

巨峰葡萄低温贮藏过程中 主要多糖降解酶活性变化的研究

朱丹实^{1,2}, 梁洁玉¹, 曹雪慧¹, 冯叙桥^{1,2}, 励建荣^{1,*}, 孟宪军^{2,*}

(1.渤海大学食品科学研究院, 渤海大学化学化工与食品安全学院, 辽宁省食品安全重点实验室,
辽宁锦州 121013;

2.沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110866)

摘要:果蔬细胞壁酶活性与果实的种类和贮藏品质密切相关。本实验以巨峰葡萄为原料, 研究不同冷藏温度(0℃和4℃)下与葡萄浆果软化相关的多种酶类: 果胶酯酶(PE)、葡聚糖内切酶(EGase)、果胶内切酶(endo-PG)和果胶外切酶(exo-PG)活性的变化规律。结果表明, 冰温可以较好地抑制细胞壁酶活性, 延长贮藏期。较低的贮藏温度对PE的影响不大, 0℃贮藏延缓了EGase活性峰值出现的时间, 有效的降低了endo-PG和exo-PG活性。总体来看, EGase、endo-PG和exo-PG活性的变化对葡萄贮藏过程中质地变化及腐烂起到了更为重要的作用。

关键词: 葡萄, 低温贮藏, 软化, 细胞壁, 酶活

Study on enzymes of polysaccharide degradation during cold storage of Kyoho grape

ZHU Dan-shi^{1,2}, LIANG Jie-yu¹, CAO Xue-hui¹, FENG Xu-qiao^{1,2}, LI Jian-rong^{1,*}, MENG Xian-jun^{2,*}

(1. Research Institute of Food Science, Bohai University. College of Chemistry, Chemical Engineering and Food Safety,
Bohai University. Food Safety Key Lab of Liaoning Province, Jinzhou 121013, China;

2. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: Cell wall enzymatic activity was closely related to the type and storage quality of fruit. In this study, Kyoho grape was used as the raw material. Changing regulation of several cell wall enzymatic activity of grape berry, such as PE, EGase, endo-PG and exo-PG which was bound up with berry softening at different cold storage temperature (0℃ and 4℃) were studied. The result showed that, ice temperature could be effective to inhibit the activity of cell wall enzymes to prolong the storage time. What's more, the lower temperature had little effects on the changing of PE activity, and preservation at 0℃ could prolong the time of max value of EGase activity and reduce the activity of endo-PG and exo-PG. Overall, the changing of EGase, endo-PG and exo-PG activity in grape had a grater influence on the quality and deterioration of grape during storage.

Key words: grape; cold storage; softening; cell wall; enzymatic activity

中图分类号: TS255.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)04-0331-04

浆果软化是鲜食葡萄品质劣变的主要因素之一, 果实软化主要是由于构成细胞壁物质的多糖大分子的降解引起的^[1]。葡萄的贮藏过程中多种细胞壁酶类都参与了果实的软化过程, 而葡萄浆果软化初期主要是果胶类大分子的降解^[2], 因此果胶酶在葡萄浆果软化过程中的作用比较突出。多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase, 简称PG)是果实成熟软化的关键酶之一, 主要功能是将果实细胞壁多糖中多聚半乳糖醛酸降解为半乳糖醛酸^[3], 使细胞壁中胶层解

体^[4], 导致果实软化。大多数果实存在果胶外切酶(exo-PG)和果胶内切酶(endo-PG)^[5-6]。葡聚糖内切酶(endo-β-1, 4-D-glucanase或EGase)可以水解邻接非取代残基的葡聚糖链上的1, 4-β-D-糖苷键。EGase的底物可能包括木葡聚糖、非晶体纤维素表面部位, 也可能包括葡聚甘露糖, 其上由连续的1, 4-β-D-糖苷键连接成的葡聚糖有利于底物与酶的结合^[7-8]。果胶酯酶(pectin esterase, 简称PE)^[9-10]广泛存在于高等植物中, 果胶甲酯酶(PME)作用是水解果胶分子中甲酯化的C6羧基^[11], 使之生成多聚半乳糖醛酸和甲醇, 因此PME的活动似乎是PG活动的必要前提。

目前国内外学者对鲜食葡萄多糖降解相关酶活的系统研究很少, 而研究葡萄中各种多糖酶类的作用, 并采取适当的措施抑制细胞壁酶活性延长浆果的贮藏期是非常重要的。本研究以巨峰葡萄为原料,

收稿日期: 2013-07-19 * 通讯联系人

作者简介: 朱丹实(1978-), 女, 博士研究生, 讲师, 研究方向: 农产品贮藏加工。

基金项目: 辽宁省食品安全重点实验室开放课题(LNSAKF2011026); 辽宁省食品质量与安全优秀教学团队项目(SPCX12)。

主要考察葡萄在成熟过程中不同冷藏温度对葡萄中PE、EGase、endo-PG和exo-PG活性的影响,为采取有效的酶活性抑制方法,降低浆果软化,延长葡萄贮藏期提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜巨峰葡萄(*Vitis vinifera*×*V. labrusca*)于2012年8月下旬采自锦州果树农场,采收后立即运回渤海大学农产品保鲜加工研究中心,挑选果实大小均一,成熟度基本一致,无病虫害、无机械损伤的葡萄果穗作为实验原料,分为0℃和4℃两组贮藏,葡萄冷藏期间,每7天测定1次各项指标,每个处理重复3次;聚乙二醇、亚硫酸氢钠、醋酸钠、氯化钠、醋酸、硼酸、硼酸盐、氰基乙酰胺、EDTA、氢氧化钠、柠檬酸、磷酸盐、CMC等均为国产分析纯;D-(+)-半乳糖醛酸,BR(沃凯);多聚半乳糖醛酸分子量25000~50000,美国Alfa Aesar公司。

Sorall biofuge stators冷冻高速离心机 Thermo Scientific有限公司;SHA-2冷冻水浴恒温振荡器 金坛市瑞华仪器有限公司;UV-2550紫外-可见分光光度计 岛津仪器有限公司;PL303电子天平、FE20实验室pH计 梅特勒-托利多仪器有限公司;DK-98-IIH电热恒温水浴锅 天津市泰斯特仪器有限公司;乌氏粘度计 上海森地科学仪器设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 粗酶液的提取 参考Zhou等^[12]测定酶活性的方法,略有改进。取60g冷冻的葡萄果肉组织,加入60mL冷的12%的聚乙二醇和0.2%的亚硫酸氢钠溶液在冰浴中研磨成匀浆。匀浆在13000×g条件下离心10min,用4℃的0.2%的硫酸氢钠水溶液洗涤沉淀。将沉淀平均分成3份,分别提取PE、(endo-PG和exo-PG)、EGase。对于endo-PG和exo-PG,将沉淀在22.5mL冷的含有0.5mol/L的NaCl的50mmol/L的醋酸钠缓冲溶液(pH5)在4℃下振荡1h。将上清液用50mmol/L的醋酸钠缓冲液按1:1和1:20的比例稀释,分别作为测定endo-PG和exo-PG活性的粗提液。

1.2.2 PE活性测定 将滤渣再悬浮到22.5mL 7.5%(w/v)NaCl溶液中,用0.75%的EDTA调节pH为6.5,在4℃下放置10min。13000×g、10min离心后收集上清液。取5mL酶的粗提液,加入到20mL 1%(w/v)果胶液中,在30℃下用0.01mol/L NaOH滴定,保持pH在7.4,测定10min,以NaOH的消耗量来确定酶活性。酶活力单位($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 10\text{min}^{-1}$):以每10min单位鲜果实消耗0.01mol/L NaOH的量表示酶活性。

1.2.3 EGase活性测定 采用粘度法,利用乌氏粘度计测定。将滤渣置于22.5mL用0.1mol/L的柠檬酸磷酸盐缓冲液配成的含有1mol/L NaCl、pH为6.0的溶液中,在4℃下振荡1h,然后13000×g、10min离心,将上清液作为粗提取液。取5mL上清液与10mL含0.2%(w/v)的CMC柠檬酸磷酸盐缓冲液反应。酶活力单位($\text{s} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$):以每小时每单位鲜果实酶提取液反应的粘度变化量表示酶活性。

1.2.4 Exo-PG活性测定 取0.75mL酶提取液,加入

到等体积的用50mmol/L的醋酸钠(pH5.5)缓冲液配成的0.5%的多聚半乳糖醛酸溶液(pH4.4)即取反应溶液1.5mL,30℃放置18h。加入10mL硼酸盐缓冲剂(0.1mol/L, pH9.0)和1.5mL 1%氰基乙酰胺,煮沸10min,冷却,在274nm下测吸光值,重复3次。用半乳糖醛酸溶液做标准曲线。酶活力单位($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$):以每小时单位鲜果实重产生的半乳糖醛酸的量表示酶活性。

1.2.5 Endo-PG活性测定 采用粘度法,利用乌氏粘度计测定。将6mL的酶提取液和9mL用50mmol/L的醋酸钠缓冲液配成的2%的多聚半乳糖醛酸,30℃放置18h。酶活力单位($\text{s} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$):以每小时单位鲜果实酶提取液反应粘度的变化量表示酶活性。

1.3 数据处理

采用SPSS 19.0软件对数据进行误差和显著性分析,利用Origin Pro 8作图。

2 结果与讨论

2.1 不同温度下葡萄果胶酯酶活性变化

在0℃和4℃贮藏时,巨峰葡萄的PE变化如图1所示。由图1可以看出,葡萄由室温下分别放入0℃和4℃冷库以后,PE活性在贮藏初期随着贮藏时间的延长急剧下降,20~30d后逐渐回升,此时葡萄的质地变化较采摘后已有变化较大,组织明显变软。在50d左右,PE的活性达到较高的峰值,此时4℃贮藏的葡萄几乎全部腐败,发霉现象比较严重。0℃贮藏的葡萄PE活性在贮藏65d后略有上升,贮藏至70d时葡萄几乎全部腐烂。从图1中可以看出,0℃和4℃贮藏葡萄的PE活性变化趋势基本一致,而且差异大多不显著($p>0.05$)。这说明虽然感官上0℃和4℃贮藏葡萄质地变化的差异和腐烂的快慢程度不同,但较低的温度条件对与PE变化的影响并不大。这可能是由于PE活性只受一定温度范围的影响,在4℃以下低温条件下,PE酶的活性几乎不受到温度的影响。PE在葡萄贮藏初期下降明显,可能是由于中PE具有启动PG活性的作用^[13],在果胶物质降解和果实软化中起辅助作用。

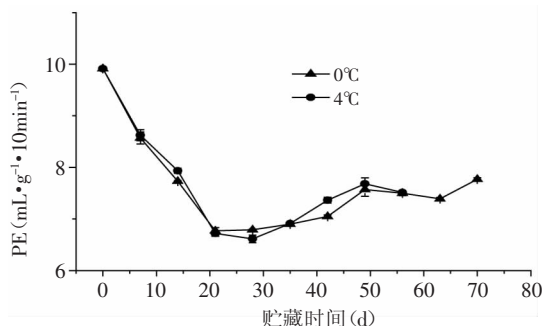


图1 冷藏温度对葡萄果胶酯酶活性的变化的影响

Fig.1 The effect of different cold temperature on the activity of PE in grape during storage

2.2 葡萄在不同温度下葡聚糖内切酶活性变化

0℃和4℃贮藏时巨峰葡萄的EGase变化如图2所示。从图2可以看出,葡萄由室温分别放入0℃和4℃冷库中,开始几天EGase活性变化不大,随着贮藏时间的延长,两种贮藏温度下的EGase的活性都呈现两

次先升高后降低的趋势。EGase由于基因表达的复杂性^[14],在葡萄细胞中天然底物尚不明确。在细胞壁中,EGase的底物可能包括木葡聚糖、非晶体纤维素表面部位,也可能包括葡聚甘露糖,其上由连续的1,4- β -D-糖苷键连接成的葡聚糖有利于底物与酶的结合^[8],然而确切的EGase作用机理仍不清楚。从图2中可以看出,由于受温度影响,4℃贮藏EGase活性两次峰值出现时间均比0℃葡萄贮藏提前两周,导致4℃葡萄腐烂提前,贮藏期相对较短,说明EGase与葡萄质地变化腐烂过程密切相关。因此,推断在葡萄贮藏过程中采用合适的方法推迟EGase活性升高,可以延长葡萄的贮藏期。

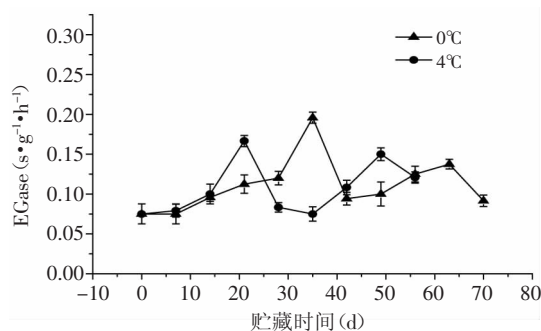


图2 冷藏温度对葡萄葡聚糖内切酶活性的变化的影响

Fig.2 The effect of different temperature on the activity of EGase in grape during cold storage

2.3 葡萄在不同温度下内切多聚半乳糖醛酸酶活性变化

Endo-PG主要在果胶分子内部随机切开 α -1,4半乳糖苷键^[15],从而生成寡聚糖及半乳糖醛酸^[15]。内切型多聚半乳糖醛酸酶可使果胶及果胶酸巨峰葡萄endo-PG活性在0℃和4℃时的变化见图3。从图3可以看出,在4℃贮藏的葡萄,endo-PG活性在贮藏初期出现了一个比较明显的峰值,之后逐渐降低,而0℃贮藏的葡萄基本属于持续波动下降的趋势。由此可见,endo-PG在贮藏初期受温度的影响较大。贮藏28d之前0℃和4℃的葡萄endo-PG活性有显著性差异($p < 0.05$),贮藏28d后,两个温度的贮藏条件对endo-PG活性的影响明显减小,除了42d时有显著性差异($p < 0.05$)外,其他时间该酶的活性均无显著性差别。总体来

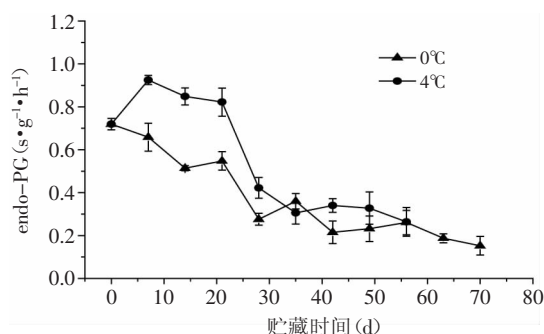


图3 冷藏温度对葡萄果胶内切酶活性的变化的影响

Fig.3 The effect of different temperature on the activity of endo-PG in grape during cold storage

看,0℃贮藏更有利于降低endo-PG活性,也更有利于减少果胶类多糖的降解。同时也说明了endo-PG是影响葡萄贮藏期的重要酶类。

2.4 葡萄在不同温度下外切多聚半乳糖醛酸酶活性变化

exo-PG是半乳糖醛酸的端切酶^[15],不仅使粘度下降,还使其还原力明显增强^[16]。巨峰葡萄exo-PG活性在0℃和4℃时的变化见图4。由图4可知,在0℃和4℃贮藏时,葡萄exo-PG活性都基本呈现持续下降的趋势。温度较低时,exo-PG的酶活也较低,说明葡萄exo-PG活性对温度条件的明显比较敏感。在整个贮藏期内,温度对葡萄exo-PG活性的影响都比较大。葡萄在0℃的贮藏期显著高于4℃($p < 0.05$),说明exo-PG对葡糖贮藏过程中质地变化及腐烂起到了较为重要的作用。

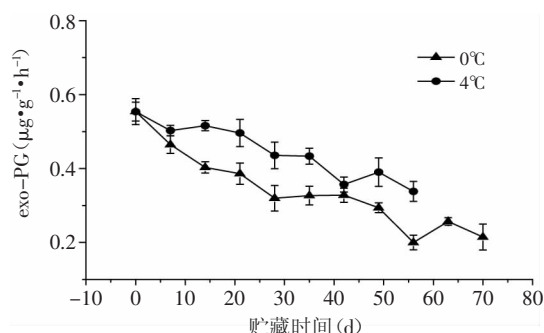


图4 冷藏温度对葡萄果胶外切酶活性的变化的影响

Fig.4 The effect of different temperature on the activity of exo-PG in grape during cold storage

3 结论

在低温冷库贮藏,0℃贮藏巨峰葡萄可以达到最高70d的贮藏期,而在相同条件下,4℃贮藏55d葡萄已基本霉腐变质而失去食用价值,这说明冰温更有利于巨峰葡萄贮藏。由0℃及4℃葡萄贮藏过程中各细胞壁酶活性变化测定结果表明:冰温可以更有效地抑制endo-PG和exo-PG酶活性的增加,延缓EGase峰值的出现,但是对PE的影响与4℃贮藏的差异性不大。通过温度条件对贮藏期影响及各种酶活性变化的结果综合来看,EGase、endo-PG和exo-PG活性的变化对葡糖贮藏过程中质地变化及腐烂起到了更为重要的作用。因此,采取适当措施抑制EGase、endo-PG和exo-PG活性的变化,对贮藏期内有效降低细胞壁多糖的降解,维持葡萄较佳的质构特性,延长葡萄贮藏期起到积极的作用。

参考文献

- [1] Payasi A, Mishra N, Chaves A, *et al.* Biochemistry of fruit softening: an overview[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2009, 15(2): 103-113.
- [2] Zoccatelli G, Zenoni S, Savoi S, *et al.* Skin pectin metabolism during the postharvest dehydration of berries from three distinct grapevine cultivars[J]. Australian Journal of Grape and Wine

(下转第337页)

加,降低血清中TC、TG含量。但有关毛豆如何参与机体的血糖、血脂代谢,以及其分子层面更深入的降糖、降脂机理,尚有待研究,但本文为其预防和治疗糖尿病及其并发症提供了实验和理论依据。

参考文献

- [1] 袁凤杰,俞琦英,朱中龙,等. 菜用大豆品质和产量性状的评述[J]. 浙江农业科学,2001,33(2):1-3.
- [2] 陈学珍,谢皓,李婷婷,等. 菜用大豆鲜荚粒性状的遗传潜力分析[J]. 中国蔬菜,2001,23(4):55-58.
- [3] 顾卫红,郑洪建,张燕,等. 菜用大豆的国际需求及科研生产动态[J]. 上海农业学报,2002,18(2):45-48.
- [4] Bartke A, Peluso MR, Moretz N, *et al.* Effects of Soy-derived diets on plasma and liver lipids, glucose tolerance, and longevity in normal, long-lived and short-lived mice[J]. *Horm Metab Res*, 2004, 36(8):550-558.
- [5] Zang Y, Sato H, Igarashi K. Anti-diabetic effects of a kaempferol glycoside-rich fraction from unripe soybean (Edamame, *Glycine max* L. Merrill. 'Jindai') leaves on KK-A(y) mice[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75(9):1677-1684.
- [6] 李丽娜,张云波,赵新宇,等. 大豆异黄酮对去睾丸大鼠血糖及血脂的调节作用研究[J]. 环境与健康杂志,2009,26(10):850-852.
- [7] Zhao-min L, Yu-ming C, Suzanne CH. Effects of soy intake

on glycemic control: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Clin Nutr*, 2011, 93:1092-1101.

- [8] Dresner L S, Wang S P, West M W, *et al.* Nitric acid inhibition stimulates the enhancement of alpha agonist-induced vasoconstriction in diabetes[J]. *Journal of Surgery Research*, 1997, 70:119-123.
- [9] 甘晶,于寒松,朴春红,等. 浆渣共熟化技术与传统技术生产豆浆营养成分的比较分析[J]. 食品工程,2012(6):103-104.
- [10] 单俊杰,段秀梅. 双肾藤醇提物降血糖活性研究[J]. 军事医学科学院院刊,2007,31(4):352-354.
- [11] Teixeira SR, Tappenden KA, Carson L. Isolated Soy Protein Consumption Reduces Urinary Albumin Excretion and Improves the Serum Lipid Profile in Men with Type 2 Diabetes Mellitus and Nephropathy Human Nutrition and Metabolism[J]. *Journal of Nutrition*, 2004, 134(8):1874-1880.
- [12] 胡才. 豆浆保健功效[J]. 养生月刊,2004(5):16-17.
- [13] Howard B V, Howard W J. Dyslip in non-insulin dependent diabetes mellitus[J]. *Endocrine Reviews*, 1994, 15(3):263-268.
- [14] Sharma B, Balbajumder C, Ror P. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46:2376-2384.
- [15] WANG Jinnchi, HU Shuhui, WANG Jihong, *et al.* Hypoglycemic effect of extra-uterine erinaceus[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2005, 85:641-646.

(上接第333页)

Research, 2013, 19(2):171-179.

- [3] 阚娟,金昌海,汪志君,等. β -半乳糖苷酶及多聚半乳糖醛酸酶对桃果实成熟软化的影响[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版,2006,27(3):76-80.
- [4] Joshua D, Jacob H, Peter L, *et al.* Pectin esterase activity and pectin methyl esterification in heated golden delicious apples[J]. *Phytochemistry*, 1995, 39(3):491-494.
- [5] 赵云峰,林河通,林娇芬,等. 果实软化的细胞壁降解酶及其调控研究进展[J]. 仲恺农业技术学院学报,2006,19(1):65-70.
- [6] Ghiani A, Onelli E, Ina R A, *et al.* A comparative study of melting and non-melting flesh peach cultivars reveals that during fruit ripening endo-polygalacturonase (endo-PG) was mainly involved in pericarp textural changes, not in firmness reduction[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(11):4043-4054.
- [7] O'donoghue E M, Huber D J. Modification of matrix polysaccharides during avocado (*Persea americana*) fruit ripening: an assessment of the role of Cx-cellulase[J]. *Physiologia Plantarum*, 1992, 86(1):33-42.
- [8] 程杰山,沈火林,孙秀波,等. 果实成熟软化过程中主要相关酶作用的研究进展[J]. 北方园艺,2008(1):49-52.
- [9] Koch J L, Nevins D J. Tomato Fruit Cell Wall: I. Use of Purified Tomato Polygalacturonase and Pectinmethylesterase to Identify Developmental Changes in Pectins[J]. *Plant Physiology*, 1989, 91(3):816-822.

- [10] 陈发河,吴光斌,冯作山,等. 葡萄贮藏过程中落粒与离区酶活性变化及植物生长调节物质的关系[J]. 植物生理与分子生物学学报,2003,29(2):133-140.
- [11] Wei J M, Ma F W, Shi S G, *et al.* Changes and postharvest regulation of activity and gene expression of enzymes related to cell wall degradation in ripening apple fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2010, 56(2):147-154.
- [12] Zhou H W, Sonogo L, Khalchitski A, *et al.* Cell Wall Enzymes and Cell Wall Changes in 'Flavortop' Nectarines: mRNA Abundance, Enzyme Activity, and Changes in Pectic and Neutral Polymers during Ripening and in Woolly Fruit[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2000, 125(5):630-637.
- [13] 胡留申,董晓颖,李培环,等. 桃果实成熟前后细胞壁成分和降解酶活性的变化及其与果实硬度的关系[J]. 植物生理学通讯,2007,43(5):837-841.
- [14] Mark H Harpster, Debra M Dawson, Donald J Nevins, *et al.* Constitutive overexpression of a ripening-related pepper endo-1,4- β -glucanase in transgenic tomato fruit does not increase xyloglucan depolymerization or fruit softening[J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 50(3):357-369.
- [15] Bartley I M, Knee M. The chemistry of textural changes in fruit during storage[J]. *Food Chemistry*, 1982, 9(1-2):47-58.
- [16] 张飞,岳田利,费坚,等. 果胶酶活力的测定方法研究[J]. 西北农业学报,2004,13(4):134-137.