

## 设施油桃果实发育过程中有机酸代谢的研究\*

赵永红<sup>1</sup> 李宪利<sup>1\*\*</sup> 姜泽盛<sup>1</sup> 王长健<sup>2</sup> 杨富林<sup>2</sup>

(1. 山东农业大学园艺科学与工程学院 泰安 271018; 2. 茌平县财政局 茌平 252100)

**摘要** 以设施栽培“超红珠”油桃为试材,测定了果实发育过程有机酸含量及相关代谢酶——柠檬酸合酶(CS)、苹果酸酶(ME)、苹果酸脱氢酶(MDH)的活性,并对果实中有机酸积累及酶活性的关系进行了分析。研究结果表明:随油桃果实发育,其有机酸含量呈先升高后降低趋势,于盛花后49d达到最高值;苹果酸含量与总有机酸含量变化趋势相似;柠檬酸含量呈逐渐升高趋势,至果实成熟有所降低;果实成熟期苹果酸与柠檬酸含量相近。有机酸相关代谢酶CS活性变化与柠檬酸含量相关性不大;果实发育后期ME活性逐渐升高,促进了苹果酸的降解和转化;MDH活性变化与苹果酸含量显著相关。因此抑制果实发育前期MDH的活性、促进果实发育后期ME的活性可以降低果实酸含量,提高糖酸比。

**关键词** 油桃果实 有机酸 苹果酸 柠檬酸 柠檬酸合成酶 苹果酸酶 苹果酸脱氢酶

**Organic acid metabolism in nectarine fruit development under protected cultivation.** ZHAO Yong-Hong<sup>1</sup>, LI Xian-Li<sup>1</sup>, JIANG Ze-Sheng<sup>1</sup>, WANG Chang-Jian<sup>2</sup>, YANG Fu-Lin<sup>2</sup> (1. College of Horticultural Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; 2. Financial Bureau of Chiping County, Chiping 252100, China), *CJEA*, 2007, 15(5): 87~89

**Abstract** Changes in organic acid contents and their relationship with relevant enzyme activities in nectarine fruits “Chaohongzhu” were studied. Results show that nectarine fruit total acid content hits a peak 49 days after full blossom and then gradually declines during later fruit development stages. Malic acid has similar change pattern as total acids, but citric acid gradually increases in content during fruit development with little reduction in the ripening stage of the fruit. Analysis on the activities of organic acids in relation to relevant enzymes shows no relation between citrate synthase activity (CS) and citric acid content. Increase in the activity of malic enzyme (ME) in the late period of nectarine fruit development accelerates degradation of malic acid in fruits. There is a significant correlation between malate dehydrogenase (MDH) activity and fruit malic acid content. This shows that nectarine fruit organic acid content can be reduced by MDH activity inhibition and enhancement of ME activity. This can equally increase the sugar to acid ratio of nectarine fruits.

**Key words** Nectarine fruit, Organic acids, Malic acid, Citric acid, Citrate synthase, Malic enzyme, Malate dehydrogenase  
(Received Dec. 25, 2005; revised Feb. 14, 2006)

果实糖、酸含量和糖酸比是决定果实风味的最重要指标,有机酸含量对水果的特殊味道往往起决定作用。前人在苹果和梨等果实上的研究表明,果实酸甜的划分主要取决于含酸量,而含糖量对果实酸甜度影响不大。设施栽培条件下,果实风味变淡、糖酸比下降与设施栽培环境的改变及糖酸代谢相关酶活性变化密切相关。增加果实中糖含量、降低酸含量已成为提高果实品质的主攻目标。目前关于果实有机酸代谢的研究较少,酸类物质的积累机理还不是很清楚,是否抑制果实中有机酸合成的酶能促进果实中糖的积累还存在争议。故本研究以设施栽培的“超红珠”油桃为试材,对果实发育过程中有机酸的积累和相关代谢酶——柠檬酸合酶(CS)、苹果酸酶(ME)、苹果酸脱氢酶(MDH)的活性变化进行了研究,旨在探索设施条件下有机酸的积累机理,为提高设施油桃果实品质提供理论依据。

### 1 试验材料与方法

试验于2005年2~5月在山东省茌平县财政局科技示范园进行。选用设施内树势健壮生长一致的“超红珠”油桃(*Prunus persica* var. *nectarina* L. cv. Chaohongzhu)作为试材,按干周留果法进行疏花疏果,设施

\* 山东省教育厅基金项目(32282)资助

\*\* 通讯作者

收稿日期:2005-12-25 改回日期:2006-02-14

内管理按常规方法进行。于盛花后第 3 周开始,每隔 1 周采样 1 次。采样时随机选取多个大小均匀的果实,液氮速冻处理后,在 $-80^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存,用于测定可滴定酸及相关酶活性。

果实总酸测定采用酸中和法:称取 2.5g 果实,匀浆,用 40mL 蒸馏水将其洗入 50mL 容量瓶中,封口,置 $80^{\circ}\text{C}$ 水浴提取 30min,用无 $\text{CO}_2$ 水定容,然后将其过滤入干净三角瓶中,滤液备用。取滤液 25mL 加入到三角瓶中,加酚酞 3~4 滴,用 0.1mol/L 的 NaOH 溶液滴定至呈粉红色,30s 不褪色,即为滴定终点。记录下所用标准 NaOH 溶液的体积,根据标准苹果酸用量,计算出果实中可滴定酸的含量,作为总酸含量。苹果酸和柠檬酸的含量采用 Beckman 毛细管电泳仪测定:称取 1g 左右的果实于研钵中,研磨成匀浆,用 10mL 左右的蒸馏水冲洗入试管中,在 $100^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 30min,4000r/min 离心 10min,收集上清液。残留物重复提取 1 次,收集 2 次上清液,定容至 25mL,用于有机酸含量测定。测定条件:100mmol/L 的磷酸氢二钠+0.5mmol/L 的 CTAB, pH=7,电压 10kV,负极进样,压力 3S 进样,温度 $20^{\circ}\text{C}$ ,200nm 直接检测。参照 Masashi 等<sup>[7]</sup>的方法稍作改进制备酶液:取 1g 样品于预冷的研钵中,加入 2mL 提取液[含 0.1% TritonX-100,10mmol/L 异抗坏血酸,0.2mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH=8.2)],在冰浴中研磨,研磨液以冷冻离心机 4000r/min 离心 20min,取上清液进行粗提纯后作为酶粗提液,用于酶活性测定。取样重复 3 次,每次测定 3 次取平均值。柠檬酸合酶(CS, EC4.1.3.7)活性测定<sup>[7]</sup>:酶液 $30^{\circ}\text{C}$ 保温。反应液中含 Tris-HCl 缓冲液(pH=9.0)、DTNB、AcCoA 和酶液,用 UV-2450 紫外分光光度计在 412nm 下测定吸光度,再加入草酰乙酸(OAA)启动反应,每隔 30s 测定 1 次吸光度,记录其变化。苹果酸酶(ME, EC1.1.1.40)活性测定<sup>[7]</sup>:酶液 $30^{\circ}\text{C}$ 保温。反应液含 80mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH=7.4)、2mmol/L 苹果酸、170 $\mu\text{mol/L}$  NADP、200 $\mu\text{mol/L}$   $\text{MnSO}_4$  和酶液,最终体积 0.5mL。用 UV-2450 紫外分光光度计在 340nm 下测定吸光度变化。苹果酸脱氢酶(MDH, EC1.1.1.37)活性测定<sup>[1]</sup>:酶液 $30^{\circ}\text{C}$ 保温。反应液中含 25mmol/L Tris-HCl (pH=8.0)、1mmol/L EDTA、0.5mmol/L OAA、0.2mmol/L NADH。以单位时间内光密度的变化表示酶活性。用 UV-2450 紫外分光光度计在 340nm 下测定吸光度,每隔 30s 测定 1 次,记录其变化。以每分钟吸光度变化 0.01 为 1 个酶单位(U)。酶活性测定重复 3 次,取平均值。

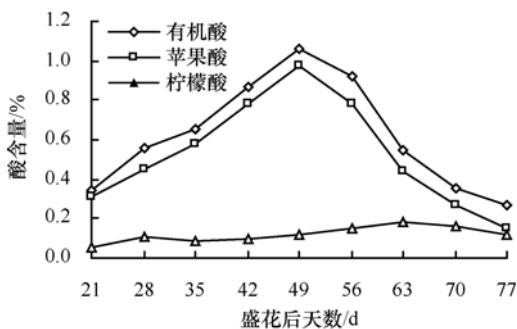


图 1 果实发育过程中有机酸含量变化

Fig.1 Changes of organic acid contents during fruit developing period

果实成熟期有机酸含量则一直维持在较低水平。

油桃果实中有机酸成分主要为苹果酸和柠檬酸,由图 1 可以看出,苹果酸含量变化趋势与总有机酸含量变化趋势相似。果实发育前期,有机酸的积累以苹果酸为主,于盛花后 49d 苹果酸含量达到最高值(0.98%),此后苹果酸含量随果实成熟逐渐下降。柠檬酸含量从盛花后 21d 至 63d 呈逐渐上升趋势,于盛花后 63d 达最高值(0.18%),盛花后 63d 至 77d,柠檬酸含量呈下降趋势,从 0.18% 降至 0.12%,下降了 33%。

## 2.2 果实发育过程中有机酸代谢相关酶活性变化

设施栽培油桃果实发育过程中有机酸代谢相关酶活性变化如图 2 所示。柠檬酸合酶(CS)活性于盛花后 21d 至 49d 呈先升高后降低趋势,从盛花后 49d 至果实成熟酶活性同样是先升高后降低,盛花后 35d 和盛花后 63d 是酶活性的两个高峰。酶活性的这种变化趋势与柠檬酸逐渐升高至果实成熟稍有下降的变化趋势并不吻合。苹果酸酶(ME)活性在果实发育初期(盛花后 21d 至 49d)酶活性变化不大,果实发育中后期(盛花后 49d 至 77d)酶活性迅

## 2 结果与分析

### 2.1 果实发育过程中有机酸含量变化

设施栽培“超红珠”油桃果实发育过程中有机酸含量变化如图 1 所示。有机酸含量呈先升高后降低趋势,果实近成熟时有有机酸含量降至与果实发育初期大致相当的水平,并维持在较低水平。果实发育初期(盛花后 21d 至 49d)为有机酸合成期,酸含量呈持续升高趋势,从 0.34% 上升至 1.07%,上升了 215%;果实发育中后期(盛花后 49d 至 70d)为有机酸转化降解期,酸含量随果实发育而逐渐降低,从 1.07% 降至 0.27%,下降了 75%;果

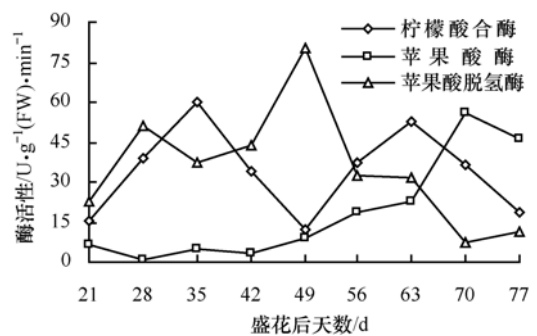


图 2 果实发育过程中有机酸代谢相关酶活性变化

Fig.2 Changes of organic acids-metabolizing enzymes activities during fruit developing period

速升高。苹果酸脱氢酶(MDH)活性于盛花后 21d 至 49d 呈逐渐升高趋势,只是盛花后 35d 时酶活性略有下降,盛花后 49d 酶活性达到最高值。盛花后 49d 至 70d 酶活性迅速下降至较低水平,果实成熟期酶活性变化不大。

### 3 讨 论

桃果实中的有机酸主要是苹果酸和柠檬酸。随着果实成熟,物质代谢与呼吸作用逐渐增强,果实含酸量下降。有机酸减少的原因主要是:果实增大、水分增加而产生的稀释作用,合成被抑制,部分酸转变为糖,部分酸被用于呼吸消耗,部分酸与  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  等阳离子结合生成盐<sup>[2,3]</sup>。酸的转化和降解是有机酸减少的主要原因,研究表明<sup>[4]</sup>,在整个发育期内,果实内都含有利用有机酸作为能量和转变为糖类所必须的酶,如 Roe<sup>[8]</sup>等在“哈姆林”甜橙汁细胞中测到了苹果酸酶、苹果酸脱氢酶、柠檬酸脱氢酶。在本试验中,“超红珠”油桃果实中有机酸的积累呈有规律的变化:第一阶段为有机酸合成期,有机酸含量随着果实的生长而迅速增加;第二阶段为有机酸转化降解期,酸含量迅速下降。苹果酸的含量与总酸含量变化呈极显著相关( $r=0.9937^{**}$ ),因此桃果实中有机酸的代谢主要是苹果酸的合成与降解。果实成熟时苹果酸与柠檬酸分别为总酸含量的 53% 和 42%,此时果实呈现出“超红珠”油桃特有的风味。“超红珠”油桃有机酸的积累规律,与文涛等<sup>[5]</sup>在脐橙上进行的有机酸积累规律研究结果相似。

果实中酸的合成与分解是一个复杂的生理过程,柠檬酸与苹果酸是三羧酸循环(TCA)的中间产物,其合成与降解均与 TCA 循环密切相关。Haffaker 和 Wallace<sup>[9]</sup>根据在“伏令夏橙”等果实上的研究结果,提出果实中柠檬酸的合成途径是:草酰乙酸(OAA)在 CS 的催化下与乙酰辅酶 A(Ac-CoA)结合生成柠檬酸。本试验中 CS 活性有两个高峰,但并没有引起柠檬酸的大量积累,第 1 个高峰可能与 TCA 循环较快有关,TCA 循环产能较多,保证了果实的迅速生长。桃为呼吸跃变型果实,果实发育后期的 CS 活性高峰与此时果实呼吸速率较高有关。这说明酶活性高并不一定引起有机酸积累,有机酸的积累还受其他因素的影响,如柠檬酸中柠檬酸的积累与 PEPC/NAD-IDH 高低有关<sup>[6,7]</sup>。

液泡中 NADH 浓度高时,在糖酵解中形成的磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)可不转变为丙酮酸,而是在 PEPC 催化下形成 OAA,OAA 在 MDH 作用下被还原为苹果酸,苹果酸可经线粒体内膜上的二羧酸传递体与无机磷酸(Pi)进行交换进入线粒体衬质,苹果酸在衬质中,可在 ME 的作用下脱羧形成丙酮酸,或在 MDH 的作用下生成 OAA,再进入 TCA 循环。“超红珠”油桃果实中苹果酸的积累与 MDH 活性变化密切相关( $r=0.8204^{**}$ ),但趋向 OAA 方向的 MDH 活性一直很低,故 MDH 的作用主要是合成苹果酸。本试验中果实发育中后期苹果酸含量与 ME 活性呈显著负相关( $r=-0.890^*$ ),苹果酸的转化与降解主要依赖 ME 活性的升高。在呼吸跃变型果实中,ME 活性的升高对有机酸降解起重要作用<sup>[7,10]</sup>,ME 活性升高的同时果肉的呼吸速率也迅速升高,出现一个呼吸峰。在苹果、梨、樱桃上也得到了同样的结论<sup>[7,10]</sup>。而 Masashi<sup>[7]</sup>研究表明,柑橘果实发育后期酸的降解与 ME 活性变化关系不大。说明桃等呼吸跃变型果实与柑橘类果实代谢方式不同。

由本试验可得出如下结论:“超红珠”油桃果实中有机酸的积累主要是苹果酸的积累,果实成熟时柠檬酸含量与苹果酸含量相差不大;苹果酸的合成与 MDH 活性有关,苹果酸的降解主要依赖于 ME 的催化作用。故成熟果实中有机酸的最终含量与前期有机酸合成、后期酸代谢及其他生理过程紧密相关。而抑制果实发育前期 MDH 活性,促进果实发育后期 ME 活性可降低果实酸含量,提高糖酸比。

### 参 考 文 献

- 1 薛应龙.植物生理学实验手册.上海:上海科技出版社,1985.179~181
- 2 潘瑞炽.植物生理学(第4版).北京:高等教育出版社,2001.102~150
- 3 B.B.布坎南,W.格鲁依森姆,R.L.琼斯.植物生物化学与分子生物学.北京:科学出版社,2004.547~588
- 4 罗安才,李道高,杨晓红.柑橘果实有机酸代谢研究进展.园艺学报,2001,28(增刊):597~602
- 5 文涛,熊庆娥,曾伟光,等.脐橙果实发育过程中有机酸合成代谢酶活性的变化.园艺学报,2001,28(2):161~163
- 6 罗安才,杨晓红,邓英毅,等.柑橘果实发育过程中有机酸含量及相关代谢酶活性的变化.中国农业科学,2003,36(8):941~944
- 7 Masashi Hirai M., Ueno I. Development of citrus fruits: Fruit development and enzymatic changes in juice vesicle tissue. Plant & Cell Physiol., 1977, 18(4):791~799
- 8 Roe B., Davis P.L., Bruemmer J.H. Pyruvate metabolism during maturation of Hamlin oranges. Phytochemistry, 1984, 23(4):713~717
- 9 Haffaker R.C., Wallace A. Dark fixation of CO<sub>2</sub> in homogenates from citrus leaves, fruits, and roots. Pro. Amer. Soc. Hort. Sci., 1959, 74:348~357
- 10 Hulme A.C., Rhodes M.J.C. Pome fruits. The Biochemistry of Fruits and Their Products. New York: Academic Press Inc., 1971. 333~373