

## 鳳梨酵素於鳳梨全株及低溫逆境下之活性表現

莊 芑 詠<sup>1)</sup> 陳 京 城<sup>2)</sup>

關鍵字：鳳梨、寒害、鳳梨酵素

**摘要：**本研究調查鳳梨植株各器官與不同部位之鳳梨酵素活性及植株寒害反應與鳳梨酵素之相關性。試驗結果顯示，器官間之鳳梨酵素活性以莖部最高、果肉次之、果梗最低；比活性方面以果肉最高、葉片最低。不同葉片部位則以葉基最高、葉尖次之。果實中鳳梨酵素活性以外果肉最高，果心活性最低；比活性以果皮最低，果肉最高。低溫逆境下，植株耐寒性表現因品種不同而有所差異，盆苗與組培苗中分別以'台農 13 號'及'台農 20 號'最為耐寒，然鳳梨酵素活性在盆苗、組培苗與寒害指數間均無顯著相關性，推測可能另有其他影響寒害耐性表現之重要因子，例如調節鳳梨酵素活性之朊抑素，此有待進一步研究。

### 前 言

鳳梨(*Ananas comosus* L. Merr.)是目前世界上最重要的熱帶果樹之一。鳳梨為對低溫較為敏感之作物，在亞熱帶地區栽培時冬天低溫可能導致寒害發生。而在果實採後貯運期間為了延緩老化及降低失水，經常利用低溫(7-12°C)、高濕(90-95%)的環境貯藏，然而許多栽培品種在12°C以下貯藏1-3週便會出現果實內部褐化(internal browning, IB)的寒害徵狀(Luengwilai *et al.*, 2016)，又稱為黑心病(Blackheart)。由於該生理劣變無法由外觀判別進行選別淘汰，嚴重影響商品價值及商家信譽。臺灣鳳梨主要的栽培品種'台農17號'果實大、總可溶性固形物含量高、總可滴定酸低、肉質細嫩，然對低溫較為敏感，經4-12°C貯藏1-2週後儲架4天便容易發生果實內部褐化(曾，2013；簡，2017)，不利於鮮果外銷。

鳳梨植株中以富含鳳梨酵素(Bromelain)聞名，目前已知由Fruit bromelain與Stem bromelain兩種半胱氨酸蛋白酶為主要成分(Maurer, 2001)。Raimbault等人(2013)發現耐寒品

---

1)國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2)國立中興大學園藝學系助理教授，通訊作者。

種'MD2'於低溫貯藏後，其Bromelain基因表達下降程度較不耐寒品種'Smooth Cayenne'為高，而Bromelain抑制劑(pineapple cystatin, 朧抑素)的基因AcCYS1表達則相反，因此推測不同鳳梨品種之耐寒性差異可能與鳳梨酵素活性有關。本研究調查鳳梨全株各部位之鳳梨酵素活性，並透過低溫處理盆苗及組培苗，調查植株寒害情形並進行鳳梨酵素活性分析，期能更進一步瞭解鳳梨酵素與低溫逆境下寒害發生之相關性。

## 材料與方法

### 試驗一、鳳梨植株不同器官組織之鳳梨酵素活性分布

#### (一)試驗材料

1. 全植株不同器官—使用於臺中市霧峰區國立中興大學園藝試驗場露天栽培的'台農17號'(TN17)鳳梨植株。於2020年10月進行催花，4月下旬果實全黃期採收，採收當日運回實驗室進行取樣。每株為1重複，共5重複。將植株洗淨後依器官分為果實、果梗、莖、葉、根等5個部位分別秤重，果實再細分為冠芽、果皮、果肉、果心等四個部分。全株各部位取中段部位切成1-2 cm<sup>3</sup>大小後迅速以液態氮冷凍，保存於-20°C下備用。各部位取樣方式如下：
  - (1)冠芽：將冠芽上之葉片以螺旋的順序剝下後分別剪成1-2 cm<sup>2</sup>大小，短縮莖則切成1 cm<sup>3</sup>小之方塊，兩者以1:1 (w/w)均勻混合而成。
  - (2)果實：取自果實中段部位，由內而外分成三區塊，圓柱體中心部位是果心，中間含水量較高是為果肉，自果肉向外包含閉合的苞片是為果皮。
  - (3)果梗：取中段50g左右切成1 cm<sup>3</sup>小之方塊。
  - (4)莖：剝除葉片後留存之地上部短縮莖取中段部位50 g左右切成1 cm<sup>3</sup>小之方塊。
  - (5)葉：取葉長最長的成熟葉(D葉)共5-6片，取中段部位剪成1-2 cm<sup>2</sup>大小。
  - (6)根：取全部鬚根剪碎至約1 cm左右長度。
2. 葉片中不同部位—使用取自臺中市霧峰區國立中興大學園藝試驗場的'TN17'鳳梨植株。為2020年3月定植之吸芽苗，2020年10月採樣。葉片採樣時機為成熟未開花植株，採其最長葉(D葉)共4片進行取樣，每一植株做為1重複，共5重複。將葉片洗淨後由尖端至基部切分為四個部分(修改自Sideris *et al.*, 1938)：綠色段尖端(Chlorophyllous-terminal, CT)、綠色段中部(Chlorophyllous-intermediate, CI)、綠色段基部(Chlorophyllous-low, CL)、基部白色部位(Basal white tissue, BW)，分別取其中段部位15 g切成1 cm<sup>2</sup>大小並立即以液態氮冷凍貯藏於-20°C下備用，待後續酵素測定使用。
3. 果實中不同部位—材料為12月初採收之冬果，選購自臺中市水果攤販售之'TN17'鳳梨果實，採收至採樣當日間隔約5天，轉色程度接近1/5，每一果實為1重複，共5重複。將果實洗淨後切下冠芽，冠芽分三部分：葉尖端、葉基部、短縮莖，葉片切至1 cm<sup>2</sup>而短縮

莖則剝碎至1 cm<sup>3</sup>大小。果實先分成上、中、下三段，每段再由內而外分成：果心、內果肉、外果肉、果皮等四部分，整顆果實包含冠芽總共分為十五個部分。取下之樣品以液態氮急速冷凍貯存於-20°C下備用，待後續酵素測定使用。

## (二)試驗方法

### 1. 鳳梨酵素(Bromelain)活性分析

#### (1) 酵素液萃取

分別秤取2.5 g樣品以液態氮在研鉢內磨碎，加入10 ml 0.1M緩衝液[Sodium phosphate buffer (pH=7)，含0.1% polyvinyl polypyrrolidone (PVPP)及0.1% Triton X-100]，均質2分鐘後以4層紗布過濾，並以12,000× g離心30分鐘(4°C下)後，取上清液即為酵素萃取液，萃取過程均於4°C冰浴中進行。萃取方法修改自簡(2017)。

#### (2) Bromelain活性測定(Casein digest unit method, CDU)：

##### A. 針對活性較低部：葉片/果梗/果心/根

需進行酵素萃取液濃縮，取出上清液後使用去鹽過濾濃縮管(Amicon Ultra-15: 10,000 MWCO, Merck Millipore)濃縮酵素液，以3500× g離心40分鐘(4°C)至2 ml以下，濃縮後之樣品以S.P. buffer定量至2 ml。反應時取2.0 ml緩衝液(sodium phosphate buffer, pH=7，不含PVPP及Triton) 加入2.5 ml 1.2%酪蛋白溶液作為反應溶液，與0.4 ml濃縮酵素液於37°C下反應10分鐘後加入1 ml 10% TCA (Trichloroacetic acid, SIGMA)以停止反應，0 min對照組則在加入酵素液前即先行加入1 ml 10% TCA。

##### B. 針對活性較高部位：冠芽/果皮/果肉/莖

不須經酵素濃縮，反應時取2.0 ml緩衝液(sodium phosphate buffer, pH=7，不含PVPP及Triton) 加入2.5 ml 1.2%酪蛋白溶液作為反應溶液，與0.2 ml酵素萃取液於37°C下反應10分鐘後加入1 ml 10% TCA (Trichloroacetic acid, SIGMA)以停止反應，0 min對照組則在加入酵素液前即先行加入1 ml 10% TCA。

A.B.反應結束之樣品以11,000× g常溫離心10分鐘(25°C)，取其上清液測定波長275 nm吸光值(Spectrophotometer, Thermo Scientific GENESYS150)。標準定量曲線(standard)由酪胺酸(L-Tyrosine, SIGMA)配製。活性單位：unit/g fw, 1 unit=1 µg tyrosine released/min。比活性：unit/mg protein。分析方法修改自簡(2017)。

### 2. 總蛋白質含量分析

(1) 染劑配置：精秤100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (SIGMA)並使之完全溶解於50 ml 95%乙醇中，接著加入100 ml磷酸(phosphoric acid, 85%, SIGMA)，以純水定量至1 L後經Whatman No.1濾紙過濾，濾液裝入遮光玻璃瓶，保存於4°C冰箱中備用。

(2) 測定方法：取0.06 ml酵素液(同1.(1)之酵素萃取液)與3 ml染劑反應2分鐘後測定595 nm波長之吸光值。以小牛血清蛋白(Bovine serum albumin, BSA, SIGMA)配製標準定量曲線。單位：mg protein/g fw。修改自Bradford (1976)。

### 3. 數據統計分析

本試驗之數據以SAS (Statistic Analysis System) Enterprise Guide 7.1軟體進行ANOVA分析，事後比較以最小顯著差異法(Least significant difference test, LSD)比較處理間之差異顯著性，顯著水準為5%。

### 試驗二、不同品種鳳梨盆苗在低溫逆境下之鳳梨酵素活性分析

#### (一)試驗材料

本試驗使用之鳳梨植株包含'台農11號'(TN11；香水鳳梨)、'台農13號'(TN13；冬蜜鳳梨)、'台農17號'(TN17；金鑽鳳梨)、'台農20號'(TN20；牛奶鳳梨)及'MD2'等5個品種。盆苗由組織培養方式繁殖。瓶苗生長至10-12 cm高時出瓶，移植至網室中生長，植株生長至株高50-60 cm時進行試驗。

#### (二)試驗方法

##### 1. 試驗處理

試驗進行前，盆苗先由網室移往實驗室進行馴化2天(25±2°C, 70% RH)，使用全光譜LED植物燈架栽培(光度10000 lux, 日夜長12/12 hr)，低溫試驗開始時將燈架及植株移至走入式生長箱(85-90% RH)，於低溫逆境下(日夜溫10/5°C)生長5天後取出，移回原實驗室(25±2°C, 70% RH)進行2天回溫恢復期。葉片取樣時間分別為馴化後2天(0 day, 0d)、低溫處理5天(low temperature 5 days, LT5d)、處理後回溫2天(room temperature 2 days, LT5d+RT2d)共3個採樣點，取D葉中段切成1 cm<sup>2</sup>大小均勻混和，以液態氮急速冷凍，貯藏於-20°C下備用，待後續酵素測定使用。每個盆苗為一重複，每個採樣時間點共取3重複。

2. 調查寒害指數(Chilling injury index)：(D葉之寒害面積/D葉之總葉面積)×100%。

Index	Chilling area (%)	Index	Chilling area (%)
0	0	5	51-70
1	1-4	6	71-85
2	5-15	7	86-96
3	16-30	8	97-100
4	31-50		

##### 3. Bromelain活性、總蛋白質含量分析

Bromelain活性分析方法同試驗一A，總蛋白質含量分析方法同試驗一。

### 試驗三、不同品種組培瓶苗在低溫逆境下之生長情形與鳳梨酵素活性分析

#### (一)試驗材料

本試驗使用之鳳梨組培瓶苗包含'台農4號'(TN4；釋迦鳳梨)、'TN17'、'TN20'及'MD2'等4個品種。組培瓶苗生產步驟如下：

1.初代組培瓶苗培養：將冠芽葉片以螺旋方式剝除乾淨使休眠腋芽露出，以1%次氯酸鈉(sodium hypochlorite)添加0.1% Tween-20之溶液於超音波震盪器消毒15分鐘，進無菌操作台內以無菌水清洗三次後，切下芽體定植於生長培養基，基礎生長培養基配方為1/2 MS (Murashige and Skoog Basal Medium, SIGMA)、0.3% Sucrose、0.8% agar，pH調整至5.8。瓶苗培養於溫度 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光度2,500-3,000 lux、光週期16/8(日/夜)的培養室中。

2.瓶苗增殖：組培瓶苗生長至8-10 cm高時進行繼代增殖培養，切除植株末端葉片並剝除外層葉片，僅保留2-3 cm植體培養於促進腋芽增生之增殖培養基，增殖培養基配方為基礎生長培養基(同初代培養)添加生長調節劑0.2 ppm NAA (naphthaleneacetic acid)及2 ppm BA (6-benzyladenine)，pH值5.8。培養於溫度 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光度2,500-3,000 lux、光週期16/8(日/夜)的培養室。4-5個月後莖基部增生大量體胚或芽團組織，將其切為 $0.5-1\text{ cm}^3$ 大小培植於基礎生長培養基(同初代培養)使芽體抽出，約3-5個月後分株，瓶苗株高達8-10 cm時可重複步驟2.進行增殖，直至獲得足量瓶苗以進行試驗。組培瓶苗生產方法參考自吳(2016)。

## (二)試驗方法

### 1.試驗處理

分株小苗生長3-4個月後，取株高8-10 cm、根系完整之瓶苗進行試驗。將瓶苗培養於於走入式低溫生長箱中之LED植物燈架，以溫度 $8/4^{\circ}\text{C}$  (光週期12 hr)、光度5,000-6,000 lux之環境培養。分別於6個時間點進行取樣：試驗起始日(CK1)、低溫處理2週(2w)、低溫2週取出回溫4天(2w+4d)、低溫4週(4w)、低溫4週取出回溫4天(4w+4d)、常溫32天(CK2)，取出瓶苗後測量鮮重、調查寒害情形。

### 2.生長狀況調查

(1)植株鮮重(g)：每瓶五株瓶苗的平均重量。

(2)寒害葉片百分率(%)：(寒害葉片數/總葉片數) $\times 100\%$ 。

(3)寒害指數(Chilling injury index)：(全株寒害葉面積/全株總葉面積) $\times 100\%$ 。

Index	Chilling area (%)	Index	Chilling area (%)
0	0	6	51-60
1	1-10	7	61-70
2	11-20	8	71-80
3	21-30	9	81-90
4	31-40	10	91-99
5	41-50	11	100

### 3.Bromelain活性分析

同樣依1:4稀釋倍率萃取，秤取1 g樣品加入4 ml 0.1M緩衝液。緩衝液配方及萃取方法同試驗一Bromelain活性分析之B方法進行反應。

#### 4.總蛋白質含量分析

萃取液稀釋1倍進行分析，分析方法同試驗一。

## 結 果

### 試驗一、鳳梨植株不同器官組織之鳳梨酵素活性分布

不同器官酵素活性之差異，總蛋白質含量以莖部最高達7.22 (mg·gfw)，冠芽次之(6.11)並顯著高於葉片(5.09)，含量最低者為果肉(1.09)與果心(0.52)。Bromelain活性方面，同樣以莖部最高為416.02 (units/g fw)，果肉(134.67)次之，葉片、根部及果梗活性最低，介於2.66-10.94之間。Bromelain比活性以果肉最高達150.49 (units/mg protein)，其具有全株第二高的Bromelain活性與最低的總蛋白質含量，莖部(57.9)與果心(56.56)之比活性則次之，比活性較低之果皮(20.88)、冠芽(14.89)、果梗(2.06)、根部(2.00)及葉片(1.98)間無顯著差異(表1)。

葉片不同部位鳳梨酵素活性之差異，總蛋白質含量方面，由葉片尖端至基部呈下降趨勢，含量分別為7.50、5.68、3.49、2.01 (mg/g fw)。Bromelain活性以基部白色部位顯著最高(12.43 units/g fw)，綠色部位則由葉尖至葉基逐漸下降，活性範圍介於3.55-6.90之間。Bromelain比活性以基部白色部位(6.06 units/mg protein)顯著高於綠色部位，綠色部位之活性範圍落在0.83-1.04間，三者間並無顯著差異(表2)。

果實不同部位鳳梨酵素活性之差異，冠芽的葉尖部位具有整顆果實中最高的總蛋白質含量5.84 (mg/g fw)，顯著高於下方可食用部位整體。Bromelain活性方面以冠葉葉尖161.83 (units/g fw)與短縮莖(145.37)顯著較葉基部(6.04)為高，比活性方面果冠三部位間無顯著差異。果實中，果心至果皮的總蛋白質含量由內而外逐漸上升，尤以果皮顯著最高(mg/g fw)。不同組織間總蛋白質含量的上下分布僅果皮具顯著差異，上部果皮(4.51 mg·gfw-1)顯著高於中部果皮(3.34)，而與基部果皮(3.82)無顯著差異。Bromelain活性以果肉組織顯著高於果心與果皮組織，其中上部外果肉活性高達432.12 (units/g fw)，顯著高於其他所有部位，不同組織間的Bromelain活性上下分布僅果心具顯著差異，由上到下呈逐漸降低的趨勢。Bromelain比活性由果心往外漸升至外果肉部位時最高，而至果皮則下降。不同組織間的Bromelain比活性上下分布僅果皮具顯著差異，由上至下逐漸提升，尤以下部果皮最高達96.77 (units/mg protein)，顯著高於上部果皮(70.31)(表3)。

### 試驗二、不同品種鳳梨盆苗在低溫逆境下之鳳梨酵素活性分析

所有品種均在低溫處理後的回溫期出現寒害，品種間以'TN20'有最高的寒害指數，'TN13'在所有品種中顯著最低。不同品種間，第0天之總蛋白質含量以'MD2'及'TN11'顯著最高；低溫5天後之'TN17'總蛋白質含量顯著最高；回溫2天後'TN11'及'TN13'顯著最高。

表 1. '台農 17 號'鳳梨植株各器官組織之鳳梨酵素活性

Table 1. Bromelain activity in different organ tissues of 'TN17' pineapple plant.

Organ	Fresh weight (g)	Total protein (mg/g fw)	Bromelain activity (units/g fw)	Bromelain spec. activity (units/mg protein)
Crown	136.74± 36.73	6.11±0.92 b <sup>z</sup>	86.16± 45.75 c	14.89± 9.59 c
Fruit shell	-	2.85±0.74 d	54.84± 40.14 cd	20.88± 17.43 bc
Fruit pulp	928.30± 199.65	1.09±0.58 f	134.67± 31.01 b	150.49± 81.79 a
Fruit core	-	0.52±0.25 f	26.05± 8.90 de	56.56± 28.32 b
Peduncle	50.10± 10.78	1.31±0.34 ef	2.66± 1.03 e	2.06± 0.65 c
Leaf	1447.87± 90.15	5.09±0.59 c	10.94± 12.29 e	1.98± 1.95 c
Stem	419.00± 74.81	7.22±0.71 a	416.02± 59.54 a	57.90± 9.14 b
Root	25.30± 16.52	2.13±0.71 de	3.85± 1.02 e	2.00± 0.78 c

<sup>z</sup> Mean ± standard deviation (n=5). Means within each column followed by the same letter were not significantly different at 5% level by LSD test.

表 2. 鳳梨葉片各部位之鳳梨酵素活性

Table 2. Bromelain activity in different sections of TN17' pineapple leaf.

Section <sup>z</sup>	Total protein (mg/g fw)	Bromelain activity (units/g fw)	Bromelain spec. activity (units/mg protein)
CT	7.50±0.21 a <sup>y</sup>	6.90±0.70 b	0.92±0.08 b
CI	5.68±0.54 b	4.73±0.58 bc	0.83±0.08 b
CL	3.49±0.79 c	3.55±0.77 c	1.04±0.20 b
BW	2.01±0.38 d	12.43±4.75 a	6.06±1.72 a

<sup>z</sup> CT: Chlorophyllous-terminal, CI: Chlorophyllous-intermediate, CL: Chlorophyllous-low, BW: Basal white tissue.

<sup>y</sup> Mean ± standard deviation (n=4). Means within each column followed by the same letter were not significantly different at 5% level by LSD test.

表 3. '台農 17 號'鳳梨果實各部位之鳳梨酵素活性

Table 3. Bromelain activity in different parts of 'TN17' pineapple fruit

Part	Section	Total protein (mg/g fw)	Bromelain activity (units/g fw)			Bromelain spec. activity (units/mg protein)				
Crown	Leaf tip	5.84±0.84 a <sup>z</sup>	161.83±	5.60 a	28.41±	6.82 ab				
	Leaf base	2.01±0.61 b	6.04±	2.38 b	2.97±	0.73 b				
	Crown stem	4.94±1.39 a	145.37±	103.92 a	37.59±	36.48 a				
Fruit	Top	Shell	4.51±0.41 a	A <sup>y</sup>	313.70±	89.17 de	A	70.31±	20.68 c	B
		Outer Pulp	1.85±0.32 c	A	432.12±	19.03 a	A	237.34±	30.64 b	A
		Inner Pulp	1.49±0.30 c	A	369.66±	21.74 bcd	A	256.80±	52.72 b	A
		Core	0.68±0.19 e	A	96.03±	46.91 f	A	153.31±	94.72 bc	A
	Middle	Shell	3.34±0.65 b	B	287.48±	78.74 e	A	85.37±	12.24 c	AB
		Outer Pulp	1.38±0.57 cd	A	412.01±	23.36 abc	A	382.98±	276.36 a	A
		Inner Pulp	1.57±0.33 c	A	396.63±	17.89 abc	A	262.53±	65.47 ab	A
		Core	0.87±0.63 de	A	58.43±	20.21 fg	AB	108.35±	90.12 c	A
	Bottom	Shell	3.82±0.85 b	AB	361.52±	67.35 cd	A	96.77±	17.63 c	A
		Outer Pulp	1.77±0.37 c	A	418.48±	12.32 ab	A	244.76±	47.08 b	A
		Inner Pulp	1.55±0.33 c	A	394.79±	25.44 abc	A	262.64±	54.66 ab	A
		Core	0.49±0.23 e	A	32.98±	12.04 g	B	87.39±	56.93 c	A

<sup>z</sup> Mean ± standard deviation (n=5). Means separation within each part by LSD test, p=0.05.

<sup>y</sup> Means separation within the same section of each fruit part by LSD test, p=0.05.

Bromelain活性方面，不同品種間於低溫5天及回溫2天後均以'TN11'及'TN13'顯著高於其他品種。Bromelain比活性方面，品種內不同處理日均無顯著差異；品種間僅以回溫2天後之'TN11'顯著高於'TN13'及'TN20'(表4)。

試驗三、不同品種組培瓶苗在低溫逆境下之生長情形與酵素活性

植株生長情形方面，'MD2'、'TN4'及'TN17'植株鮮重皆在低溫2週至4週期間下降，並於4週回溫時降至最低，唯'TN20'的植株鮮重在低溫處理2週時顯著上升。寒害葉片百分率(%)方面，'TN4'、'TN17'於第二週即已接近100%，'MD2'、'TN20'則於第四週方接近100%；全株寒害指數方面，所有品種均隨低溫時間延長顯著上升，並於回溫後上升(圖1)。

總蛋白質含量方面，'TN17'在低溫2週時稍降並於回溫後回升，而在低溫4週後及回溫時降至最低；'TN20'於低溫2週及低溫4週時降至最低，而於2週回溫與4週回溫後回升。



Bromelain活性方面，'MD2'在低溫處理期間及回溫後均顯著降低；'TN4'於低溫2週及回溫時稍降，至低溫4週及回溫時降幅更大；'TN20'在低溫處理期間皆下降，並於回溫後顯著回升。'TN17'在低溫2週、2週回溫及低溫4週後均降低，至低溫4週回溫後無法測得酵素活性。比活性方面，'MD2'及'TN4'在2週低溫、4週低溫及其回溫期間均維持顯著較低的比活性，'TN17'比活性在低溫2週、2週回溫及低溫4週皆顯著降低，並於4週回溫時降低至無法測得(表5)。

表 4. 不同品種鳳梨盆苗於低溫逆境下之酵素活性

Table 4. Bromelain activity in pineapple pot plant of different cultivars after cold stress.

Cultivar	Treatment <sup>z</sup>	Chilling injury index	Total protein (mg/g fw)	Bromelain activity (units/g fw)	Bromelain spec. activity (units/mg protein)
MD2	0d	0.0±0.0 b <sup>y</sup> A <sup>x</sup>	4.76±0.58 a A	4.61 ± 1.57 a A	1.00±0.44 a A
	LT5d	0.0±0.0 b A	1.26±0.29 b AB	0.95 ± 2.38 a B	0.71±1.96 a A
	LT5d+RT2d	4.0±1.0 a AB	4.13±0.81 a AB	5.30 ± 5.94 a B	1.15±1.12 a AB
TN11	0d	0.0±0.0 b A	4.84±1.96 ab A	7.57 ± 12.22 a A	1.11±1.68 a A
	LT5d	0.0±0.0 b A	1.90±0.20 b AB	4.13 ± 3.12 a A	2.08±1.50 a A
	LT5d+RT2d	3.7±1.5 a AB	6.82±1.95 a A	19.46 ± 13.73 a A	2.84±2.21 a A
TN13	0d	0.0±0.0 a A	3.20±0.33 b AB	0.54 ± 0.64 a A	0.16±0.20 a A
	LT5d	0.0±0.0 a A	1.40±0.66 b AB	1.28 ± 1.44 a AB	1.52±2.14 a A
	LT5d+RT2d	0.3±0.6 a C	5.31±1.50 a A	3.12 ± 2.61 a B	0.64±0.56 a B
TN17	0d	0.0±0.0 b A	4.27±0.29 a AB	1.29 ± 1.27 a A	0.31±0.31 a A
	LT5d	0.0±0.0 b A	2.09±1.43 b A	0.16 ± 0.28 a B	0.12±0.21 a A
	LT5d+RT2d	3.0±0.0 a B	1.94±1.11 b B	1.48 ± 1.41 a B	0.69±0.78 a AB
TN20	0d	0.0±0.0 b A	2.87±0.20 a B	1.43 ± 1.03 a A	0.49±0.32 a A
	LT5d	0.0±0.0 b A	0.66±0.33 a B	0.06 ± 0.07 a B	0.18±0.27 a A
	LT5d+RT2d	4.7±0.6 a A	1.83±1.90 a B	1.02 ± 1.73 a B	0.27±0.42 a B

<sup>z</sup> 0d: 0 day of low temperature(10/5°C, day/night) treatment. LT5d: 5 days of low temperature treatment, LT5d+RT2d: staying in room temperature for recovery after 5 days of low temperature treatment.

<sup>y</sup> Mean ± standard deviation (n=3). Means separation within each cultivar by LSD test, p=0.05.

<sup>x</sup> Means separation among different cultivars within the same sampling date by LSD test, p=0.05.

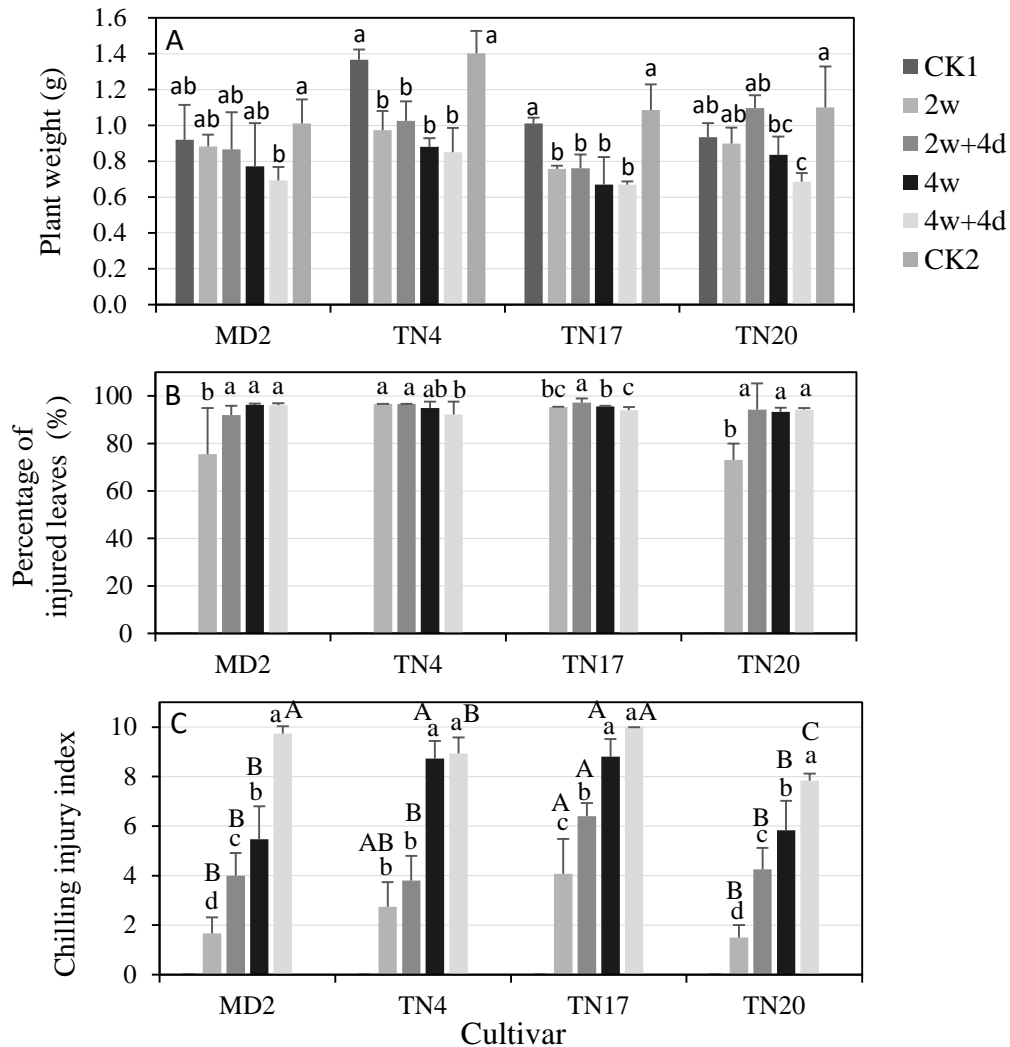


圖 1. 不同品種鳳梨組培苗於低溫逆境下之生長及寒害情形。

Fig. 1. Results of plant weight (A), percentage of injured leaves (B) and chilling injury index (C) in *in vitro* plants of different pineapple cultivars after cold stress. Values are the means  $\pm$  sd (n=5). Different uppercase letter(s) within the same treatment show significant differences between cultivars by LSD test ( $p \leq 0.05$ ). Different lowercase letter(s) within the same cultivar show significant difference between treatments by LSD test ( $p \leq 0.05$ ). CK1: before cold stress treatment; 2w: 2 weeks of low temperature (8/4°C, day/night); 2w+4d: 2 weeks of low temperature, followed by room temperature (26°C) for 4 days; 4w: 4 weeks of low temperature; 4w+4d: 4 weeks of low temperature, followed by room temperature for 4 days; CK2: staying at room temperature for 32 days.

表 5. 不同品種鳳梨組培苗於低溫逆境下之鳳梨酵素活性

Table 5. Bromelain activity in *in vitro* pineapple seedlings of different cultivars after cold stress.

Cultivar	Treatment	Total protein (mg/g fw)	Bromelain activity (units/g fw)	Bromelain spec. activity (units/mg protein)
MD2	CK1	9.89±2.60 a <sup>z</sup> A <sup>y</sup>	63.41±17.85 a A	6.41±0.58 a A
	2w	8.21±2.10 a A	17.76± 4.21 b A	2.38±1.28 b A
	2w+4d	9.53±2.52 a A	20.92± 2.71 b AB	2.26±0.37 b AB
	4w	6.36±0.63 a AB	8.20± 1.75 b A	1.32±0.42 b A
	4w+4d	5.70±2.50 a AB	8.61± 5.78 b B	1.36±0.53 b A
	CK2	9.94±3.30 a A	55.84±15.45 a AB	5.74±1.27 a AB
TN4	CK1	9.94±1.73 ab A	66.68±11.85 a A	7.91±1.25 a A
	2w	8.11±1.77 ab A	16.20± 6.34 bc A	2.44±1.20 b A
	2w+4d	11.24±2.76 ab A	28.66± 0.17 b A	3.12±0.76 b A
	4w	5.82±1.23 b B	6.82± 0.94 c A	1.44±0.46 b A
	4w+4d	7.34±5.78 ab AB	10.28±12.08 c AB	1.49±1.12 b A
	CK2	11.72±2.75 a A	79.05± 7.98 a A	8.17±1.91 a A
TN17	CK1	9.82±0.48 a A	29.00± 3.54 a B	2.97±0.50 ab B
	2w	7.84±1.65 b A	11.41± 1.72 b A	1.47±0.14 c A
	2w+4d	9.33±0.92 ab A	11.13± 8.38 b B	1.24±0.94 c B
	4w	3.92±0.62 c C	6.41± 2.41 b A	1.72±0.85 bc A
	4w+4d	1.33±0.49 d B	nd	nd
	CK2	9.21±0.68 ab A	30.55± 9.58 a B	3.35±1.17 a B
TN20	CK1	10.10±1.05 ab A	39.40± 6.22 ab B	3.95±0.86 b B
	2w	7.33±1.02 c A	22.23± 5.77 cd A	3.11±1.04 bc A
	2w+4d	11.32±1.24 a A	31.96± 9.83 bc A	2.83±0.89 bc A
	4w	7.41±0.59 c A	10.11± 0.37 d A	1.37±0.07 c A
	4w+4d	10.99±1.58 a A	26.11± 5.86 bc A	2.41±0.70 bc A
	CK2	8.34±0.91 bc A	53.53±13.90 a A	6.52±2.04 a A

<sup>z</sup> Mean ± standard deviation (n=5). Means separation within each cultivar by LSD test, p=0.05.  
nd: non-detectable.

<sup>y</sup> Means separation among different cultivars within the same sampling date by LSD test, p=0.05.

## 討 論

### 一、鳳梨植株不同器官組織之鳳梨酵素活性分析

Ketnawa等人(2012)的研究顯示鳳梨果實中不同部位組織的總蛋白質含量與蛋白酶活性具顯著差異。其原因可能為各器官組織主要蛋白酶類型不相同，如冠芽與莖部內以Stem bromelain為主而果實中以Fruit bromelain為主，Umesh等人(2008)將果心之蛋白酶純化後發現其分子量為26 kDa，與目前已知分子量分別為23.8 kDa的Stem bromelain及24 kDa的Fruit bromelain有所差異(Maurer, 2001)。此外，本研究亦發現莖部Bromelain活性高於果肉，而果肉Bromelain比活性大於莖部，與Devi等人(2001)指出果肉Bromelain活性及比活性均大於莖部略有不同，推測可能的原因為測定活性時使用不同的基質及反應pH值。如Ketnawa (2012)等人證實蛋白酶組成以Stem bromelain為主之莖部在pH=8時活性表現較高。Stem bromelain與Fruit bromelain之最適基質及反應pH值有所不同，顯示不同部位間因主要蛋白酶的種類不同，蛋白酶活性表現也將隨萃取及測定之條件而有所差異。

Miller及Hall (1953)於黃熟鳳梨果實測得Bromelain活性由基部至頂部逐漸上升，與果實成熟度降低呈負相關趨勢。Pang等人(2020)則發現黃熟'MD2'鳳梨果實較青熟果實之Bromelain基因表達下調10倍，黃熟果實之Bromelain活性亦較青熟果實下降2倍。本研究也發現果實頂部果心之Bromelain活性顯著高於果實基部果心，但果肉則無顯著差異。另一方面，Wang等人(2014)發現'Comte de Paris'鳳梨果實花後20至70天果熟期間，外部果肉中的cystein proteinase基因(*AcCP2*)表達量增加10倍，顯示綠熟期果實之Bromelain活性顯著高於幼果期。因此，鳳梨果實發育初期Bromelain活性可能較低，然後隨果實發育逐漸上升，至綠熟期達到高峰後逐漸下降至黃熟期。

果冠葉片與植株真葉片同屬葉片結構，總蛋白質含量由尖端往基部漸減，Sideris (1946)提出在日照充足的條件下，葉片中富含葉綠素區段的葉綠素含量與蛋白質含量呈正相關。Bromelain活性方面以著生莖段的白色基部最高，可能與表1全株活性最高的莖段部位有關，顯示葉片近軸端白色部位具有與莖部較為相似的活性表現。相較之下，果冠葉片之白色基部部位比例較低，可能為冠葉基部活性明顯較冠葉葉尖低的原因。

### 二、鳳梨植株在低溫逆境下之寒害與鳳梨酵素活性分析

本研究發現不同品種的鳳梨盆苗葉片寒害症狀均在低溫逆境後之回溫期出現，顯示寒害在低溫期間即已進入不可逆的階段。而所有品種間比較下，'台農13號'之寒害顯著低於其他品種。'台農13號'以其冬果較夏果糖度高、酸度低，適宜作為秋冬果進行商業生產聞名(張, 1995)，故又稱為冬蜜鳳梨，雖在臺灣產量不多但在中國12月到2月期間為最重要的商業品種(Shu *et al.*, 2019)。而以果實耐寒性突出的'MD2'在盆苗低溫逆境試驗中，似乎與其他品種之耐寒性無異，顯示品種間之耐寒性差異於不同器官的表現可能不一定相同(Raimbault *et al.*, 2013; Luengwilai *et al.*, 2016)。

組培瓶苗之植株鮮重於低溫處理2週、4週及回溫期間持續下降，不同品種間以'台農20

號'在低溫2週後植株鮮重仍顯著上升最為突出，顯示'台農20號'組培苗於寒害逆境下之耐受性較其他品種為高，經低溫處理2週後植株僅小面積進入不可逆的寒害逆境。'台農4號'及'台農17號'於第二週之葉片寒害率(%)即已接近100%，顯示其可耐受低溫逆境之時間較短。品種間的全株寒害指數比較下，'台農17號'於每個採樣日之CI index皆為最高，寒害情形出現較快且嚴重。Shu等人(2021)依低溫逆境後的恢復生長速度判定鳳梨組培苗品種間之耐寒性高低，該研究中'MD2'被判定為耐寒品種，'台農4號'居中，而'台農17號'則對低溫較為敏感，並針對不同耐寒性品種鳳梨組培植株進行高通量定序和基因表達分析，鑑定出1186個寒冷反應基因，發現其與細胞壁特性、氣孔關閉以及ABA和ROS信號傳遞相關的基因起著重要作用，此結果可能得以解釋不同品種鳳梨組培瓶苗在低溫逆境下反應之差異。組培苗試驗中所有品種之Bromelain活性於低溫逆境期間均下降，隨寒害情形差異可分為三類，耐寒性較強的'台農20號'於低溫處理後之回溫期均顯著回升；中度抗寒的'MD2'及'台農4號'於低溫處理2週之回溫期顯著回升，但至低溫處理4週回溫期之回復則較差；低溫敏感的'台農17號'於低溫處理2週之回溫期便已無法回升，並於低溫處理4週回溫時無法測得活性。

研究中盆苗之寒害普遍輕微，而組培苗則普遍嚴重，其中組培苗部分品種於低溫處理2週後幾乎所有葉片皆出現寒害情形，寒害較嚴重之組培瓶苗可能因存活細胞數目的差異影響萃取之酵素活性。另一方面，前人提出鳳梨果實低溫逆境下調控Bromelain基因之表達量隨低溫處理而降低，而寒害表現較為嚴重的品種其基因表達量下降率較寒害輕微的品種為少(Raimbault *et al.*, 2013)。組培苗試驗中發生寒害時所有品種Bromelain活性均下降，寒害較為嚴重的品種('台農17號') Bromelain活性下降率較寒害輕微品種高，顯示果實與植株之Bromelain活性對寒害之反應有所不同。由於Raimbault測定鳳梨酵素基因之表現差異，尚無法得知植物體內實際的酵素活性差異，而能抑制鳳梨酵素95%以上活性的半胱胺酸蛋白酶抑制劑(Cystatin)之基因表達在耐寒品種中亦顯著高於不耐寒品種(Raimbault *et al.*, 2013)，因此鳳梨酵素及其抑制劑在寒害逆境下所扮演之角色，有待更進一步之研究。

## 參 考 文 獻

- 吳馨宇。2016。羥脯胺酸選拔耐逆境鳳梨之研究。國立中興大學園藝學系碩士論文。
- 張清勤。1995。「臺農 13 號」鳳梨。中華農業研究 44: 287-296。
- 曾柏瑄。2013。貯藏期間鳳梨果實物化性狀與黑心劣變之相關性。國立中興大學園藝學系碩士論文。
- 簡安祺。2017。硫酸銅與低溫貯藏對台農 17 號鳳梨果實物化性狀與內部褐化之影響。國立中興大學園藝學系碩士論文。
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

- Devi, T. P., L. Singh, and M. Umtam. 2001. The relative bromelain contents in different parts of pineapple plant c. v. queen. *Indian J. Hill Farming* 14:128-129.
- Ketnawa, S., P. Chaiwut, and S. Rawdkuen. 2012. Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food Bioprod. Process.* 90:385-391.
- Luengwilai, K., D. M. Beckles, and J. Siriphanich. 2016. Postharvest internal browning of pineapple fruit originates at the phloem. *J. Plant Physiol.* 202:121-133.
- Maurer, H. 2001. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:1234-1245.
- Miller, E. V. and G. D. Hall. 1953. Distribution of total soluble solids, ascorbic acid, total acid, and bromelain activity in the fruit of the natal pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Plant Physiol.* 28:532.
- Pang, W. C., A. N. M. Ramli, and A. A. Abdul Hamid. 2020. Gene expression analysis of fruit bromelain in ripening of *Ananas comosus* cultivar MD 2. *Mater. Sci. Forum* 981:209-214.
- Raimbault, A.-K., Y. Zuily-Fodil, A. Soler, P. Mora, and M. H. C. de Carvalho. 2013. The expression patterns of bromelain and *AcCYS1* correlate with blackheart resistance in pineapple fruits submitted to postharvest chilling stress. *J. Plant Physiol.* 170:1442-1446.
- Shu, H., K. Li, Y. Ou, R. Zhan, and S. Chang. 2021. Identification Cold Tolerance of Pineapple Germplasms at Seedling Stage. *Am. J. Plant Sci.* 12: 1768-1779.
- Shu, H., W. Sun, G. Xu, R. Zhan, and S. Chang. 2019. The Situation and Challenges of Pineapple Industry in China. *Agric. Sci.* 10:683-688.
- Sideris, C. P. 1946. Chlorophyll and protein interrelationships in *Ananas comosus* (L.) Merr. *Plant Physiol.* 22:160-173.
- Sideris, C., B. Krauss, and H. Young. 1938. Assimilation of ammonium and nitrate by pineapple plants grown in nutrient solutions and its effects on nitrogenous and carbohydrate constituents. *Plant Physiol.* 13:489-527.
- Umesh, H. H., B. Sumana, and K. S. M. S. Raghavarao. 2008. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. *Bioresour. Technol.* 99:4896-4902.
- Wang, W., L. Zhang, N. Guo, X. Zhang, C. Zhang, G. Sun, and J. Xie. 2014. Functional properties of a cysteine proteinase from pineapple fruit with improved resistance to fungal pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *Molecules* 19:2374-2389.

## Studies on Bromelain Activity in Pineapple Plant and Fruit under Cold Stress

Yuan-Yung Chuang<sup>1)</sup> Ching-Cheng Chen<sup>2)</sup>

Key words: Pineapple, Chilling injury, Bromelain

### Summary

This study investigated the bromelain activity in different organs and parts of pineapple plants and the correlation between chilling injury index and bromelain activity. The results showed that bromelain activity was highest in the stem, followed by the pulp, and the peduncle was the lowest; bromelain specific activity was highest and lowest in the pulp and the leaf, respectively. In the leaf, bromelain activity was highest in the basal, followed by the tip. In the fruit, bromelain activity was highest and lowest in the outer pulp and the core, respectively; bromelain specific activity was lowest in fruit shell and highest in the pulp. Different pineapple cultivars had different cold tolerance. Potted and *in vitro* pineapple plants var. 'TN13' and 'TN20' were more chilling-tolerant. However, there were no significant correlations between chilling injury index and bromelain activity in potted and *in vitro* plants. It is speculated that there may be other important factors affecting the tolerance of chilling stress, such as cystatin that can regulate the activity of bromelain in pineapple fruit, which needs further study.

---

1) Graduate student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Assistant Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

Corresponding author.

