

果胶酶和纤维素酶在桃果实成熟和絮败中的作用

茅林春¹ 张上隆²

(¹ 浙江大学食品与营养系, 杭州 310029; ² 浙江大学园艺系, 杭州 310029)

摘 要: 测定了果胶酶和纤维素酶在桃果实软化和絮败过程中的活性, 分析了贮前加温和中途加温的酶学效应。果实软化的启动似乎与 PE、PG 和纤维素酶活性的上升有关。endo-PG 和纤维素酶活性与果实絮败程度之间呈显著负相关 ($r = -0.9408$, $r = -0.9234$)。低温胁迫引起桃果实冷害絮败的本质是细胞壁果胶质的降解过程受阻。果胶质降解过程除了受到果胶酶的直接控制之外, 还受到纤维素酶的重要影响。中途加温或贮前加温减轻冷害的原因在于避免了低温胁迫对 endo-PG 和纤维素酶造成不可逆的伤害, 从而保证了果胶质降解过程的正常进行。

关键词: 桃; 贮藏; 成熟; 絮败; 果胶酶; 纤维素酶

中图分类号: S 662.1; Q 945 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2001) 02-0107-05

‘白凤’桃果实对低温比较敏感, 在 0℃ 下连续贮藏 3 周左右就易发生絮败, 主要特征是果肉不能正常软化, 质地粗而干燥, 色泽晦暗, 果汁粘稠, 难于挤汁^[1~3]。中途加温和贮前加温都能明显减轻果实的絮败, 前者的效果则更为显著^[3]。低温胁迫引起的絮败与细胞壁果胶质降解过程的异常有关^[4]。果胶酶 (PE, EC 3.1.1.11) 和多聚半乳糖醛酸酶 (PG, EC 3.2.1.15) 是分解果胶质的主要酶类。Pressey 等^[5,6]报道, 在桃果实中存在着两种 PG 同功酶, endo-PG 和 exo-PG。endo-PG 随机断裂多聚半乳糖醛酸链, 使其分子量减小; exo-PG 则是从果胶链的非还原性一端逐个切除半乳糖醛酸残基。endo-PG 和 exo-PG 的适宜 pH 值分别为 4.0 和 5.5, 二价离子不影响 endo-PG 的活性, 但 exo-PG 的活动需要 Ca^{2+} 的参与^[5]。纤维素是细胞壁的重要组成部分。梅、杏果实的生长和成熟过程中, 纤维素含量增加; 桃果实成熟期间的纤维素则略有减少^[7]。本试验研究了果胶酶和纤维素酶在桃果实正常成熟软化和冷害絮败过程中的作用, 并分析了贮前加温和中途加温减轻果实冷害的酶学原理。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

1999 年 7 月 5 日于杭州大观山果园采摘 ‘白凤’ 桃 [*Prunus persica* (L.) Batsch cv. Baifeng] 果实。果实部分着色, 底色微白, 硬度 $7 \sim 9 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$, 可溶性固形物含量 9% 以

收稿日期: 2000 - 07 - 04; 修回日期: 2000 - 11 - 08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970530)

上。取大小和颜色相似、无损伤的果实随机分成 3 组。每组约 21 kg, 分两只纸箱包装 (2 次重复)。第 1 组 (常规冷藏) 直接在 0 的冷藏箱中连续冷藏 20 d; 第 2 组 (中途加温) 冷藏到第 10 天, 移到 20 培养箱中放置 24 h 后再放回冷藏箱中; 第 3 组 (贮前加温) 先在 35 培养箱中放置 36 h, 再连续冷藏 19 d。果实冷藏结束后同时移到 20 培养箱中放置 8 d, 促使成熟软化, 也使冷害症状得到充分显现。每次随机取 6 个果实进行硬度和生化测定, 重复 2 次。

1.2 测定项目及方法

用 TG-1 型水果硬度计测定果实横径最大部位去皮果肉的硬度。

参考 Buescher 等^[8]的方法提取果胶酶。20 mL 的 1% 果胶 (Sigma 公司, 86% 酯化) 中加入 1 mL 果胶酶提取液后, 在 30 min 内维持 pH 5.0 所需滴入的 0.05 mol/L 氢氧化钠的毫升数表示 PE 酶的活性。一个 PE 活性单位表示 30 min 内每克果肉释放出 1 mmol 甲氧基 (-OCH₃)。PG 酶活性的测定方法参考文献 [6]。测定 endo-PG 的反应液组成为: 0.2 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 4.0) 0.5 mL, 果胶酶提取液 1 mL, 1% 氯霉素 0.1 mL。测定 exo-PG 的反应液组成为: 0.2 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 5.5) 0.4 mL, 果胶酶提取液 1 mL, 1% 氯霉素 0.1 mL, 0.02 mmol/L 氯化钙 0.1 mL。加入 1% 多聚半乳糖醛酸 1 mL 后开始计时, 12 h 后, 用蒽酮比色法测定反应液中还原糖的含量, 以半乳糖醛酸标准液作标准曲线。一个 PG 活性单位定义为 1 g 果肉在 1 h 内释放出 1 mmol 半乳糖醛酸。煮沸 5 min 的果胶酶提取液作为空白提取液。测定温度为 25 。

按照果胶酶提取方法提取纤维素酶。参考 Hinton 等^[9]的方法测定其活性。反应液组成为: 酶提液 1 mL, 0.5% 羧甲基纤维素钠 3 mL, 0.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液 (pH 6.0) 1 mL, 1% 氯霉素 0.1 mL。30 保温 12 h 后, 10⁴ ×g 离心 10 min, 用毛细管粘度计 (内径 0.04 mm) 测定上清液的粘度。纤维素酶活性用反应液保温前后的粘度下降百分率表示: 粘度下降百分率 (%) = [(T₀ - T) / (T₀ - T)] × 100, 其中 T₀ 为不加酶提液的反应液保温后流出粘度计所需的时间 (s); T 为柠檬酸缓冲液流出粘度计所需的时间 (s); T 为加酶提液的反应液保温后流出粘度计所需的时间 (s)。

2 结果与分析

2.1 加温处理对桃果实软化和絮败的影响

果实硬度在冷藏 20 d 期间变化很小, 冷藏后放在常温条件下果实明显软化 (图 1, A)。贮前 35 加温 36 h 反而使果实硬度有所提高, 但在冷藏期间硬度呈现缓慢下降的趋势。中途加温处理则明显促进果实软化。

冷藏后在常温成熟期间, 各处理果实的硬度在最初的 2~4 d 内快速下降, 随后便缓慢下降。至试验结束时, 中途加温处理的果实已严重软化, 但常规冷藏的果实硬度仍维持在较高水平, 果肉质度絮状、粗糙、汁液减少, 表现出明显的絮败特征。贮前加温的果实硬度介于中间水平, 表现出既延缓果实软化又减少絮败的双重效果。

桃果实冷藏后转移到常温下第 4 天, 絮败症状明显表现, 此时的果肉硬度和出汁率是判断絮败程度的有效指标^[2,3]。本试验结果再次证实, 中途加温和贮前加温均能明显减轻絮败。

2.2 PE 和 PG 活性的变化

3 种处理的桃果实在 20 d 冷藏和随后 6 d 常温成熟过程中的 PE 活性变化见图 1, B。贮藏前经 35 °C 加温使 PE 活性有所提高, 但冷藏 10 d 后呈下降趋势。中途加温使 PE 活性明显上升, 但加温后回到低温环境时又很快回落。

冷藏后转移到常温条件下, 各处理 PE 活性明显上升。常规冷藏和中途加温的果实 PE 活性在常温下 2 d 内快速上升, 随后有所下降, 第 4 天后又明显上升。贮前加温的果实 PE 活性则在常温下 2 d 后明显上升。

冷藏前 35 °C 加温处理降低了 endo-PG 和 exo-PG 活性 (图 1, C、D)。0 °C 贮藏期间, PG 酶活性的变化也很小, 当果实转移到 20 °C 下, 其活性有不同程度的提高。中途加温期间, 两种 PG 的活性快速上升, 加温结束回到低温后, 其活性也随之回落。

冷藏后转移到常温下, 常规冷藏的果实 endo-PG 活性明显低于加温处理的果实 (图 1, C)。常温下第 4 天时, 各处理的 endo-PG 活性与采败程度 (以果肉硬度表示) 之间呈极显著负相关 ($r = -0.9408$), exo-PG 活性与冷害程度的相关性则不明显。

2.3 纤维素酶活性的变化

中途加温能提高桃果实纤维素酶的活性, 但这种效果在恢复低温状态时又很快消失。冷藏前 35 °C 加温 36 h 也有提高纤维素酶活性的作用, 但效果明显不如中途加温的处理。整个冷藏期间, 纤维素酶活性以中途加温的最高, 常规冷藏的最低, 贮前加温的居中 (图 1, E)。

冷藏后在常温成熟初期, 冷害较轻的中途加温和贮前加温处理果实的纤维素酶活性均快速提高。冷害较重的常规冷藏果实的纤维素酶活性, 在 20 °C 下 4 d 以后才有一定程度的提高, 其总体水平明显低于

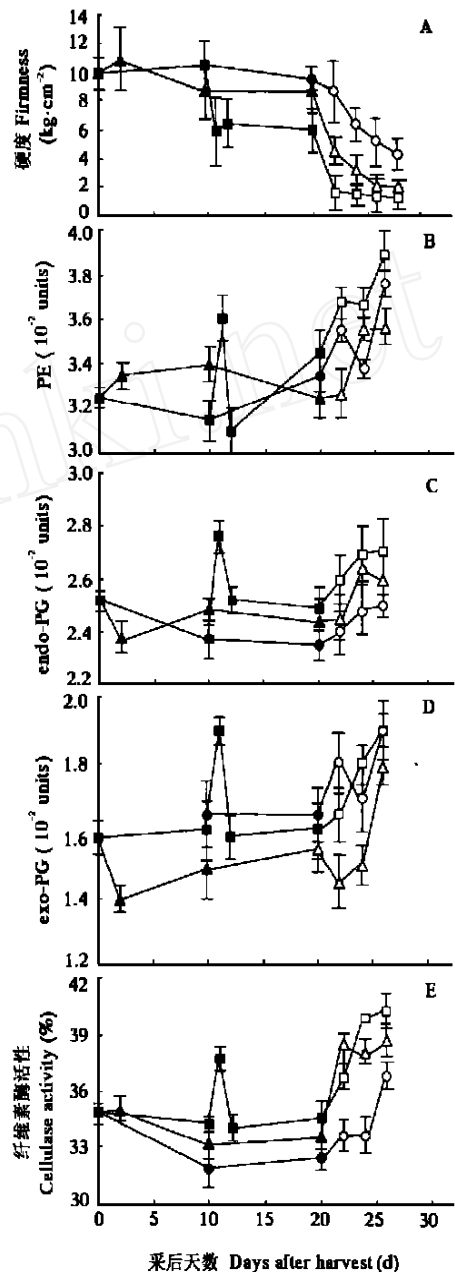


图 1 桃果实在 20 d 冷藏和随后的常温成熟期间的硬度和 PE、endo-PG、exo-PG、纤维素酶活性的变化

果实在 0 °C 下连续冷藏 20 d, 先在 35 °C 下加温 36 h 后再冷藏, 冷藏中期在 20 °C 下加温 24 h。

Fig. 1 Changes of flesh firmness, PE, endo-PG, exo-PG and cellulase activities in peaches during 20 d of cold storage and subsequent ripening

Fruits were continuously stored for 20 d at 0 °C, held for 36 h at 35 °C before being cold-stored, warmed at 20 °C for 24 h during the middle of cold storage.

加温处理的果实。

成熟初期纤维素酶活性快速上升的趋势与果实软化过程（图 1, A）比较一致。冷藏后常温成熟第 4 天，果肉絮败明显出现时，纤维素酶活性与冷害程度（以硬度表示）之间的相关性极显著（ $r = -0.9234$ ）。

3 讨论

无论是絮败较明显的常规冷藏果实，还是正常成熟软化的贮前加温和中途加温处理的果实，其软化（硬度下降）的初始阶段与 PE 和 PG 活性的上升有着较为密切的联系（图 1, A、B、C、D）。但是，软化过程明显受阻的常规冷藏果实的 PE 和 *exo*-PG 活性在冷藏 20 d 和常温第 2 天、第 6 天时均高于正常软化的加温处理果实。这一结果说明，PE 和 PG 的活性水平与桃果实的软化程度并不显著关联。王贵禧等^[10]认为，PE 并不是猕猴桃果实软化的专一酶。

PE 的作用是催化脱除半乳糖醛酸 C-6 羧基上的甲醇基，由于 PG 是以脱去甲醇基的多聚半乳糖醛酸为作用对象，因此，PE 的活动似乎是 PG 活动的必要前提^[11]。果胶酶作用顺序的可能模式是：PE 催化产生脱甲酯果胶质；*endo*-PG 活动使 *exo*-PG 从细胞壁上解离^[12]，并提供 *exo*-PG 的作用基质^[13]；*endo*-PG 和 *exo*-PG 的共同作用使细胞壁果胶质增溶和解聚，最终导致果实软化。

纤维素酶与桃果实软化的启动可能有着更为密切的联系。中途加温和贮前加温处理的果实在快速软化的同时，其纤维素酶活性也快速提高。常规冷藏果实不能正常软化，其纤维素酶活性也明显偏低，而且只在常温第 4 天后才开始提高（图 1, E）。纤维素酶活性的提高，使纤维素降解，从而导致细胞壁纤维素微纤丝—半纤维素—果胶质“经纬结构”^[14]的松散，果胶酶趁机分解果胶质，导致果实软化过程的进行。纤维素的降解意味着细胞壁的解体 and 果实的软化。在苹果和草莓的软化过程中，纤维素酶活性增加并导致细胞壁的膨胀疏松^[15]。纤维素酶活性上升所引起的猕猴桃果实软化主要表现在快速软化阶段^[10]。

中途加温和贮前加温能有效地减缓桃果实的絮败，这两种处理的 *endo*-PG 和纤维素酶活性明显高于发生冷害的常规冷藏果实（图 1, C、D）。低水平的 *endo*-PG 和纤维素酶活性可能是造成果实絮败的直接原因。加温处理减轻果实絮败的主要原理在于：防止低温胁迫对 *endo*-PG 和纤维素酶的合成或活性造成不可逆的伤害，保证果实在冷藏后的常温成熟期间有较充足的 *endo*-PG 和纤维素酶活性，使果胶质的降解能正常进行。

严重絮败的常规冷藏果实中，PE 活性仍保持较高的水平，但 *endo*-PG 的活性明显低于正常成熟的果实，这种差异只有在果实从低温转移到常温条件时才比较明显。因此，在常温条件下，由于 PE 活性较高，所以大量果胶质发生脱甲酯化。但这种脱甲酯的果胶质因 *endo*-PG 活性较低而无法顺利分解，从而造成较高分子量的脱甲酯果胶质的积累。当这种果胶质积累到一定程度，就容易在 Ca^{2+} 的作用下发生凝胶，从而使细胞内大量的水分束缚在凝胶中，出现果汁减少、果肉絮状干化的絮败现象。低温胁迫降低了纤维素酶活性，有利于维护细胞壁“经纬结构”的完整性，也是造成果胶质不能正常降解的重要原因。

综上所述可以认为，桃果实成熟软化和冷害絮败与果胶质的降解代谢紧密相关，果胶质降解过程除了受到果胶酶的直接控制之外，还受到纤维素酶的重要影响。低温胁迫引起桃果实絮败的本质是细胞壁果胶质的降解过程受阻。

参考文献：

- 1 茅林春, 张上隆. 采后桃果实中多胺和乙烯对低温胁迫的反应. 园艺学报, 1999, 26: 360 ~ 363
- 2 茅林春, 应铁进, 张上隆. 桃果实絮败与果胶质变化和细胞壁结构的关系. 植物生理学报, 1999, 25: 121 ~ 126
- 3 茅林春, 王阳光, 张上隆. 热处理减缓桃果实的采后冷害. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2000, 26: 137 ~ 140
- 4 Dawson D W, Melton L D, Watkins C B. Cell wall changes in nectarines (*Prunus persica*): Solubilization and depolymerization of pectic and neutral polymers during ripening and in mealy fruit. Plant Physiol., 1992, 100: 1203 ~ 1210
- 5 Pressey R, Avants J K. Separation and characterization of endopolygalacturonase and exopolygalacturonase from peaches. Plant Physiol., 1973, 52: 252 ~ 256
- 6 Pressey R, Avants J K. Difference in polygalacturonase composition of clingstone and freestone peaches. J. Food Sci., 1978, 43: 1415 ~ 1417, 1423
- 7 Bouranis D L, Nivais C A. Cell wall metabolism in growing and ripening stone fruits. Plant Cell Physiol., 1992, 33: 999 ~ 1008
- 8 Buescher R W, Furmanski R J. Role of pectinesterase and polygalacturonase in the formation of wooliness in peaches. J. Food Sci., 1978, 43: 264 ~ 266
- 9 Hinton D M, Pressey R. Cellulase activity in peaches during ripening. J. Food Sci., 1974, 39: 783 ~ 785
- 10 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. 植物学报, 1995, 37: 198 ~ 203
- 11 Dahodwala S, Humphrey A, Weibel M. Pectic enzymes: individual and concerted kinetic behavior of pectinesterase and pectinase. J. Food Sci., 1974, 39: 920 ~ 926
- 12 Strand L L, Rechters C, Mussell H. Polygalacturonase releases cell-wall bound proteins. Plant Physiol., 1976, 58: 722 ~ 725
- 13 Cooper R M, Wood R K S. Regulation of synthesis of cell wall degrading enzymes by *Verticillium albo-atricum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. Physiol. Plant Pathol., 1975, 5: 135 ~ 156
- 14 余叔文, 汤章城主编. 植物生理与分子生物学 (第二版). 北京: 科学出版社, 1998. 93 ~ 112
- 15 Abeles F B, Takeda T. Cellulase activity and ethylene in ripening strawberry and apple fruits. Sci. Hortic., 1990, 42: 269 ~ 275

Role of Pectolytic Enzymes and Cellulase during Ripening and Woolly Breakdown in Peaches

Mao Linchun¹ and Zhang Shanglong²

(¹ Department of Food and Nutrition, Zhejiang University, Hangzhou 310029; ² Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Abstract : Activities of pectolytic enzymes and cellulase in peaches [*Prunus persica* (L.) Batsch cv. Baifeng] were determined during softening and development of woolly breakdown. Enzymatic response to pre-warming and intermittent warming was also analyzed. Start of fruit softening seemed to be connected with the activity increase in PE, PG and cellulase. However, the level of PE and PG activities was not significantly related with the fruit firmness. Both endo-PG and cellulase activities were significantly negative correlated with the degree of woolly breakdown ($r = -0.9408$, $r = -0.9234$). The essential aspect of chilling injury known as woolly breakdown induced by low temperature stress was the abnormal degradation of cell wall pectin, which was not only controlled directly by pectolytic enzymes but also influenced largely by cellulase. Alleviating chilling injury with the treatment of pre-warming or intermittent warming was responsible for the prevention from irreversible damage to endo-PG and cellulase from low temperature stress and thus guaranteeing the normal process of pectin degradation.

Key words : Peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]; Woolly breakdown; Polygalacturonase; Pectinesterase; Cellulase