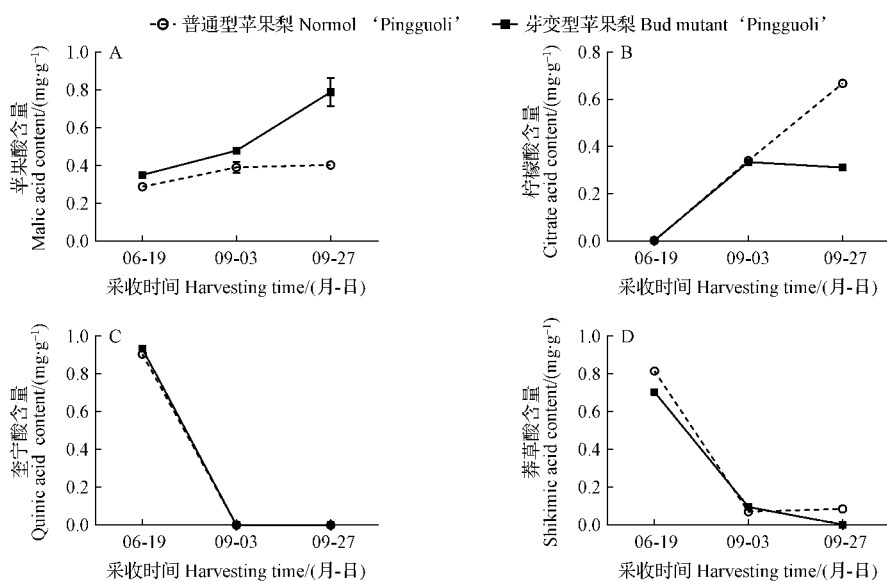


图 2 有机酸含量变化曲线

Fig. 2 Changes in content of organic acid

2.2.4 莽草酸

由图 2-D 可知,莽草酸变化的趋势是随着果实的成熟而降低的。初期大果型芽变莽草酸含量 $0.705 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,成熟期时莽草酸含量为 $0.0023 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,而初期普通型的苹果梨果实莽草酸为 $0.8173 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,成熟期时莽草酸含量为 $0.0851 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。二者莽草酸含量皆随果实的发育而逐渐降低。

2.3 苹果梨果实发育期内各有机酸组分含量

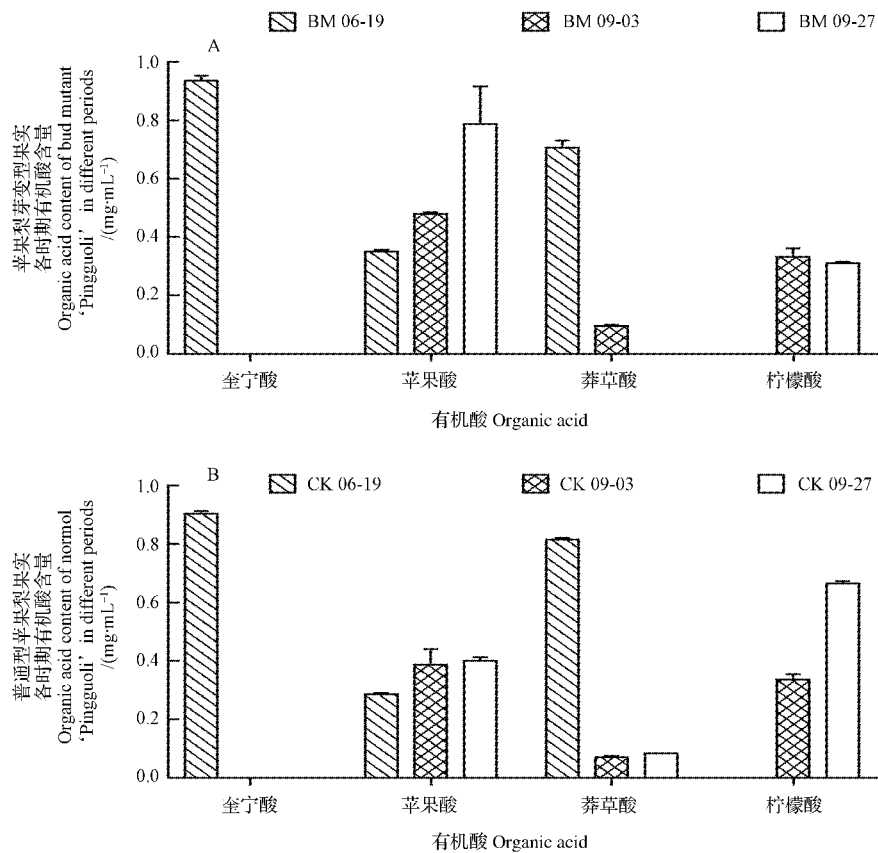
有机酸一般在果实发育初期形成,并随着果实的成熟而逐渐减少。由图 3 可知,无论是普通型苹果梨还是大果型芽变苹果梨在细胞分裂期均不产生柠檬酸,在细胞分裂期奎宁酸含量最高,而在果实迅速生长期和果实成熟期奎宁酸含量极低;芽变型苹果梨其苹果酸含量在成熟期最高,普通型苹果梨其柠檬酸含量在成熟期最高,普通型苹果梨及芽变型苹果梨莽草酸含量均在细胞分裂期时含量最高。

3 讨论与结论

随着果实的生长发育,大部分果实中由于后期糖含量增长参与活动,有机酸含量逐渐减少^[12],如葡萄^[13]、菠萝^[14]、柑橘^[15]、桃^[16]、枇

杷^[17]等。陈发兴等^[18]所测的枇杷果实中的奎宁酸含量随着果实的生长而减少,同时期的苹果酸和柠檬酸的变化规律则与奎宁酸相反。该研究中苹果梨有机酸的变化趋势与其相似。潘瑞焱^[19]认为梨果实中的部分有机酸会转变为糖从而导致其酸含量减少,有一些则由于呼吸作用氧化成 CO_2 和 H_2O ,或者被 K^+ 、 Ca^{2+} 中和,同时也有人认为随着果实发育其体积不断增大对其体内的有机酸进行了稀释作用^[20]。

陈发兴等^[21]研究表明,可以将果实按照有机酸的组分及其分布划分为苹果酸型、柠檬酸型和酒石酸型三大类型果实。霍月青等^[10]研究发现,对 70 个砂梨品种进行测定,结果选育的砂梨品种均为苹果酸优势型,大多数地方性砂梨品种均为柠檬酸优势型。该研究发现,苹果梨果实中的有机酸主要以苹果酸和柠檬酸为主,并且存在着柠檬酸优势型和苹果酸优势型的差异,其中普通型苹果梨为柠檬酸型果实,而大果型芽变苹果梨则是苹果酸型果实,可见,芽变过程导致苹果梨酸组成发生了显著的改变,因此导致苹果梨口感也相应发生变化。刘建军等^[22]发现,人的口腔会较先感觉到果实中的柠檬酸,苹果酸比柠檬酸更加柔和且回味时间较长;沙守峰^[23]认为苹果酸含量高通常具有良好的风味品质,因此大果型芽变果实



注:CK 和 BM 分别表示普通型苹果梨和芽变型果实。

Note:CK and BM indicate 'Pingguoli' pear and its bud mutant.

图3 苹果梨及其大果型芽变果实发育各个时期有机酸含量的变化

Fig. 3 Changes of organic acid content in normal 'Pingguoli' and bud mutant 'Pingguoli' at different stages of fruit development

的口感较普通型苹果梨果实的口感较好一些,但具体二者产生口感上品质的差异机理尚不明确,需进一步的研究。

参考文献

- [1] CHEN F X, LIU X H, CHEN L S. Advances in research on organic acid metabolism in fruits[J]. Journal of Fruit Science, 2005, 22(5): 526-531.
- [2] 胡志群, 王惠聪, 胡桂兵. 高效液相色谱测定荔枝果肉中的糖、酸和维生素 C[J]. 果树学报, 2005(5): 582-585.
- [3] 梁俊, 郭燕, 刘玉莲, 等. 不同品种苹果果实中糖酸组成与含量分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 39(10): 163-170.
- [4] BARTOLOZZI F, BERTAZZA G, BASSI D, et al. Simultaneous determination of soluble sugars and organic acids as their trimethylsilyl derivatives in apricot fruits by gas-liquid chroma-

tography[J]. Journal of Chromatography A, 1997, 758(1): 99-107.

- [5] 周元, 傅虹飞. 猕猴桃中的有机酸高效液相色谱法分析[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(19): 85-87.
- [6] 胡红菊, 王友平, 陈启亮, 等. 不同熟期砂梨生长及主要糖酸含量动态的研究[J]. 湖北农业科学, 2007(4): 637-640.
- [7] 姚改芳, 杨志军, 张绍铃, 等. 梨不同栽培种果实有机酸组分及含量特征分析[J]. 园艺学报, 2014, 41(4): 755-764.
- [8] 岳英, 鲁晓燕, 谢成龙, 等. 不同品种(品系)梨汁中有机酸含量分析[J]. 新疆农业科学, 2012, 49(10): 1881-1886.
- [9] 姚改芳. 不同栽培种梨果实糖酸含量特征及形成规律研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [10] 霍月青, 胡红菊, 彭抒昂, 等. 砂梨品种资源有机酸含量及发育期变化[J]. 中国农业科学, 2009, 42(1): 216-223.
- [11] 张树军. '南果梨'大果型芽变的细胞、生理及分子基础研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [12] 何志刚, 李维新, 林晓姿, 等. 枇杷果实成熟和贮藏过程中有

机酸的代谢[J]. 果树学报, 2005, 22(1): 23-26.

[13] LAMIKANRA O, INYANG I D, LEONG S. Distribution and effect of grape maturity on organic acid content of red muscadine grapes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(12): 3026-3028.

[14] 张秀梅, 杜丽清, 孙光明, 等. 菠萝果实发育过程中有机酸含量及相关代谢酶活性的[J]. 果树学报, 2007(3): 381-384.

[15] SADKA A, ARTZI B, COHEN L, et al. Arsenite reduces acid content in citrus fruit, inhibits activity of citrate synthase but induces its gene expression[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2000, 125: 288-293.

[16] WU B H, QUILOT B, GENARD M, et al. Changes in sugar and organic acid concentrations maturation in peaches, *P. davidiana* and hybrids as analyzed by principal component during fruit analysis[J]. Scientia Horticult, 2005, 103: 42-39.

[17] NAGY S, SHAW P E. Tropical and subtropical fruits: Composition, properties and uses[M]. Westport, Connecticut: AVI Publishing, Inc., 1980.

[18] 陈发兴, 刘星辉, 陈立松. 枇杷果肉有机酸组分及有机酸在果实内的分布[J]. 热带亚热带植物学报, 2008(3): 236-243.

[19] 潘瑞炽. 植物生理学[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1995: 337.

[20] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系[J]. 植物生理学通讯, 1990(6): 55-57.

[21] 陈发兴, 刘星辉, 陈立松. 果实有机酸代谢研究进展[J]. 果树学报, 2005, 22(5): 526-531.

[22] 刘建军, 姜鲁燕, 赵祥颖, 等. L-苹果酸的应用及研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2003(3): 53-56, 52.

[23] 沙守峰. 梨有机酸组分及含量变化与遗传鉴定[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.

Study on the Difference of Organic Acid Components in Normal ‘Pingguoli’ Pear and Its Large-fruited Mutant at Different Developmental Stages

ZHANG Wei, LIU Di, YU Tingting, LIU Xiaoyu, MENG Yichun, WANG Tianyuan
(Agricultural College, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

Abstract: In order to clarify the difference in the formation of organic acid quality between normal ‘Pingguoli’ pear and its large-fruited mutant and the causes. Normal ‘Pingguoli’ pear and its large-fruited mutant were used as test materials. The contents of citric acid, malic acid, succinic acid, quinic acid and shikimic acid in different developmental stages of the fruit (cell division, rapid growth of fruit and fruit ripening) determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that, 1) The main organic acids of ‘Pingguoli’ pear were malic acid and citric acid, which could be divided into citric acid type and malic acid type fruit. ‘Pingguoli’ pear was citric acid type fruit, large-fruited mutant of ‘Pingguoli’ pear became malic acid type fruit. No citric acid was produced in either ‘Pingguoli’ pear or its large-fruited mutant during cell division. Both of them had the highest content of quinic acid during cell division; the content of malic acid in the large-fruited mutant of ‘Pingguoli’ pear was the highest in the mature stage, and the content of citric acid in ‘Pingguoli’ pear was the highest in the mature stage; the shikimic acid contents of ‘Pingguoli’ pear and its large-fruited mutant were the highest in cell division period.

Keywords: ‘Pingguoli’; bud mutant; fruit; organic acid; citrate acid; malic acid