

# 猕猴桃采后软化过程中 $\beta$ -甘露聚糖酶活性变化

任艳芳 张兰兰 何俊瑜 王思梦

(贵州大学 农学院 贵州 贵阳 550025)

**摘要:**以“米良1号”猕猴桃果实为研究材料,探讨其在采后常温贮藏过程中果实软化与 $\beta$ -甘露聚糖酶活性变化情况。结果表明,贮藏期间,随着果实硬度的降低,果实中可溶性固形物含量逐渐增加,果皮和果肉中 $\beta$ -甘露聚糖酶活性均表现出先增加后降低的趋势;而果心中 $\beta$ -甘露聚糖酶活性却保持不断增加的趋势。在整个贮藏期间,果皮中 $\beta$ -甘露聚糖酶活性最高,果肉和果心相对较低。与对照相比,乙烯利处理可以加快果实软化的速度,提高果实可溶性固形物含量,增加果皮、果肉和果心中 $\beta$ -甘露聚糖酶活性;而壳聚糖处理则明显延缓了果实软化的进程和果实可溶性固形物含量增加的幅度,降低了果皮、果肉和果心中 $\beta$ -甘露聚糖酶活性。

**关键词:**猕猴桃; $\beta$ -甘露聚糖酶;软化

中图分类号:S663.4;S601 文献标识码:A 文章编号:1000-2286(2010)01-0040-05

## The Changes in Activity of Endo- $\beta$ -mannanase during Softening of Kiwifruit

REN Yan-fang, ZHANG Lan-lan, HE Jun-yu, WANG Si-meng

(College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

**Abstract:** Fruit softening is a complex process that involves the degradation of cell wall by a variety of hydrolases. Endo- $\beta$ -mannanase (EC 3.2.1.78) is an important enzyme degrading mannans backbone composing hemicellulose of cell wall and producing oligomannans. The changes in the activity of endo- $\beta$ -mannanase were investigated during the softening of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. Miliang No. 1) stored at room temperature. The results showed that the fruit firmness decreased and the content of soluble solid increased during the storage. The patterns of endo- $\beta$ -mannanase activity were different in pericarp, pulp and pith. The activity of endo- $\beta$ -mannanase in pericarp and pulp first increased then decreased. However, the activity of endo- $\beta$ -mannanase in pith increased gradually. Moreover, the increase in endo- $\beta$ -mannanase activity was the greatest in the pericarp, and less in the pulp and pith regions. Compared with the control, exogenous ethephon treatment could speed up the rate of fruit softening, increase the content of soluble solid and the endo- $\beta$ -mannanase activity in pericarp, pulp and pith of kiwifruit. On the contrary, chitosan treatment could delay the loss of fruit firmness, decrease the content of soluble solid and the endo- $\beta$ -mannanase activity in pericarp, pulp and pith of kiwifruit.

**Key words:** kiwifruit; endo- $\beta$ -mannanase; softening

收稿日期:2009-10-13 修回日期:2009-12-15

基金项目:国家自然科学基金项目(30901011)和贵州省农业攻关项目(NY20083021)

作者简介:任艳芳(1976-),女,副教授,博士,主要从事园艺产品采后生理与分子生物学研究,E-mail:gzdx2006@126.com。

果实软化是大多数易腐果实成熟的一个重要标志,它一方面影响果实采后的品质,如外观、口感、运输能力、抗病害能力等;另一方面也直接影响果实的商品性。引起果实软化的生理生化因素很复杂,但目前普遍认为,在一些水解酶的作用下果肉细胞壁多糖的降解是果实后熟软化的主要原因<sup>[1]</sup>。猕猴桃(*Actinidia chinensis* Planch.)是采后软化特征十分明显的果实。相关研究表明,多聚半乳糖醛酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、木葡聚糖内糖基转移酶、Expansin 等均与猕猴桃果实后熟软化紧密相关,但并不是关键酶或蛋白质,可能还有其它一些水解酶或蛋白质参与此过程<sup>[2-5]</sup>。 $\beta$ -甘露聚糖酶(Endo-1,4- $\beta$ -D-mannan mannohydrolase; EC3.2.1.78)是一种能降解细胞壁半纤维素成分的重要水解酶之一,主要作用于甘露聚糖主链并将其水解为寡聚糖<sup>[6]</sup>。相关研究<sup>[7-9]</sup>表明,该酶参与了番茄、木瓜和香蕉等果实成熟软化,但是猕猴桃果实软化研究中未见该酶的相关报道。因此,本文将以猕猴桃果实为研究对象,探讨其软化过程中果实不同部位  $\beta$ -甘露聚糖酶活性变化情况,旨在初步明确  $\beta$ -甘露聚糖酶活性变化与猕猴桃果实后熟软化的关系,为研究猕猴桃果实成熟软化机理、完善贮藏技术体系提供一定的理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

本实验所用材料为“米良 1 号”(Actinidia deliciosa cv. Miliang No. 1)猕猴桃果实,于 2008 年 11 月 3 日采自贵阳市修文县猕猴桃生产基地,当天运回实验室。预贮后,选取大小、成熟度一致、无病虫害的猕猴桃果实,分别以 50 mg/kg 乙烯利和 20 g/kg 壳聚糖浸果 5 min<sup>[10]</sup>,以加速或延缓果实软化进程,以清水处理为对照。充分晾干后放入保鲜袋,常温下贮藏。每个处理设 3 次重复,每个重复 30 个果实。从贮藏之日起,每 7 d 取样 1 次,至 42 d 时结束。每次取样测定果实的硬度和可溶性固形物含量,并将果实分为果皮、果肉、果心三部分,贮藏于 -70 °C 冰箱,用于  $\beta$ -甘露聚糖酶活性测定。

### 1.2 方 法

果肉硬度的测定:采用 GY-1 型果实硬度计测定。可溶性固形物含量(SSC)的测定:采用 PR101 手持折光仪测定。 $\beta$ -甘露聚糖酶活性测定:采用凝胶扩散法<sup>[11]</sup>。称取 0.2 g 猕猴桃样品加入 500  $\mu$ L 0.1 mol/L HEPES-NaOH (pH 8.0) 提取液,在冰上迅速研磨成匀浆,于 4 °C、13 000 r/min 下离心 10 min,上清液即为  $\beta$ -甘露聚糖酶的提取液。制备含有 1 g/L LBG(Locust bean gum)的琼脂糖凝胶溶液,倒入 12 mm 平底培养皿中,室温下聚合后,用直径 2 mm 的打孔器在凝胶上打小孔。向每个小孔中点入 2  $\mu$ L 酶提取液以及一系列的标准酶液(Megazyme),将培养皿置于铺有湿润纸巾的塑料盒中 25 °C 密闭保温 20 h。然后在 McIlvaine 缓冲液(pH 7.0)中清洗凝胶 30 min,5 g/L 刚果红染色 30 min,水清洗 2 min,体积分数  $\varphi$ (乙醇) = 80% 固定 10 min,McIlvaine 缓冲液(pH 7.0)清洗 3 次,最后在 1 mol/L NaCl 溶液中显色,得到凝胶图象。测量凝胶图象上透明圈(包括标准酶液)的直径,根据标准酶圆圈直径和其活性的关系进行回归分析,得到回归方程后将所测样品的直径代入方程中,计算样品  $\beta$ -甘露聚糖酶的活性。

### 1.3 数 据 分 析

本试验数据采用 Excel 软件进行分析处理。

## 2 结 果 与 分 析

### 2.1 猕猴桃果实硬度变化

由图 1 所示,整个贮藏期间,猕猴桃果实硬度均呈不断降低的趋势。对照和乙烯利处理果实硬度变化可分为两个明显的阶段:即贮藏后 21 d 内对照和乙烯利处理果实硬度下降较快,贮藏 21 d 后果实硬度下降速度减缓;而壳聚糖处理果实硬度变化始终表现为缓慢下降的趋势。且在整个贮藏期间,壳聚糖处理果实硬度始终高于对照,而乙烯利处理的果实硬度则明显低于对照。在贮藏后 21 d 时,乙烯利和壳聚糖处理果实硬度分别是对照果实的 43.6% 和 187.8%;在贮藏后 42 d 时,乙烯利和壳聚糖处理果实

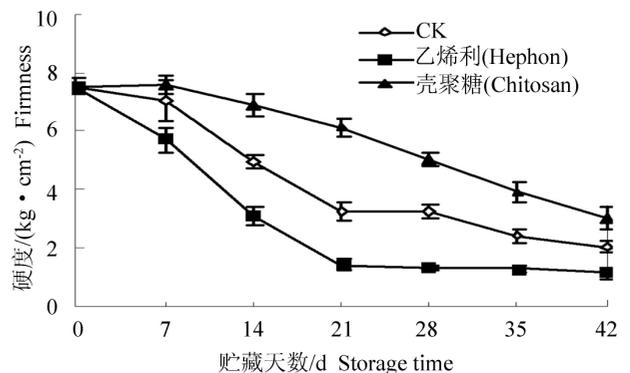


图 1 猕猴桃贮藏期间果实硬度变化

Fig. 1 Changes in firmness during kiwifruit storage

硬度分别是对照果实的 66.9% 和 148.1%。表明乙烯利加速了猕猴桃果实的软化速度,而壳聚糖则推迟了果实软化的速度。

### 2.2 SSC 含量的变化

由图 2 可知,在猕猴桃果实采后贮藏期间,果实中的 SSC 含量均呈上升趋势,乙烯利处理的果实中 SSC 含量比对照上升较快,贮藏至第 28 d 时达到最大值,随后开始降低;而壳聚糖处理的果实中 SSC 含量上升较缓慢,且在设定贮藏期间 SSC 含量始终低于对照。果实贮藏 28 d 后,虽然乙烯利处理中果实的 SSC 含量开始降低,但是对照和壳聚糖中 SSC 含量仍在继续升高。由此可见,乙烯利处理能够加速果实内部生理代谢,呼吸消耗增加;而壳聚糖处理能够减缓果实内部生理代谢,呼吸消耗减慢,延缓了可溶性固形物的降低。

由此可知,乙烯利处理能够加速果实内部生理代谢,呼吸消耗增加;而壳聚糖处理能够减缓果实内部生理代谢,呼吸消耗减慢,延缓了可溶性固形物的降低。

### 2.3 猕猴桃果实中 $\beta$ -甘露聚糖酶活性的变化

由图 3A 所示,在 0 d 时,各处理的猕猴桃果皮中可以检测到较低的  $\beta$ -甘露聚糖酶活性。随着贮藏时间的延长, $\beta$ -甘露聚糖酶活性逐渐增加。贮藏至第 14 d 时,各处理中  $\beta$ -甘露聚糖酶活性均达到最大值,此时乙烯利处理、壳聚糖处理和对照中该酶活性分别是 0 d 的 3.01、2.23 和 2.57 倍。相比而言,乙烯利处理中  $\beta$ -甘露聚糖酶活性增幅较大,壳聚糖处理中增幅较小。随后,各处理中  $\beta$ -甘露聚糖酶活性逐渐降低。在整个贮藏期间,乙烯利处理中该酶活性明显高于对照,而壳聚糖处理则始终低于对照。

由图 3B 可知,在果肉中,除壳聚糖处理外,其它 2 个处理的  $\beta$ -甘露聚糖酶活性变化趋势与果皮基本一致,即随着贮藏时间的延长呈现先增加后降低的趋势。但是与果皮相比,

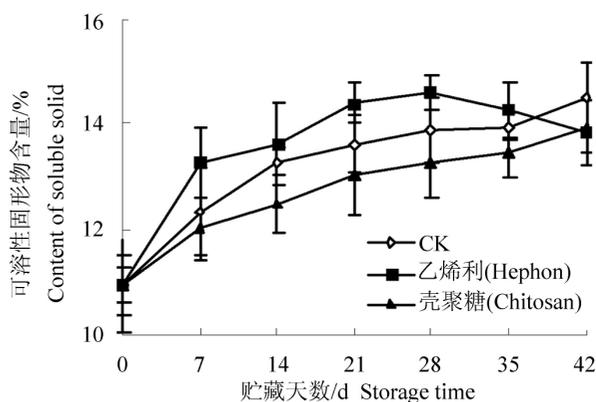


图 2 猕猴桃贮藏期间果实可溶性固形物含量的变化  
Fig. 2 Changes in content of soluble solid during kiwifruit storage

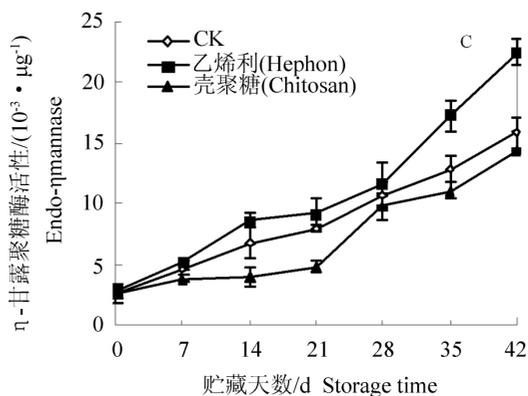
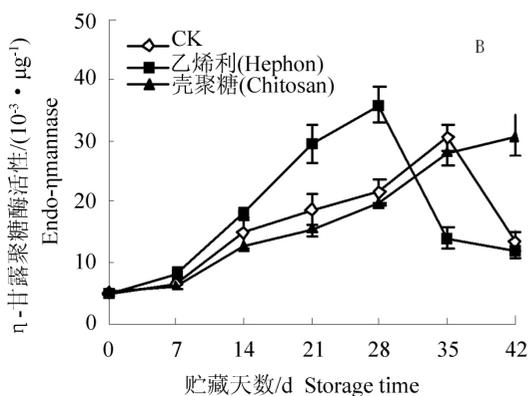
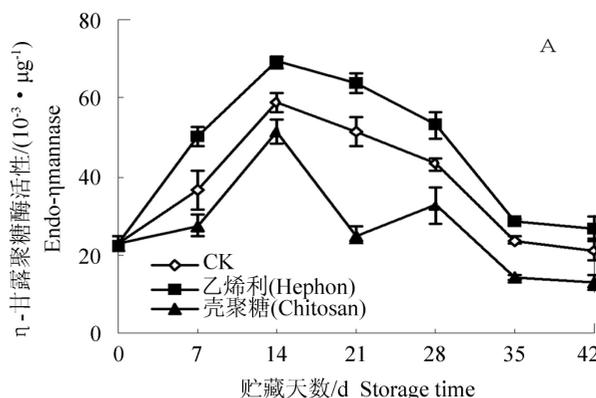


图 3 猕猴桃贮藏期间果皮(A)、果肉(B)、果心(C)中  $\beta$ -甘露聚糖酶活性

Fig. 3 Changes in activities of endo- $\beta$ -mannanase in pericarp(A), pulp(B) and pith(C) during kiwifruit storage

乙烯利处理和对照中  $\beta$ -甘露聚糖酶活性最大值出现的时间明显推迟,分别为贮藏后第 28 d 和 35 d,且在酶活性升高的过程中,乙烯利处理  $\beta$ -甘露聚糖酶活性始终高于对照。且随着  $\beta$ -甘露聚糖酶活性的降低,在 35 d 时,乙烯利处理中  $\beta$ -甘露聚糖酶活性降至对照酶活性的 46.1%。另外在整个贮藏期间,壳聚糖处理  $\beta$ -甘露聚糖酶活性始终保持升高的趋势,但贮藏 0~35 d 期间,其酶活性仍低于对照,之后开始逐渐高于对照。

由图 3C 可知,在果心中,各处理  $\beta$ -甘露聚糖酶活性变化趋势基本一致,即随着贮藏时间的延长,

酶活性逐渐增加。整个贮藏期间,乙烯利处理的  $\beta$ -甘露聚糖酶活性高于对照,而壳聚糖处理的  $\beta$ -甘露聚糖酶活性则低于对照。

另外,由图 3 还可以看出,在猕猴桃果实贮藏期间, $\beta$ -甘露聚糖酶活性主要集中于果皮中,其次是果肉,而果心中  $\beta$ -甘露聚糖酶活性最低。各处理中以平均酶活性来计算,乙烯利、壳聚糖和对照中,果皮  $\beta$ -甘露聚糖酶活性分别占到各部位酶活性的 61.1%、52.4% 和 59.9%,而果心则分别为 14.9%、14.1% 和 14.2%。

### 3 讨 论

猕猴桃是一种典型的跃变型果实,采后果实硬度快速下降,这种硬度变化与构成细胞壁的多糖物质降解有关<sup>[5]</sup>。 $\beta$ -甘露聚糖酶是降解构成细胞壁半纤维素成分中甘露聚糖的重要酶类之一,本研究结果表明,随着贮藏时间的延长,猕猴桃果实硬度逐渐降低,SSC 增加,果实逐渐软化。在果皮和果肉中,贮藏前期  $\beta$ -甘露聚糖酶活性均呈现升高的趋势,而与硬度变化呈相反趋势,说明此期间  $\beta$ -甘露聚糖酶活性增加有助于加快细胞壁甘露聚糖的降解。随着果皮和果肉中细胞壁降解, $\beta$ -甘露聚糖酶活性逐渐降低,但果实硬度仍在不断降低,说明该酶的细胞壁降解作用仍在进行,这与番茄的研究结果基本一致<sup>[7]</sup>。此外,果肉中酶活性最大值出现的时间晚于果皮,而果心中  $\beta$ -甘露聚糖酶活性在贮藏期间始终保持逐渐增加的趋势(图 3)。相比较而言,果皮中  $\beta$ -甘露聚糖酶活性最高,其次是果肉,而果心中该酶活性相对较低,这与在番茄、西瓜、香瓜和木瓜上的研究结果基本一致<sup>[7-8,12]</sup>。Bewley 等<sup>[7]</sup>认为,由于果皮质地致密,其干重所占比例高于其它部位,单位面积上含有更多的细胞和大量的细胞壁物质,因此需要更多的  $\beta$ -甘露聚糖酶参与该部位细胞壁降解,所以果皮中酶活性高于其它部位。此外,通过对莴苣、番茄、水稻等种子胚乳中的研究表明, $\beta$ -甘露聚糖酶是一种分泌型酶<sup>[13-15]</sup>,该酶可能从猕猴桃果皮分泌到果肉和果心中,酶活性大小与分泌的数量和速度有关。因此果实不同部位  $\beta$ -甘露聚糖酶含量不同,当果皮和果肉中  $\beta$ -甘露聚糖酶活性已经开始降低时,果心中该酶活性仍在升高。另外,猕猴桃果实不同部位酶活性的大小也可能与果实各部位酶的从头合成等有关,其具体原因还有待于进一步研究。当猕猴桃果实分别以乙烯利和壳聚糖浸果处理后,可以相应加快和减缓果实硬度下降和 SSC 含量增加。与此同时,果实不同部位  $\beta$ -甘露聚糖酶活性增加的速度和幅度也相应地被加剧和减缓,说明乙烯利和壳聚糖在对果实后熟软化起调节作用的同时也对  $\beta$ -甘露聚糖酶活性产生了调节作用,这也进一步说明  $\beta$ -甘露聚糖酶与猕猴桃果实的软化具有一定的相关性。

#### 参考文献:

- [1] Goulao L F, Oliveira C M. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit [J]. Trends in Food Science and Technology 2008, 19(1): 4-25.
- [2] 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 [J]. 植物学报, 1995, 37(3): 198-203.
- [3] 陈昆松, 张上隆, Gavin S Ross.  $\beta$ -半乳糖苷酶基因在猕猴桃果实成熟过程的表达 [J]. 植物生理学报, 2000, 26(2): 117-122.
- [4] Ross G A, Sarah L J, Yar-Khing Y, et al. Analysis of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) gene families in kiwifruit and apple [J]. Postharvest Biology and Technology 2009, 51(2): 149-157.
- [5] 杨绍兰, 陈妙金, 张波, 等. 乙酰水杨酸调控猕猴桃果实后熟软化进程中的 Ad-EXPI 基因表达 [J]. 果树学报, 2007, 24(6): 778-782.
- [6] Ren Y F, Bewlwy J D, Wang X F. Protein and gene expression patterns of endo- $\beta$ -mannanase following germination of rice [J]. Seed Science Research 2008, 18(3): 139-149.
- [7] Bewley J D, Banik M, Bourgault R, et al. Endo- $\beta$ -mannanase activity increases in the skin and outer pericarp of tomato fruits during ripening [J]. J Exp Bot 2000, 51(344): 529-538.
- [8] Koalanund R, Archbold D D, Pomper K W. Pawpaw [*Asimina triloba* (L.) Dunal] fruit ripening. II. Activity of selected cell wall degrading enzymes [J]. J Amer Soc Hort Sci 2005, 30(4): 643-648.
- [9] Zhuang J P, Su J, Chen W X. Molecular cloning and characterization of fruit softening related gene  $\beta$ -mannanase from bananas Fruit [J]. Agricultural Sciences in China 2006, 5(4): 277-283.

- [10] 陈金印. 美味猕猴桃 ‘金魁’ 果实后熟软化机理及其调控技术研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2004.
- [11] Bourgault R, Bewley J D. Gel diffusion assays for endo- $\beta$ -mannanase and pectin methylesterase can underestimate enzyme activity due to proteolytic degradation: a remedy [J]. Analytical Biochemistry 2002, 300(1): 87-93.
- [12] Bourgault R, Bewley J D, Alberici A, et al. Endo- $\beta$ -mannanase activity in tomato and other ripening fruits [J]. Hort Science 2001, 36(1): 72-75.
- [13] Halmer P, Bewley J D. Mannanase production by the lettuce endosperm: control by the embryo [J]. Planta, 1979, 144(4): 333-340.
- [14] Nonogaki H, Nomaguchi M, Morohashi Y. Endo- $\beta$ -mannanase in the endosperm of germinated tomato seeds [J]. Physiologia Plantarum, 1995, 94(2): 328-334.
- [15] Wang A X, Wang X F, Ren Y F, et al. Endo- $\beta$ -mannanase and  $\beta$ -mannosidase activities in rice grains during and following germination, and the influence of gibberellin and abscisic acid [J]. Seed Science Research 2005, 15(3): 219-227.

• 简讯 •

综合评价前 10 名的农业大学学报

刊名	数值	排名	刊名	数值	排名
浙江大学学报 (农业与生命科学版)	82.6	1	华中农业大学学报	65.7	6
西北农林大学学报 (自然科学版)	79.4	2	江西农业大学学报	60.9	7
南京农业大学学报	75.8	3	沈阳农业大学学报	57.5	8
中国农业大学学报	69.4	4	吉林农业大学学报	54.9	9
华南农业大学学报	66.2	5	湖南农业大学学报(自然科学版)	54.4	10

数据来自 2009 年版《中国科技期刊引证报告(核心版)》,是中国科技信息所系统性地综合考虑被评价期刊的各影响力指标(总被引频次、影响因子、他引率、基金论文比、引文率等)在其所在学科中的相对位置,并按一定的权重系数将这些指标进行集合而成。

• 学报编辑部 •