

pH 值、温度和金属离子对 endo-PG 降解香蕉果胶多糖的影响

程桂平¹, 段学武², 蒋跃明^{2*}, 何生根¹, 万小荣¹

(1. 仲恺农业工程学院生命科学院, 广州 510225; 2. 中国科学院华南植物园, 广州 510650)

摘要: 从香蕉果肉中分离出水溶性果胶多糖(WSP)和酸溶性果胶多糖(ASP), 探讨了 pH 值、温度、金属离子对内切多聚半乳糖醛酸酶(endo-PG)降解果胶多糖的影响。结果表明, pH 3.7~4.6 较适于 endo-PG 的作用。在相同 pH 值下, endo-PG 对 WSP 的降解效应随香蕉果实的成熟逐渐增强, 而对 ASP 则逐渐减弱; 在 20~40℃ 内, 温度越高, endo-PG 对 WSP 和 ASP 的降解作用越强。Ca²⁺、Cu²⁺、Mg²⁺ 和 Fe³⁺ 可显著抑制 endo-PG 对果胶多糖的降解; 而 Fe²⁺ 和 Mn²⁺ 则起显著的促进作用。pH 值、温度、金属离子等共同调控了 endo-PG 对果胶多糖的降解作用。

关键词: 内切多聚半乳糖醛酸酶(endo-PG); 香蕉; 果胶多糖; 降解

中图分类号: Q946.562

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2010)01-0021-06

Effects of pH, Temperatures and Metal Ions on the Degradation of Banana Pectin Polysaccharides by Endo-polygalacturonase

CHENG Gui-ping¹, DUAN Xue-wu², JIANG Yue-ming^{2*}, HE Sheng-gen¹, WAN Xiao-rong¹

(1. College of Life Sciences, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;

2. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: Water-soluble pectin (WSP) and acid-soluble pectin (ASP) polysaccharides were isolated from pulp of banana at different mature stages, and then the effects of pH, temperatures and metal ions on the degradation of WSP and ASP caused by endopolygalacturonase (endo-PG) were studied. The results showed that the optimum pH of endo-PG was from 3.7 to 4.6. At the same pH, the degradation of WSP by endo-PG increased with banana maturity, but that of ASP decreased. The degradation of WSP and ASP by endo-PG increased with the temperature from 20°C to 40°C. Moreover, Ca²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺ and Fe³⁺ inhibited significantly the degradation of WSP and ASP, but Fe²⁺ and Mn²⁺ enhanced significantly. It was suggested that pH, temperatures and metal ions could cooperate the degradation of pectin polysaccharides of banana.

Key words: Endopolygalacturonase (endo-PG); Banana; Pectin polysaccharide; Degradation

中国是香蕉生产的主要国家, 2005 年的总产量占世界的 10%。由于香蕉果实采收后容易软化腐烂, 不耐贮运, 货架期较短, 研究香蕉果实的软化机制及其调控措施具有重要的实践意义。果实软化主要是由于细胞壁的降解, 特别是果胶多糖的溶解和降解聚合^[1-2]。果胶多糖是果实细胞壁中胶层和初生壁的主要组成物质, 维持着果实的物理结构和初

生壁机械强度^[3]。果胶多糖的降解使细胞壁结构改变, 细胞膨压丧失, 导致果实软化^[4-5]。细胞壁水解酶降解细胞壁多糖, 使细胞壁结构改变, 导致果实软化^[6-7]。在香蕉成熟软化过程中有多种细胞壁水解酶参与, 如多聚半乳糖醛酸酶(Polygalacturonase, PG)、果胶甲酯酶(Pectin methylesterase, PME)、果胶裂解酶(Pectate lyase, PL)、纤维素酶(Cellulose)、β-半

收稿日期: 2009-04-09 接受日期: 2009-06-24

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(30425040); 广东省联合基金项目(U0631004); 仲恺农业工程学院引进优秀人才科研启动基金项目(G2360276); 国家自然科学基金项目(30800077)资助

* 通讯作者 Corresponding author, email: ymjiang@scbg.ac.cn

乳糖糖苷酶(β -Galactosidase)等^[8-11]。其中,PG 可催化果胶多糖分子中的 α -1,4-聚半乳糖醛酸的裂解,导致果胶多糖的降解,促进果实软化^[12]。PG 活性通常受 pH 值、温度、金属离子等因素的影响^[13],通过调控 PG 活性可控制果实的软化进程。本研究从不同成熟阶段的香蕉果实中分离出水溶性和酸溶性果胶多糖,探讨香蕉果实软化过程中 pH、温度、金属离子在内切 PG(endo-PG)对果胶多糖降解中的作用,为阐明内切 PG 在香蕉果实软化过程中的作用机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

香蕉(*Musa* spp., AAA group 'Brazil')果实采自广东省农业科学院果树研究所,成熟度约为 7~8 成。挑选大小均匀、无病虫害及机械伤的果实用 0.1% 施宝克浸果 3 min,在室温下自然晾干 2 h,然后用 0.03 mm 聚乙烯薄膜袋单果独立包装、扎口置于(25±1)℃下贮藏。每天观察果实成熟情况,并依据果皮颜色将果实分为 5 个时期:刚采收(I,全绿,硬度 > 10 N)、褪绿(II,硬度 8~10 N)、绿 > 黄(III,硬度 4~6 N)、黄 > 绿(IV,硬度 2~4 N)、全黄(V,硬度 < 2 N)。对每个时期果实取样,每次取 10 根果指,将果肉切碎后用液氮迅速冷冻,置于-80℃保存备用。

1.2 醇不溶性固形物的制备

参照 Vierhuis 等^[14]方法,取香蕉果肉组织 100 g,立即加入 300 mL 95% (v/v)乙醇,用高速匀浆机(FSH-2,江苏省金坛市宏华仪器厂)匀浆,于沸水浴中保温 15 min。冰浴冷却后将匀浆置于布氏漏斗中,真空抽滤。滤渣依次用 200 mL 氯仿/甲醇(1:1, v/v)混合液和 200 mL 丙酮溶液反复搅拌冲洗。洗涤后的不溶性残基再用 70% 乙醇冲洗过滤,直至滤液不含糖为止(用苯酚硫酸法检测)。滤渣按 Shiga 和 Lajolo^[15]方法除去淀粉,加入 70% 乙醇加以沉淀。沉淀物于 70% 乙醇中透析后,40℃烘干至恒重,收集得到醇不溶性固形物(AIR),于干燥器中保存备用。

1.3 细胞壁多糖的分部提取

参照 Majumder 和 Mazumdar^[16]的方法,取不同时期香蕉果肉的 AIR 5 g,加入 30 mL 双蒸水于 25℃下搅拌提取 1 h,悬浊液经 4 000 × g 离心

15 min后,收集沉淀。沉淀用水提取 2 次,收集合并上清液,加入 95% 乙醇至溶液中乙醇浓度为 70%,以沉淀果胶多糖,收集沉淀并冷冻干燥后即得水溶性果胶多糖(WSP)。

上述水不溶性沉淀物用 100 mL 0.5 mol/L HCl 在 60℃搅拌 1 h,悬浊液经 4 000 × g 离心 15 min 后,收集上清液;沉淀用 0.5 mol/L HCl 提取 2 次,收集合并上清液,加入适量碱中和,加入 95% 乙醇至溶液中乙醇浓度为 70% 以沉淀果胶多糖,收集沉淀;沉淀物于 70% 乙醇中透析后冷冻干燥即得酸溶性果胶多糖(ASP)。

1.4 pH 值对 PG 的影响

取干燥的 WSP 和 ASP 各 500 mg,用蒸馏水配制成 0.5% 溶液,经 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法检测,该果胶多糖溶液中不存在还原糖。

果胶多糖降解的反应体系为 0.2 mL 0.5% 果胶多糖、0.7 mL 0.04 mol/L 醋酸钠缓冲液(pH 3.7、4.0、4.6、5.0、5.8)和 0.1 mL 5 U mL⁻¹内切 PG(购于 Sigma 化学公司,来源于 *Aspergillus niger*,粉末状,活性 > 1 U mg⁻¹)。在 40℃保温 1 h 后,测定反应液中生成的还原基含量。

1.5 温度对 PG 的影响

反应体系为 0.2 mL 0.5% 果胶多糖、0.7 mL 0.04 mol/L 醋酸钠缓冲液(pH 4.0)和 0.1 mL 5 U mL⁻¹ PG,分别于 20、25、30、35 和 40℃保温 1 h 后测定反应液中生成的还原基含量。

1.6 Ca²⁺对 PG 的影响

反应体系为 0.2 mL 0.5% 果胶多糖、0.1 mL 2.5 U mL⁻¹ PG、0.1 mL 不同浓度的 Ca²⁺(0、1、5、10 mmol/L)和 0.04 mol/L 醋酸钠缓冲液(pH 4.0,使整个反应体系总体积为 1 mL)。经 40℃保温 1 h 后测定反应液中生成的还原基含量。

1.7 Ca²⁺和 EDTA 对 PG 的影响

反应体系和操作方法同上,只是 Ca²⁺为 1 mmol/L 或 0.1 mL 的 1 mmol/L Ca²⁺ + 0.1 mL 的 10 mmol/L EDTA。

1.8 其它金属离子对 PG 的影响

反应体系和操作方法同上,金属离子为 0.1 mL 的 10 mmol/L NaCl、KCl 和 1 mmol/L MnCl₂、Zn(CH₃COO)₂、CuSO₄、BaCl₂·2H₂O、MgCl₂·6H₂O、FeSO₄·7H₂O 和 FeCl₃。

1.9 还原基含量的测定

采用 DNS 方法^[17]测定。取 1 mL 样品加入 2 mL DNS 试剂,沸水浴 5 min 后立即用流水冷却,然后测定 540 nm 处的光吸收值。对照用等体积的蒸馏水代替。以葡萄糖为标样,计算样品中的还原基含量。

1.10 数据分析

所有试验均 3 次重复,结果采用 SPSS 软件处理,以平均数 ± 标准误表示。采用多重比较不同处理间的数据,显著水平为 0.05。

2 结果和分析

2.1 pH 对 PG 的影响

由图 1 可知, pH 3.7 下 PG 降解 WSP 和 ASP 所产生的还原基量较其它 pH 下多。另外, pH 值为 3.7 时, WSP 所产生的还原基量随香蕉果实成熟逐

渐增多,而 ASP 反之。

2.2 温度对 PG 的影响

在 20~40℃ 内,随温度升高, II~V 成熟期的 WSP 产生的还原基数量增加;40℃ 时, WSP 产生的还原基量随着香蕉果实的成熟呈上升趋势(图 2)。温度对 PG 降解 ASP 的影响与 WSP 相似,即随着温度升高,还原基量逐渐增加;但在 40℃ 下,随着香蕉果实成熟, ASP 产生的还原基量却降低(图 2)。

2.3 金属离子对 PG 的影响

2.3.1 Ca²⁺ 和 EDTA 的影响

如图 3 所示,随着 Ca²⁺ 浓度增加, PG 对各时期的 WSP 和 ASP 所产生的还原基量总体呈降低趋势,表明 Ca²⁺ 可明显抑制 PG 对 WSP 和 ASP 的降解;并且浓度越大,抑制作用越明显。

Ca²⁺ 和 EDTA 对 PG 降解 WSP 和 ASP 的作用如图 4 所示。Ca²⁺ 和 EDTA 对各成熟阶段的 WSP

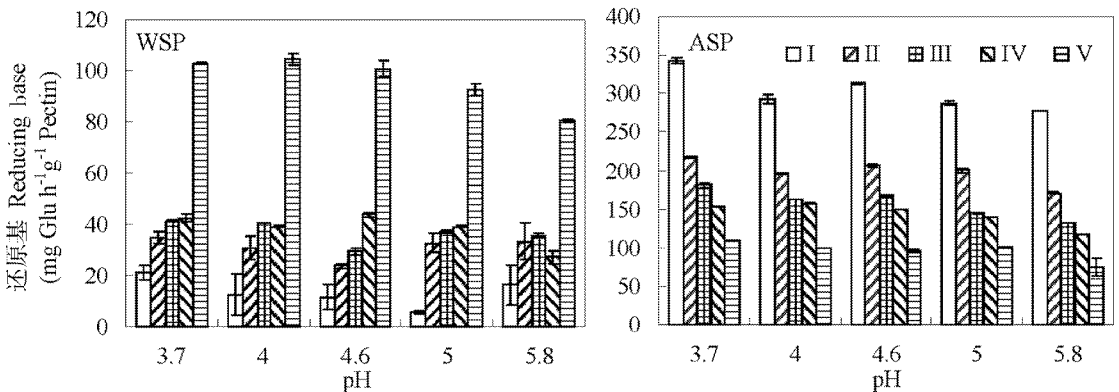


图 1 pH 值对 PG 降解 WSP 和 ASP 的影响

Fig. 1 Effects of pH on the WSP and ASP degradation by PG

I~V 分别代表香蕉果实的 5 个成熟期。其他图表同。I~V present five mature stages of banana fruits. The same as following Figures and Tables.

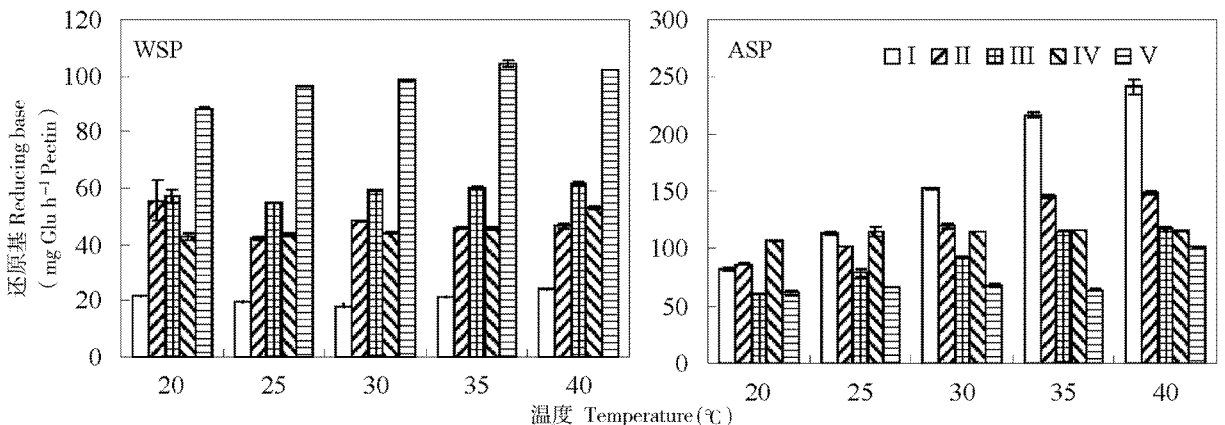
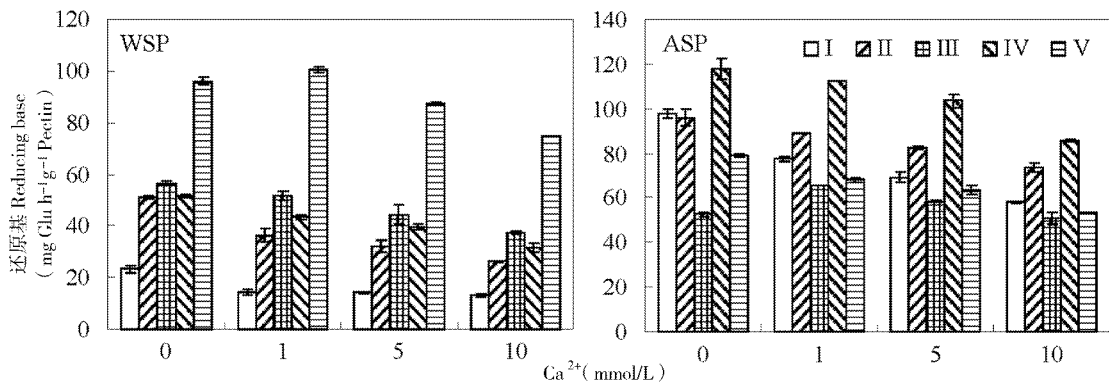
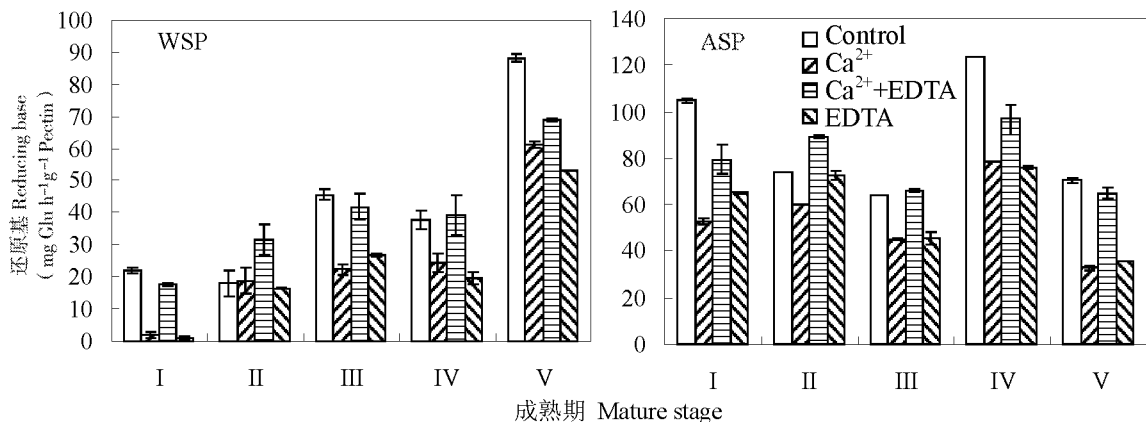


图 2 温度对 PG 降解 WSP 和 ASP 的影响

Fig. 2 Effects of temperatures on the WSP and ASP degradation by PG

图 3 Ca^{2+} 对 PG 降解 WSP 和 ASP 的影响Fig. 3 Effects of Ca^{2+} on the WSP and ASP degradation by PG图 4 Ca^{2+} 和 EDTA 对 PG 降解 WSP 和 ASP 的影响Fig. 4 Effects of Ca^{2+} and EDTA on the WSP and ASP degradation by PG

降解均有抑制作用。不过,当 Ca^{2+} 和 EDTA 同时存在时,除成熟期 II 外,PG 对 WSP 降解的抑制作用均明显降低。 Ca^{2+} 和 EDTA 对 ASP 的效应与 WSP 相似。表明 EDTA 可减轻 Ca^{2+} 对 PG 降解 WSP 和 ASP 的抑制作用。

2.3.2 其它金属离子的影响

由表 1 可知, Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Fe^{3+} 存在时,PG 降解 WSP 所产生的还原基量较低,说明它们抑制了 PG 对 WSP 的降解,以 Cu^{2+} 的抑制作用最显著。其它金属离子均促进 PG 对 WSP 的降解,以 Fe^{2+}

表 1 金属离子对 PG 降解 WSP 的影响

Table 1 Effects of metal ions on the degradation of WSP by PG

金属离子 Metal ions (mmol/L)	相对还原基量 Relative reducing base (%)				
	I	II	III	IV	V
对照 Control	100cd	100ef	100de	100f	100e
NaCl 10	162.27bc	179.95bc	170.89bc	183.56c	112.45de
KCl 10	151.89bc	168.08c	157.48bcd	184.73c	119.28de
MnCl_2 1	219.16b	223.21ab	211.47a	257.70b	153.54b
$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 1	161.44bc	116.79de	157.64bcd	116.23e	107.94e
CuSO_4 1	0.02f	0.05g	0.06f	0.03h	0.09g
BaCl_2 1	150.23bc	147.09cd	148.20cd	150.37d	130.63c
MgCl_2 1	19.01ef	95.11e	97.85de	57.62g	80.17f
FeSO_4 1	295.15a	228.14a	219.42a	286.89a	197.17a
FeCl_3 1	70.50de	62.21f	68.04d	100.46f	67.73f

同一列数据后不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下表同。Data followed different letters within the same column indicated significant difference at 0.05 level. The same as following Table.

表 2 金属离子对 PG 降解 ASP 的影响

Table 2 Effects of metal ions on the degradation of ASP caused by PG

金属离子 Metal ions (mmol/L)	相对还原基量 Relative reducing base (%)				
	I	II	III	IV	V
对照 Control	100b	100b	100c	100c	100bc
NaCl 10	115.39b	88.09bc	78.07d	114.40bc	88.10c
KCl 10	108.17b	76.52cd	79.47d	120.21bc	82.36c
MnCl ₂ 1	111.48b	133.40a	133.37a	149.81a	118.07a
Zn(CH ₃ COO) ₂ 1	109.47b	88.96bc	73.53d	117.26bc	79.91c
CuSO ₄ 1	20.93d	17.29f	12.61g	31.41e	14.01e
BaCl ₂ 1	110.18b	90.78bc	115.66b	110.18c	85.12c
MgCl ₂ 1	51.82c	71.39d	60.36e	88.62cd	47.28d
FeSO ₄ 1	138.00a	135.14a	141.26a	149.65a	127.85a
FeCl ₃ 1	62.47c	40.16e	31.52f	53.29de	28.68de

和 Mn^{2+} 的促进作用最为显著。

Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 等金属离子对 PG 降解 ASP 的效应与 WSP 相似(表 2)。不过,其它金属离子(如 Na^+ 、 K^+ 、 Zn^{2+} 等)在果实成熟的某些阶段可对 PG 降解 ASP 起促进作用,而在另一个阶段则起抑制作用。

3 讨论

果实的软化与细胞壁中的果胶多糖的溶解和解聚合直接相关^[3-5];而果胶多糖的变化可能是细胞壁水解酶,如 PG、PME、 β -Gal 和纤维素酶等共同作用的结果^[2]。PG 在细胞壁结构改变中起重要作用,可催化果胶多糖分子中的 α -1,4-聚半乳糖醛酸的裂解,促进果实软化^[12]。Lohani 等^[2]报道,随香蕉果实软化进程,PG 活性逐渐增加;外源乙烯或 1-MCP 在促进和抑制香蕉果实软化的同时,PG 活性也相应地发生变化^[2],这说明 PG 在香蕉软化过程中起作用。

本研究从不同成熟阶段的香蕉果实中提取水溶性和酸溶性果胶,结果表明,偏酸性和 40℃ 下有利于 PG 对果胶多糖的降解(图 1)。这与 Pathak 等^[13]的研究结果一致。因此,适宜的低温、偏碱性条件和抑制 PG 活性的金属离子能减缓香蕉果胶多糖的降解。在相同 pH 和温度下,随香蕉果实软化加深,PG 降解 WSP 所产生的还原基含量显著增加(图 1 和 2),这表明在果实软化后期,PG 对 WSP 的降解效应最为明显,这可能是因为随果实软化 WSP 逐渐解聚合转变为分子量较小的多聚物,从而有利于 PG 的作用。

本研究还表明,在相同 pH 和温度下, Ca^{2+} 、

Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Fe^{3+} 可显著抑制 PG 对果胶多糖的降解,而 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 则起显著的促进作用(图 3,表 1 和 2)。前人报道 Ca^{2+} 可抑制果实软化^[18],表明 Ca^{2+} 与果胶多糖降解相关。肖静等^[19]的研究表明果胶多糖多聚物链可通过 Ca^{2+} 相互交连、牢固结合,形成波状的“蛋匣”结构。在本研究中, Ca^{2+} 抑制了 PG 降解果胶多糖,可能是因为 Ca^{2+} 增加了果胶多糖自身的交联,从而抑制了 PG 的作用。另外,本研究还表明,金属螯合剂 EDTA 的加入可减轻 Ca^{2+} 的抑制作用(图 4),这进一步证实了 Ca^{2+} 对 PG 有抑制作用。 Cu^{2+} 对 PG 介导的果胶多糖降解具有抑制作用,与 Wehr 等^[20]报道的一致。而其它金属离子对 PG 的影响机制还不明确,有待进一步研究。Almeida 和 Huber 研究表明,在番茄 (*Solanum lycopersicum*) 果实成熟过程中,非原生质体中的 pH 和金属离子浓度均有变化,并进一步推论这是决定番茄果实细胞壁代谢的潜在因子^[21]。综上所述,pH、温度、金属离子等均可影响 PG 的活性,这些因素相互影响、相互协调共同调控 PG 对果胶多糖的降解作用。适宜的低温、偏碱性条件和抑制 PG 活性的金属离子等方法可减缓 PG 对香蕉果胶多糖的降解。

参考文献

- [1] Brummell D A, Harpster M H. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants [J]. *Plant Mol Biol*, 2001, 47: 311-340.
- [2] Lohani S, Trivedi P K, Nath P. Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA [J]. *Postharv Biol Technol*, 2004, 31: 119-126.

- [3] Sirisomboon P, Tanaka M, Fujita S, et al. Relationship between the texture and pectin constituents of Japanese pear [J]. *J Texture Study*, 2000, 31(6): 679–690.
- [4] Duan X W, Cheng G P, Yang E, et al. Modification of pectin polysaccharides during ripening of postharvest banana fruit [J]. *Food Chem*, 2008, 111: 144–149.
- [5] Prasanna V, Prabha T N, Tharanatha R N. Fruit ripening phenomena — An overview [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2007, 47: 1–19.
- [6] Nikolic M V, Mojovic L. Hydrolysis of apple pectin by the coordinated activity of pectic enzymes [J]. *Food Chem*, 2007, 101: 1–9.
- [7] Payasi A, Misra P C, Sanwal G G. Purification and characterization of pectate lyase from banana (*Musa acuminata*) fruits [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67: 861–869.
- [8] Asif M H, Nath P. Expression of multiple forms of polygalacturonase gene during ripening in banana fruit [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2005, 43: 177–184.
- [9] Payasi A, Sanwal G G. Pectate lyase activity during ripening of banana fruit [J]. *Phytochemistry*, 2003, 63(3): 243–248.
- [10] Ali Z M, Chin L H, Lazan H. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits [J]. *Plant Sci*, 2004, 167(2): 317–327.
- [11] Imsabai W, Ketsa S, van Doorn W G. Physiological and biochemical changes during banana ripening and finger drop [J]. *Postharv Biol Techn*, 2006, 39: 211–216.
- [12] Villarreal N M, Rosli H G, Martinez G A, et al. Polygalacturonase activity and expression of related genes during ripening of strawberry cultivars with contrasting fruit firmness [J]. *Postharv Biol Techn*, 2008, 47: 141–150.
- [13] Pathak N, Mishra S, Sanwal G G. Purification and characterization of polygalacturonase from banana fruit [J]. *Phytochemistry*, 2000, 54: 147–152.
- [14] Vierhuis E, Schols H A, Beldman G, et al. Isolation and characterisation of cell wall material from olive fruit (*Olea europaea* cv. Koroneiki) at different ripening stages [J]. *Carbohydr Polym*, 2000, 43: 11–21.
- [15] Shiga T M, Lajolo F M. Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) — Composition and structure [J]. *Carbohydr Polym*, 2006, 63: 1–12.
- [16] Majumder K, Mazumdar B C. Changes of pectic substances in developing fruits of cape-gooseberry (*Physalis peruviana* L.) in relation to the enzyme activity and evolution of ethylene [J]. *Sci Hort*, 2002, 96: 91–101.
- [17] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Anal Chem*, 1959, 3: 426–428.
- [18] Wu C E(吴彩娥), Wang W S(王文生), Kou X H(寇晓虹), et al. Effect of CaCl₂ and 6-BA solution on softening, browning and activity of related enzyme in postharvest jujube fruits [J]. *Trans Chin Soc Agri Eng(农业工程学报)*, 2001, 17(5): 127–130. (in Chinese)
- [19] Xiao J(肖静), Yang H Q(杨洪强). The physiological mechanism of calcium delaying fruit senescence [J]. *Plant Physiol Commun(植物生理学通讯)*, 2003, 39(4): 380–385. (in Chinese)
- [20] Wehr J B, Menzies N W, Blamey F P C. Inhibition of cell-wall autolysis and pectin degradation by cations [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2004, 42: 485–492.
- [21] Almeida D P F, Huber D J. Apoplastic pH and inorganic ion levels in tomato fruit: A potential means for regulation of cell wall metabolism during ripening [J]. *Physiol Plant*, 1999, 105: 506–512.