

晚熟脐橙果实发育过程中抗坏血酸含量及相关酶活性的变化

黄艳花^{1,2}, 曾明^{1,*}, 王玲利^{1,2}, 苏芳芳^{1,2}, 李兴发^{1,2}

¹西南大学园艺园林学院, 重庆400716; ²南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆400716

摘要: 以‘鲍威尔’脐橙为试材, 研究了果实发育期间果皮和果肉中抗坏血酸(AsA)含量及相关酶活性的变化。结果表明, 果皮中总抗坏血酸(T-AsA)和AsA含量显著高于果肉, 且在发育期间T-AsA和AsA的变化趋势一致; 果皮中L-半乳糖内酯脱氢酶(GalLDH)活性与T-AsA和AsA积累速率的变化趋势基本一致, 呈显著正相关关系, 而在果肉中的变化趋势却不明显; 在发育过程各阶段中果皮的抗坏血酸氧化酶(AAO)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)和单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)活性均高于果肉; 相关性分析显示, 果皮中AsA含量积累主要取决于GalLDH活性, 而果肉中AsA含量水平可能取决于AsA的再生循环系统。

关键词: ‘鲍威尔’脐橙; 果皮; 果肉; 抗坏血酸; 酶活性

Changes in Ascorbic Acid Contents and Related Enzyme Activities during Fruit Development of Late-Maturing Navel Orange

HUANG Yan-Hua^{1,2}, ZENG Ming^{1,*}, WANG Ling-Li^{1,2}, SU Fang-Fang^{1,2}, LI Xing-Fa^{1,2}

¹School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China; ²Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Chongqing 400716, China

Abstract: In this research, ascorbic acid (AsA) content and enzyme activities in peel and pulp of navel orange (*Citrus sinensis* cv. ‘Powell’) were investigated during fruit development. The results showed that total AsA (T-AsA) and AsA contents in peel were higher than those in pulp, the accumulation of T-AsA and AsA during fruit development showed a similar tendency. In peel, the variation of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity coincided with the accumulation rates of T-AsA and AsA, and presented significant positive correlation between the GalLDH activity and AsA accumulation rate, while in pulp, GalLDH activity almost kept constantly during fruit development. The activities of ascorbic acid oxidase (AAO), ascorbate peroxidase (APX), dehydroascorbate reductase (DHAR) and monodehydroascorbate reductase (MDHAR) in the peel were higher than those in the pulp during fruit development. Correlation analysis indicated that the AsA concentration in the peel was mainly determined by GalLDH activity, but in the pulp the AsA content may depend on the regulation of AsA regeneration capacity.

Key words: ‘Powell’ navel orange; peel; pulp; ascorbic acid; enzyme activity

抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)即维生素C, 是生物体内普遍存在的一类己糖内酯化合物, 参与整个生长发育过程, 是人体必需的营养素, 但由于人类缺乏合成AsA的关键酶, 因而只能从食物中获得。已有的研究表明, 植物可能有4种不同的AsA生物合成途径, 但L-半乳糖途径是公认的高等植物合成AsA的主要途径。在该途径中, L-半乳糖内酯脱氢酶(L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase, GalLDH)直接催化L-半乳糖内酯形成AsA, 对AsA合成起关键作用(Li等2008)。在抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)和抗坏血酸氧化酶(ascorbic acid oxidase, AAO)催化作用下, AsA被氧

化成不稳定的单脱氢抗坏血酸(monodehydroascorbate, MDHA), 再经过非酶歧化反应形成脱氢抗坏血酸(dehydroascorbate, DHA), 其中, DHA和MDHA分别可通过脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)和单脱氢抗坏血酸还原酶(monodehydroascorbate reductase, MDHAR)还原为AsA而得以再生, 这4种酶的活性高低影响着AsA的含量。柑橘果实富含AsA, 是人们获取AsA的重要食物来源(Taylor等2000)。不同柑橘品

收稿 2014-01-16 修定 2014-05-16

* 通讯作者(E-mail: zengming@swu.edu.cn; Tel: 023-68251158)。

种中维生素C含量不同,甜橙含量最丰富,为 $0.35\sim 0.7\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (果汁),其次是柠檬、红橘等(鲍江峰等2005)。柑橘果实中油胞层维生素C含量最高,白色层其次,囊衣和橘络位居第三(肖晓梅2007)。已有研究表明,随着甜橙果实的成熟,总抗坏血酸(total ascorbic acid, T-AsA)和AsA含量总体上表现为“下降-上升-下降”的过程(黄仁华2007),而‘纽荷尔’脐橙AsA含量呈现一个波动性的增加和减少过程。谢金霞(2010)研究发现, GalLDH活性可能是影响柑橘果皮AsA含量的一个主要因素;而果肉中的AsA含量与GalLDH活性关系却不明显,表明不同组织间AsA的积累机制不同。本试验以‘鲍威尔’晚熟脐橙为试材,通过测定和分析果实成熟期间果皮和果肉中AsA含量及相关代谢酶活性的变化,探讨不同组织中AsA含量变化及差异的生化机制,以期为进一步研究柑橘AsA积累机制奠定基础。

材料与方 法

1 植物材料

供试材料为八年生‘鲍威尔’脐橙(*Citrus sinensis* L. Osbeck. cv. ‘Powell’),种植于重庆长寿区恒河集团果园。采取单株取样,选择树势基本一致的3棵树作为3次重复。于2012年11月中旬至2013年2月下旬每隔20 d采样,每次采样时按树冠外围同一高度随机采取6~8个果实,迅速分离果皮和果肉,在液氮中研磨混匀后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内,用于AsA含量和各种酶活性的分析测定。

2 测定方法

2.1 T-AsA、AsA和DHA含量

AsA含量的测定参考Kampfenkel等(1995)的 Fe^{3+} 还原法。称取3 g果肉或1 g果皮,加入含 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA的6%三氯乙酸(TCA),于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下研磨成浆,定容至8 mL,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12000\times g$ 离心10 min,收集上清液用于AsA和T-AsA含量的测定。以上操作均在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下进行。DHA含量为T-AsA和AsA含量的差值。

2.2 GalLDH活性

GalLDH活性测定参考安华明等(2005)的方法并略作调整。取3 g果肉或1 g果皮,加入8 mL预冷的 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.4,含 $0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗

糖、10%甘油、 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 巯基乙醇、 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA、2% PVP),研磨成匀浆;匀浆液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $500\times g$ 离心20 min后收集上清液,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12000\times g$ 离心15 min;沉淀用3 mL含10%甘油和 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH的Tris-HCl ($50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8.0)缓冲液悬浮,即为待测酶液。2.5 mL反应体系中含有2 mL $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 8.0,含 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 细胞色素C)、0.4 mL $4.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的L-半乳糖酸-1,4-内酯和0.1 mL酶液。测定前先将反应混合液于 $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预温1 min,反应从加入L-半乳糖酸-1,4-内酯后开始计时。于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下测定550 nm处的吸光度,以每分钟吸光度值变化0.01为1个酶活力单位。

2.3 AAO、APX、DHAR、MDHAR活性

取3 g果肉或1 g果皮,加入10 mL预冷的 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.0,含 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ AsA、 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA、2% PVP、0.25% Triton X-100)研磨,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $16000\times g$ 离心20 min,上清液即为酶液。

AAO活性的测定参照Esaka等(1990)的方法:取0.12 mL酶液,加入3 mL含2.88 mL磷酸缓冲液(pH 7.0,含 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ AsA)的反应液,以不加酶液为对照,记录 OD_{290} 的变化。APX、DHAR、MDHAR活性测定参照De Pinto等(1999)的方法并略有修改。测定APX活性时,取0.12 mL酶液,加入2.49 mL $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲液(pH 7.0,含 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ AsA)和0.39 mL $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 ,以不加酶液为对照,记录 OD_{290} 的变化。测定DHAR活性时,取0.3 mL酶粗液,加入2.1 mL $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.0)、0.3 mL $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH和0.3 mL $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DHA,以不加酶液为对照,记录 OD_{265} 的变化。测定MDHAR活性时,取0.09 mL酶粗液,加入2.7 mL $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲液(pH 7.0,含 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ AsA)、0.12 mL AAO (pH 5.6,含2 U AAO)和0.09 mL $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NADPH (pH 7.6),以不加酶液为对照,记录 OD_{340} 的变化。

以上操作均在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下进行。以1 min内吸光值变化0.01定义为1个酶活力单位,结果以 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (FW)表示。

3 数据统计分析

上述各指标测定均重复3次,取平均值代表其指标值,采用SPSS 19.0软件One-Way ANOVA和Correlate过程进行差异显著性和相关性分析。

实验结果

1 ‘鲍威尔’脐橙果实中T-AsA、AsA和DHA含量的积累

由图1可知, ‘鲍威尔’脐橙果皮和果肉中T-AsA含量的变化趋势明显不同, 但无论果皮还是果肉中AsA的变化趋势均与T-AsA含量的变化趋势基本一致。在果皮中, T-AsA和AsA含量随着果实的成熟显著增加, 至果实采收前达到最大值, 随后有所降低; DHA含量在果实转色期变化较平稳, 于12月5日达到最低值后迅速上升, 至1月15日达到最大值 $13.73 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW), 随后降低(图1-A)。而在果肉中, T-AsA和AsA含量均呈“M”形变化趋势, 分别在12月5日和2月5日达到峰值; DHA含量在果实转色期达到最大值, 随后有所降低并保持含量相对平稳(图1-B)。

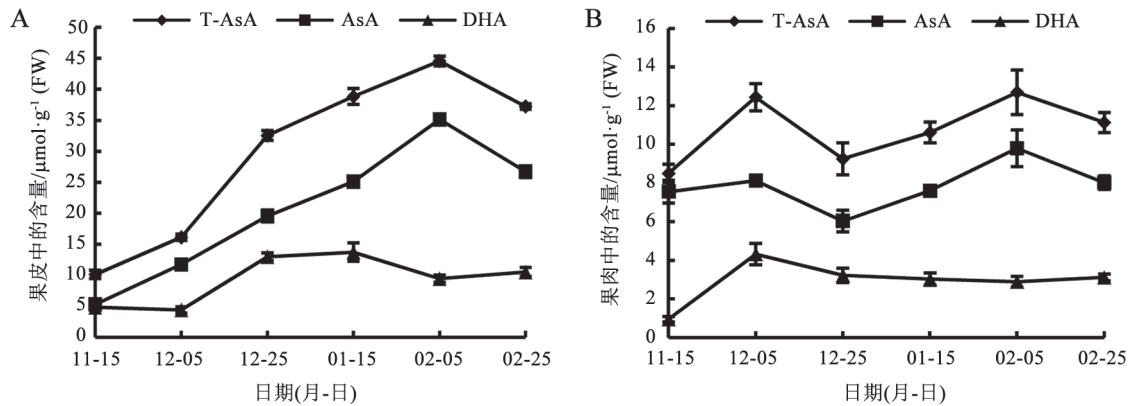


图1 ‘鲍威尔’脐橙果皮和果肉中T-AsA、AsA和DHA含量的变化

Fig.1 Changes in T-AsA, AsA and DHA contents in the peel and pulp of ‘Powell’ navel orange

误差线代表 $P<0.05$ 显著水平下的标准差($n=3$); 图2~4同此。

2 ‘鲍威尔’脐橙果实发育过程中APX和AAO活性的变化

‘鲍威尔’果实中不同组织的AAO和APX活性变化差异较大, 果皮中APX活性随着果实发育逐渐增加, 至1月15日达到最大值后逐渐降低; AAO活性呈“上升-下降-上升”的变化趋势, 至果实成熟时保持相对稳定(图2-A)。而在果肉中, APX活性呈“M”形变化趋势, 分别在12月5日和1月5日达到峰值, 至果实成熟时其活性显著降低; AAO在初熟期变化较平稳, 随后呈波动性的增加和减小(图2-B)。比较果皮和果肉中APX和AAO活性可知, 果皮中的APX和AAO活性均显著高于果肉中的, 且相同时期APX的活性显著高于AAO。

3 ‘鲍威尔’脐橙果实发育过程中DHAR和MDHAR活性的变化

由图3-A可看出, 果皮中DHAR活性呈先上升

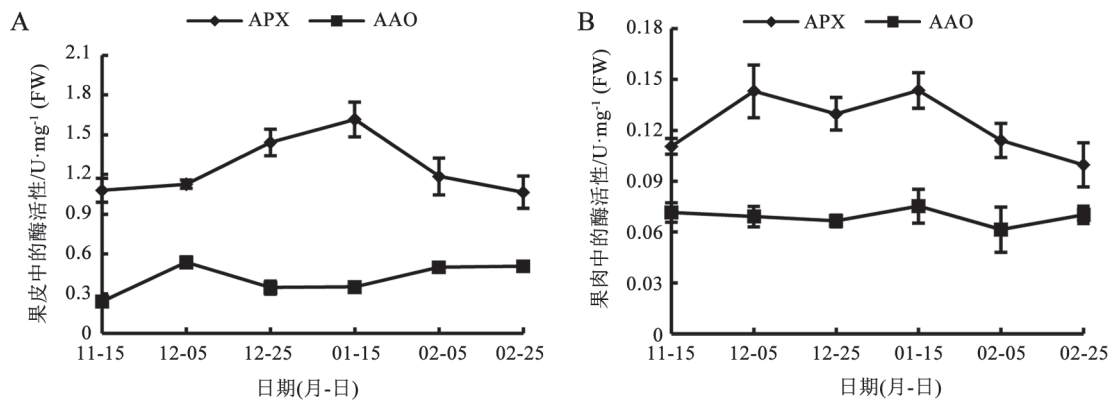


图2 ‘鲍威尔’脐橙果皮和果肉中APX和AAO活性的变化

Fig.2 Changes in APX and AAO activities in the peel and pulp of ‘Powell’ navel orange

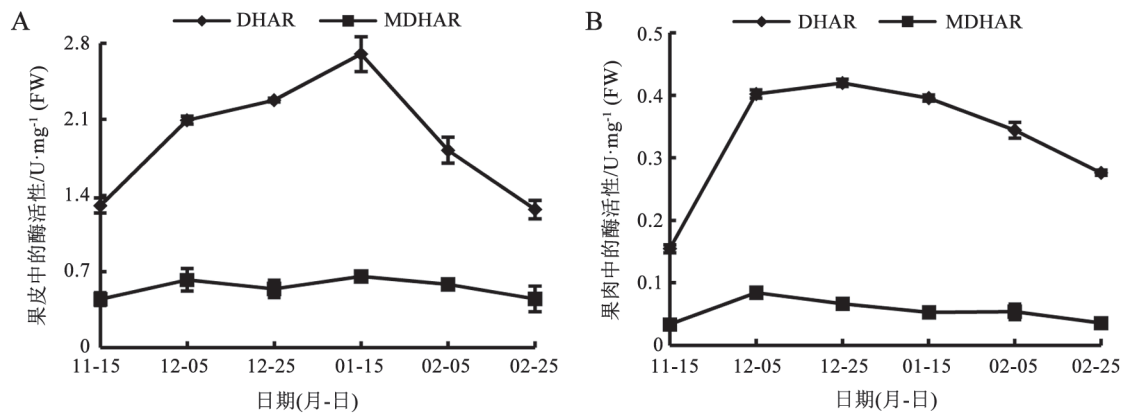


图3 ‘鲍威尔’脐橙果皮和果肉中DHAR和MDHAR活性的变化

Fig.3 Changes in DHAR and MDHAR activities in the peel and pulp of ‘Powell’ navel orange

后下降的变化趋势,于1月15日达到最大值后显著降低至果实成熟;而MDHAR活性在果实成熟过程中变化较平稳。在果肉中,DHAR活性在果实转色期显著增加,于12月5日达到最大值后逐渐下降至果实成熟;而MDHAR活性整体呈下降趋势(图3-B)。无论在果皮还是果肉中,DHAR活性均显著高于MDHAR活性;在相同时期,果皮中DHAR和MDHAR活性均显著高于果肉中的,果皮中再生酶DHAR和MDHAR的高活性有利于AsA含量的积累,可能是导致果皮AsA含量高于果肉的一个原因。

4 ‘鲍威尔’脐橙果实发育过程中GalLDH活性的变化

GalLDH作为参与AsA合成的最后一个酶,直接催化半乳糖内酯形成AsA。由图4可知,在果实采收期,果皮和果肉中的GalLDH活性均不高,这

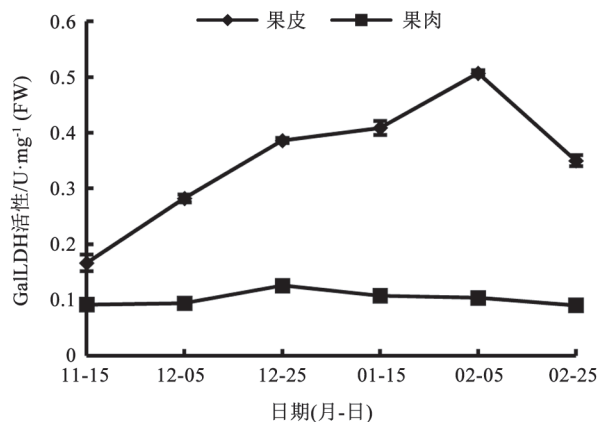


图4 ‘鲍威尔’脐橙果皮和果肉中GalLDH活性的变化

Fig.4 Changes in GalLDH activity in the peel and pulp of ‘Powell’ navel orange

与采收期AsA的含量降低一致。果皮中GalLDH活性随着果实的发育逐渐上升,于果实成熟期(2月5日)达到最大值,随后迅速降低;而果肉中GalLDH活性呈先上升后下降的趋势。果皮中GalLDH活性显著高于果肉中,这可能是果皮AsA含量高于果肉的原因之一。

讨 论

本试验研究了‘鲍威尔’晚熟脐橙果实发育期间AsA含量的变化。结果表明,在果实发育后期,果皮中T-AsA和AsA含量随着果实的成熟而显著增加,表明果皮AsA含量的积累主要发生在果实成熟期,并于采收前达到最大值,这可能与果实中糖酸的变化有关,因此AsA与糖酸的关系有待进一步研究。无论在果皮还是在果肉中,AsA含量均显著高于DHA含量,说明在脐橙果实中,AsA是抗坏血酸存在的主要形式。此外,果皮中T-AsA、AsA和DHA的含量均高于果肉,可能与果皮中的高活性AsA代谢酶有关。这与‘纽荷尔’脐橙和宽皮柑橘的结果一致(谢金霞2010)。而该结果的产生可能是由于果皮作为果实和外界环境间的接触面,长期遭受着生物或非生物的胁迫过程所致(He和Liu 2007)。

本研究结果表明,果皮中T-AsA和AsA含量与GalLDH活性呈显著正相关($r_1=0.7469$, $r_2=0.7408$, $P<0.05$),说明GalLDH活性是影响果皮AsA含量的一个主要因素,这与在刺梨(安华明等2007)和猕猴桃(侯长明等2009)中的研究结果一致。此外,DHA与GalLDH活性也呈正相关($r=0.5515$, $P<0.05$),这

是由于GalLDH通过提高T-AsA含量而间接促进了DHA含量的增加。分析酶活性与AsA的相关性时发现, APX和AAO活性与AsA含量均呈正相关($r_1=0.1268$, $r_2=0.4070$, $P<0.05$), 表明APX和AAO可能不是影响果皮AsA含量的主要因素。DHAR与MDHAR呈显著正相关($r=0.6872$, $P<0.05$), 说明AsA再生酶可能随着一种酶活性的变化而相应变化, 这与在苹果中的研究结果一致(马春花等2007)。

对果肉中AsA含量和相关酶的相关性分析可见: GalLDH和AAO与AsA含量没有显著的相关性, 而APX与AsA含量呈弱负相关, 与DHA则成一定的正相关($r=0.3979$, $P<0.05$), 表明APX可能是促进AsA转化为DHA的因素之一。DHAR和MDHAR均与AsA含量呈微弱的负相关, 而与DHA含量呈正相关($r_1=0.7935$, $r_2=0.7321$, $P<0.05$), 表明DHAR和MDHAR不是影响果肉AsA含量的主要因素。综上所述, 果皮和果肉在发育过程中AsA含量的积累模式和影响因素各不相同, 在今后的研究工作中可通过分子调控进一步阐明。

参考文献

- 安华明, 陈力耕, 樊卫国, 刘庆林(2005). 刺梨果实中维生素C积累与相关酶活性的关系. 植物生理与分子生物学学报, 31 (4): 431~436
- 安华明, 陈力耕, 樊卫国, 刘庆林(2007). 刺梨果实和叶片发育过程中抗坏血酸和抗氧化酶的协同变化. 园艺学报, 34 (5): 1293~1296
- 鲍江峰, 夏仁学, 邓秀新, 彭抒昂, 刘永忠, 马湘涛, 张红艳(2005). 湖北省纽荷尔脐橙果实品质状况的研究. 武汉植物学研究, 23 (6): 583~587
- 侯长明, 李明军, 马锋旺, 梁东, 杜国荣(2009). 猕猴桃果实发育过程中AsA代谢产物积累及相关酶活性的变化. 园艺学报, 36 (9): 1269~1276
- 黄仁华(2007). 甜橙果实抗氧化特性及水杨酸对其影响的研究[博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学
- 马春花, 马锋旺, 李明军, 韩明玉, 束怀瑞(2007). 不同叶龄苹果叶片抗坏血酸含量与其代谢相关酶活性的比较. 园艺学报, 34 (4): 995~998
- 肖晓梅(2007). 福建脐橙新品种引进及适应性调查研究[硕士学位论文]. 福州: 福建农林大学
- 谢金霞(2010). 柑橘果实发育过程中抗坏血酸积累及相关酶活性的分析[硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学
- De Pinto MC, Francis D, De Gara L (1999). The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells. Protoplasma, 209: 90~97
- Esaka M, Hattori T, Fujisawa K, Sakajo S, Asahi T (1990). Molecular cloning and nucleotide sequence of full-length cDNA for ascorbate oxidase from cultured pumpkin cells. Eur J Biochem, 191: 537~541
- He XJ, Liu RH (2007). Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity. J Agric Food Chem, 55: 4366~4370
- Kampfenkel K, Van Montagu M, Inzé D (1995). Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. Analyt Biochem, 225: 165~167
- Li MJ, Ma FW, Zhang M, Pu F (2008). Distribution and metabolism of ascorbic acid in apple fruits (*Malus domestica* Borkh cv. Gala). Plant Sci, 174: 606~612
- Taylor CA, Hampl JS, Johnston CS (2000). Low intakes of vegetables and fruits, especially citrus fruits, lead to inadequate vitamin C intakes among adults. Eur J Clin Nutr, 54: 573~578