

# 柿树乙醇脱氢酶活性与可溶性单宁含量的关系

刘朝蓬<sup>1</sup>, 郑仲明<sup>2</sup>, 梁银娜<sup>1</sup>, 李 宝<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094; <sup>2</sup> 北京市房山区林业局林果站, 北京 102400)

**摘 要:** 研究了 4 种不同脱涩类型柿 (*Diospyros kaki* Thunb.) 果实和叶片中的可溶性单宁含量、乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH) 活性和 ADH 最适反应温度, 以了解 ADH 在脱涩过程中的作用。结果表明: 不完全甜柿和完全甜柿果实发育前期, 可溶性单宁含量逐渐降低, ADH 活性逐渐增高, 到果实基本完成脱涩后, ADH 活性又开始降低, 在不完全甜柿中变化较大; 涩柿和不完全涩柿在果实近熟期, 可溶性单宁含量有所下降, 但不能完成脱涩, 且 ADH 活性较低。叶片发育过程中, 可溶性单宁含量的变化与 ADH 没有相关性。ADH 的最适反应温度在 25℃ 左右。ADH 与柿果实脱涩有一定关系。

**关键词:** 柿; 可溶性单宁; 乙醇脱氢酶; 脱涩

**中图分类号:** S 665.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 05-0741-06

## Relationship Between Activity of Alcohol Dehydrogenase and Soluble Tannin in Persimmon

LIU Chao-peng<sup>1</sup>, ZHENG Zhong-ming<sup>2</sup>, LIANG Yin-na<sup>1</sup>, and LI Bao<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; <sup>2</sup> Forestry & Fruit Station of Forestry Bureau, Fangshan District of Beijing Municipality, Beijing 102400, China)

**Abstract:** Content of soluble tannin and activity of alcohol dehydrogenase and the optimum temperature of alcohol dehydrogenase (ADH) in 4 different type fruits of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) were measured in order to assess the effects of ADH on loss of astringency of persimmon fruits. In the early stage of fruit development, the pollination-constant/nonastringent (PCNA) and the pollination-variant/nonastringent (PVNA) soluble tannin content decreased, and the activity of ADH increased, but the activity of ADH decreased when the fruits become non-astringent, especially in PVNA-type fruits. The content of soluble tannin of pollination-constant/astringent (PCA) and pollination-variant/astringent (PVA)-type fruits decreased, and the activity of ADH was also in lower level in the mature stage. During the leaf development, there is no significant relationship between ADH and soluble tannin. The optimum temperature of ADH is 25℃. ADH plays a role to some extent in loss of astringency of persimmon fruits.

**Key word:** *Diospyros kaki* Thunb.; soluble tannin; alcohol dehydrogenase; deastringency

柿 (*Diospyros kaki* Thunb.) 是中、日、韩等国重要的栽培树种, 依据能否自然脱涩以及种子与果实脱涩和果肉褐斑形成的关系, 将柿分为 4 种类型, 即: 完全甜柿 (pollination-constant/nonastringent, PCNA)、不完全甜柿 (pollination-variant/nonastringent, PVNA)、不完全涩柿 (pollination-variant/astringent, PVA) 和完全涩柿 (pollination-constant/astringent, PCA), 不同类型果实脱涩机制不尽相同 (Sugiura & Tomana, 1983; Sugiura, 2005)。

在离体或采后果实中, 乙醛可直接与可溶性单宁起缩合反应使柿果脱涩 (Pesis & Ben-Aire, 1984; Matsuo et al, 1991; Taira et al, 1992), 是柿果实脱涩的原因之一。

收稿日期: 2008 - 03 - 24; 修回日期: 2008 - 04 - 29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671713); 中国农业大学科研启动基金项目 (2005061)

\*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: libao@cau.edu.cn)

乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH) 可参与鳄梨 (Kanellis et al, 1991)、葡萄 (Labat et al, 2000)、马铃薯 (Pinheiro et al, 2007) 等果实成熟调节等多种生理生化代谢, 在柿果实脱涩过程中也起着重要作用 (Yanada et al, 2002)。

目前, 关于果实发育期间 ADH 活性与可溶性单宁含量的关系, 报道较少。作者进行 ADH 在亲代和子代之间的遗传特征方面的研究, 希望通过对不同脱涩类型柿树果实和叶片发育过程中的可溶性单宁含量、ADH 活性和最适反应温度进行研究, 探讨 ADH 活性与可溶性单宁含量之间的关系, 为进一步研究 ADH 基因在果实发育期不同器官间的差异表达提供参考依据。

## 1 材料与方法

试验于 2007 年 5—10 月进行。品种为磨盘柿、西村早生、花御所、次郎和刀根早生。其中西村早生于 9 月 16 日成熟, 刀根早生于 10 月 2 日成熟, 磨盘柿、花御所和次郎于 10 月 18 日成熟。试材采自北京市房山区河北镇半壁店村果园, 常规管理。

柿果实从 5 月中旬至 8 月中旬每隔 30 d 取样 1 次, 8 月底至 10 月中旬每隔 15 d 取样 1 次, 叶片取自邻果部位。

可溶性单宁提取和测定参照 Taira (1996) 的方法。取 2 g 果实和 0.5 g 叶片, 加入 20 mL 80% 的甲醇, 研磨成匀浆,  $3\ 600\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 取上清液, 沉淀部分再加入 80% 甲醇洗涤、离心, 取上清液, 最后将两次得到的上清液定容至 50 mL。福林—丹尼斯法 (Folin-Denis) 测定可溶性单宁含量。重复 3 次。

乙醇脱氢酶的提取和测定: 粗酶液的提取参照 Tao 和 Sugiura (1987) 的方法。取 5 mL 预冷的  $0.05\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-马来酸提取缓冲液 (含 20% 甘油、10% 可溶性 PVP K-30、 $10\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  - 巯基乙醇、0.5% Triton-100, pH 8.5), 在冰浴的条件下将样品研磨成匀浆,  $0 \sim 12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min, 上清液即为酶液提取物,  $-40\ ^\circ\text{C}$  保存, 重复 3 次。乙醇脱氢酶活性的测定参照刘存德等 (1980) 的方法, 反应总体积 3 mL, 其中含有 2.7 mL 的  $0.1\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Gly-NaOH 缓冲液 (pH 9.0), 0.1 mL 的  $\text{NAD}^+$  ( $5\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 0.1 mL 95% 乙醇, 对照不加乙醇, 用无离子水 0.1 mL 代替, 反应应用 0.1 mL 酶液起动。在 340 nm 下测定其光密度的变化, 酶活性以在 340 nm 下光密度改变 0.1 为一个活性单位计算。

乙醇脱氢酶最适反应温度测定参照霍丹群等 (2006) 的方法。将次郎果实粗酶液分别于 10、15、20、25、30、35  $^\circ\text{C}$  温度下测定 ADH 活性, 绘制酶活力—温度曲线, 确定酶促反应的最适温度。

## 2 结果与分析

### 2.1 果实中可溶性单宁含量与乙醇脱氢酶活性变化的关系

图 1 表明, 果实发育初期 (6 月中旬), 各个品种的可溶性单宁含量相近, 在 1% 左右。之后, 花御所和次郎呈下降趋势, 在果实近成熟时降至最低 (分别为 0.06% 和 0.05%)。西村早生在 7 月中旬至 8 月中旬果实中可溶性单宁含量由 1.08% 急剧下降至 0.06%, 之后维持较低水平。磨盘柿和刀根早生在前期变化不明显, 9 月中旬以后呈下降趋势, 果实成熟时在 0.5% 左右。

在供试品种果实发育初期 (6 月中旬), 没有检测到 ADH 活性。自 7 月中旬起, 磨盘柿和刀根早生 ADH 活性有波动, 于 9 月中旬达到最大值 (分别为  $1.099$  和  $1.647\ \text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  FM, 活力单位下同)。西村早生从 7 月中旬至 8 月中旬期间, ADH 活性急剧上升到最大值 (2.148), 之后开始降低。花御所和次郎 ADH 活性缓慢升高, 到 8 月底达到峰值 (分别为 0.961 和 1.176), 之后开始下降 (图 2)。

结合图 1和图 2可知, 西村早生, 花御所和次郎的可溶性单宁含量在 7月中旬至 8月底下降最明显, 而此时它们的 ADH活性均处在最高水平, 西村早生表现最为明显, 可见, ADH活性与可溶性单宁含量呈负相关。

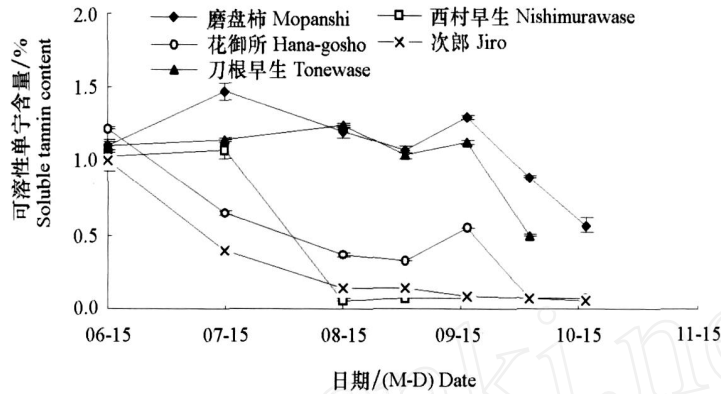


图 1 柿果实发育期间可溶性单宁含量的变化

Fig. 1 Changes in soluble tannin content during fruit development of persimmon

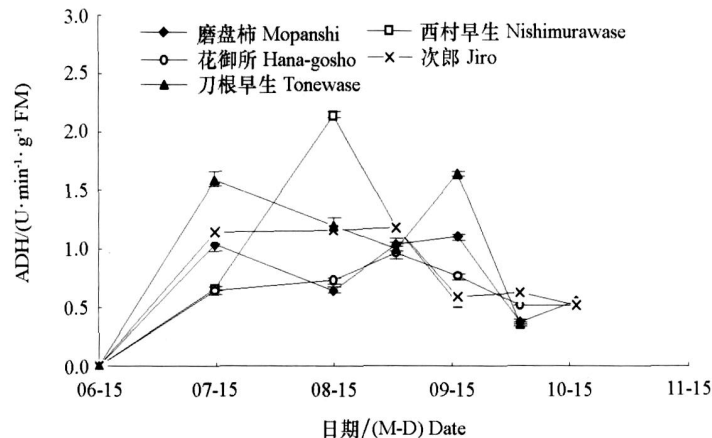


图 2 柿果实发育期间乙醇脱氢酶 (ADH) 活性的变化

Fig. 2 Changes in ADH activity during fruit development of persimmon

## 2.2 叶片中可溶性单宁含量与乙醇脱氢酶活性的变化

由图 3可知, 5月中旬至 6月中旬可溶性单宁含量变化不大, 之后开始下降, 到 7月中旬, 除花御所外其它品种都降到最低。花御所叶片中的可溶性单宁含量则一直下降至 8月底, 之后才略有上升。

叶片发育过程中 ADH活性的变化在品种间有所不同。磨盘柿在 8月底降到最低 (11.852), 之后有所增强, 10月初最高 (32.677); 刀根早生在 7月中旬降到最低 (7.799), 9月中旬达到最大 (29.394); 果实成熟后磨盘柿和刀根早生的 ADH活性又有所下降。西村早生、花御所和次郎在 5月中旬至 6月中旬呈上升趋势, 之后开始下降, 并且在 7月中旬降到最低 (分别为 10.589, 12.814 和 14.484), 而后又开始上升。不同的是, 西村早生 ADH活性在 7月中旬后一直呈上升趋势, 而次郎和花御所有波动 (图 4)。

在柿叶片中, ADH活性和可溶性单宁含量没有呈现规律性的变化。

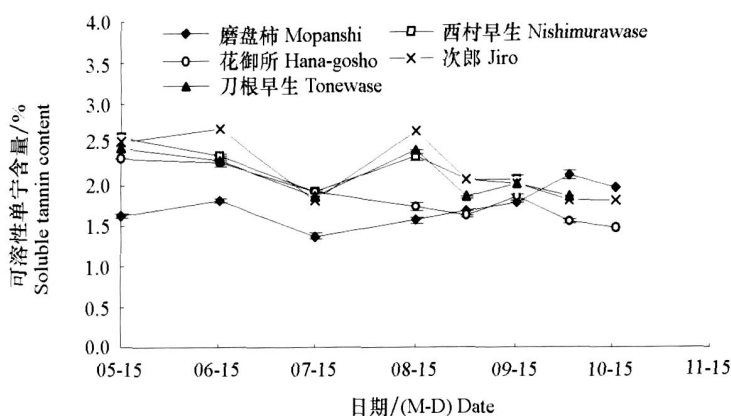


图 3 柿叶片发育期间可溶性单宁含量的变化

Fig. 3 Changes in soluble tannin content during leaf development of persimmon

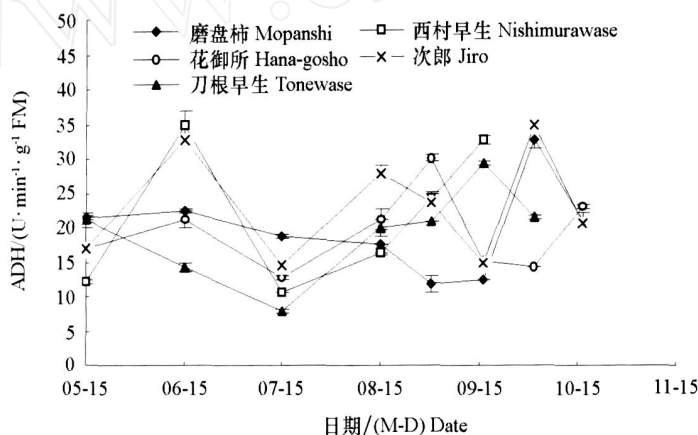


图 4 柿叶片发育期间乙醇脱氢酶 (ADH) 活性的变化

Fig. 4 Changes in ADH activity during leaf development of persimmon

### 2.3 温度与果实 ADH 酶活力的关系

温度从 10 升高到 15 时, 次郎果 ADH 活性的变化不大, 在 15 ~ 25 温度范围内, ADH 活性上升, 并在 25 时达到最大值 (1.105), 而后随着温度的上升而迅速降低, 其 ADH 的最适反应温度为 25 。

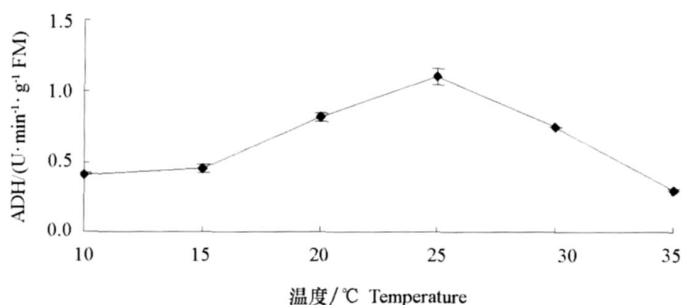


图 5 温度与 '次郎' 柿果实中乙醇脱氢酶 (ADH) 活力的关系

Fig. 5 Relationship between temperature and ADH activity in fruit

### 3 讨论

可溶性单宁含量在 0.1% 或 0.2% 以下时, 人的味觉器官无涩感, 因此把可溶性单宁含量低于 0.1% 或 0.2% 作为衡量果实是否脱涩的指标 (Yamada et al, 2002; 张永卓 等, 2006)。有研究表明, 完全甜柿在果实发育早期 (6月底) 可溶性单宁含量降到 1.5% 以下, 7月下旬降到 0.5% 以下, 基本完成脱涩; 不完全甜柿在果实近熟期 (7月底至 8月中) 可溶性单宁含量才急剧下降, 进而完成脱涩; 而涩柿则不能自然完成脱涩, 且此变化与果实单宁细胞变化有关 (费学谦 等, 1996; 章镇 等, 1997)。本研究中, 完全甜柿品种花御所和次郎的可溶性单宁含量呈缓慢下降的趋势, 到果实近熟期完成脱涩。不完全甜柿品种西村早生可溶性单宁变化稍有波动, 而完全涩柿品种磨盘柿和不完全涩柿品种刀根早生不能够完成脱涩, 结果与前人研究的结果基本一致。只是不完全甜柿西村早生的可溶性单宁含量, 在 7月中旬到 8月中旬有一个快速下降的过程, 推测可能与种子发育有关。本研究中, 西村早生果实可溶性单宁含量下降最明显的时期, 乙醇脱氢酶活性最高, 可能是由于乙醇脱氢酶的催化作用使乙醇发生氧化产生的乙醛与可溶性单宁发生凝固作用的结果; 完全甜柿在脱涩时, 乙醇脱氢酶活性也有所增强, 只是没有不完全甜柿明显。可见, 乙醇脱氢酶在甜柿的脱涩过程中的确起到一定的作用。但由于不同类型或起源的柿品种脱涩机制存在差异 (Yonemori & Matsushima, 1987; Ikegami et al, 2006), 所以, 关于 ADH 的直接作用机制有待进一步研究。

磨盘柿叶片在早期可溶性单宁含量相对较低而 ADH 活性较高, 与早期其他品种上的表现不尽一致, 是否因其品种的特殊性, 有待进一步研究。

ADH 活性与物种和温度有着密切的关系。本研究中, 柿果实中 ADH 最适温度为 25℃, 与酵母中 ADH 最适温度一致 (廉德君 等, 1996), 而与醋酸杆菌菌株 *Acetobacter* Z127 中的 ADH 最适温度为 60℃ (霍丹群 等, 2006) 相比, 差异较大, 这可能与试材和 ADH 类型等因素有关, 因为 ADH 有不同形态 (Bartley & Hindley, 1980; Mitchell & Jelenkovic, 1995), 相关的影响因素和控制基因也不同 (Wolyn et al, 1990; Fukuda et al, 2005; Sauvage et al, 2007)。本研究中, 在果实发育初期检测不到 ADH 活性, 而叶片在测定时间内 ADH 活性一直都维持较高水平, 这可能是由于果实发育前期 ADH 基因没有表达, 但叶片中 ADH 基因表达较早; 或是两种器官间 ADH 种类和特性不同。有关柿树 ADH 作用特征方面的研究尚在研究中。

### References

- Bartley IM, Hindley SJ. 1980. Alcohol dehydrogenase of apple. *Journal of Experimental Botany*, 31: 449 - 459.
- Fei Xue-qian, Zhou Li-hong, Wang Jin-feng. 1996. Relationship between the capacity of deastringency and development of tannin cell in persimmon fruits. *Forest Research*, 9 (1): 27 - 31. (in Chinese)
- 费学谦, 周立红, 王劲凤. 1996. 柿自然脱涩能力与单宁细胞发育规律的研究. *林业科学研究*, 9 (1): 27 - 31.
- Fukuda T, Yokoyama J, Nakamura T, Song InJa, Ito T, Ochiai T, Kanno A, Kameya T, Maki M. 2005. Molecular phylogeny and evolution of alcohol dehydrogenase (*Adh*) genes in legumes. *BMC Plant Biology*, 5: 6.
- Huo Dan-qun, Zhang Yun-ru, Hou Chang-jun. 2006. Purification of alcohol dehydrogenase from *Acetobacter* Z127 and parts of its enzymatic property. *Journal of Chongqing University: Natural Science Edition*, 29: 65 - 68. (in Chinese)
- 霍丹群, 张云茹, 侯长军. 2006. *Acetobacter* Z127 乙醇脱氢酶的纯化及酶学性质. *重庆大学学报: 自然科学版*, 29: 65 - 68.
- Ikegami A, Eguchi S, Yonemori K, Yamada M, Sato A, Mitani N, Kitajima A. 2006. Segregations of astringent progenies in the F<sub>1</sub> populations derived from crosses between a Chinese pollination-constant nonastringent (PCNA) 'Luo Tian Tian Shi' and Japanese PCNA pollination-constant astringent (PCA) cultivars of Japanese origin. *HortScience*, 41: 561 - 563.
- Kanellis A K, Sokmos T, Roubelakis-Angelakis KA. 1991. Suppression of cellulase and polygalacturonase and induction of alcohol dehydrogenase isoenzymes in avocado fruit mesocarp subjected to low oxygen stress. *Plant Physiology*, 96: 269 - 274.
- Labat E, Calas M, Sami-Manchado P, Verrieres C, Tesniere C. 2000. Grapevine (*Vitis vinifera* L.) alcohol dehydrogenase gene: An important

- marker of the physiological state during fruit ripening. *Acta Horticulturae*, 2000, 526: 303 - 310.
- Lian De-jun, Li Lin, Xu Gen-jun. 1996. Purification and kinetic studied of yeast ADH. *Acta Biochemica et Biophysica Sinica*, 28 (4): 396 - 403. (in Chinese)
- 廉德君, 李 林, 许根俊. 1996. 酵母醇脱氢酶 ADH 的纯化及动力学研究. *生物化学及生物物理学报*, 28 (4): 396 - 403.
- Liu Cun-de, Shen Quan-guang, Zhang Guo-zheng, Yan Long-fei, Tang Pei-song. 1980. Activity of alcohol dehydrogenase and the induced formation of alcohol dehydrogenase isozymes during germination of wheat seeds. *Acta Phytophysiol Sinica*, 6: 361 - 366. (in Chinese)
- 刘存德, 沈全光, 张国铮, 阎隆飞, 汤佩松. 1980. 小麦种子萌发时乙醇脱氢酶的变化及其同工酶的诱导形成. *植物生理学报*, 6: 361 - 366.
- Matsuo T, Ito S, Ben-Aire R A. 1991. Model experiment for elucidating the mechanism of astringency removal in persimmon fruit using respiration inhibitors. *J Japan Soc Hort Sci*, 60: 437 - 442.
- Mitchell WC, Jelenkovic G. 1995. Characterizing NAD- and NADP-dependent alcohol dehydrogenase enzymes of strawberries. *J Amer Soc Hort Sci*, 120: 798 - 801.
- Pesis E, Ben-Aire R. 1984. Involvement of acetaldehyde and ethanol accumulation during induce deastringency of persimmon fruits. *J Food Science*, 49: 896 - 899.
- Pinho R G, Copp L J, Amaya C L, Marangoni A G, Yada R Y. 2007. Roles of alcohol dehydrogenase, lactate dehydrogenase and pyruvate decarboxylase in low-temperature sweetening in tolerant and susceptible varieties of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiologia Plantarum*, 130: 230 - 239.
- Sauvage F X, Pradal M, Chatelet P, Tesniere C. 2007. Proteome changes in leaves from grapevine (*Vitis vinifera* L.) transformed for alcohol dehydrogenase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 2597 - 2603.
- Sugiura A. 2005. Retrospects and prospects on persimmon research. *Acta Horticulturae*, 685: 177 - 186.
- Sugiura A, Tomana T. 1983. Relationships of ethanol production by seeds of different types of Japanese persimmon and their tannin content. *Hort Science*, 18: 319 - 321.
- Taira S. 1996. Astringency in persimmon. In: Linsens H F, Jackson J F eds. *Modern Methods of Plant Analysis*, Vol 18, Fruit Analysis. Springer/Verlag: Berlin/Heidelberg: 97 - 110.
- Taira S, Satoh I, Watanabe S. 1992. Relationship between differences in the ease of removal of astringency among fruits of Japanese persimmon and their ability to accumulate ethanol and acetaldehyde. *J Japan Soc Hort Sci*, 60: 1003 - 1009.
- Tao R, Sugiura A. 1987. Cultivar identification of Japanese persimmon by leaf isozymes. *Hort Science*, 22: 932 - 935.
- Wolyn D J, Jelenkovic G. 1990. Nucleotide sequence of an alcohol dehydrogenase gene in octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch). *Plant Molecular Biology*, 14: 855 - 857.
- Yamada M, Taira S, Ohtsuki M, Sato A, Iwanami H, Yakushiji H, Wang R Z, Yang Y, Li G C. 2002. Varietal differences in the ease of astringency removal by carbon dioxide gas and ethanol vapor treatments among oriental astringent persimmons of Japanese and Chinese origin. *Scientia Horticulturae*, 94: 63 - 72.
- Yonemori K, Matsushima J. 1987. Morphological characteristics of tannin cells in Japanese persimmon fruit. *J Amer Soc Hort Sci*, 112: 812 - 817.
- Zhang Zhen, Dai Wen-hao, Cai Bin-hua, Sheng Bing-cheng, Hu Guo-qian. 1997. Changes of tannin during fruit development in different depucky-type persimmons. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 20 (1): 105 - 107. (in Chinese)
- 章 镇, 戴文浩, 蔡斌华, 盛炳成, 胡国谦. 1997. 不同脱涩类型柿果实发育过程中单宁物质的变化. *南京农业大学学报*, 20 (1): 105 - 107.
- Zhang Yong-zhuo, Zhang Yan-fang, Luo Zheng-rong. 2006. Identification of natural loss property of astringency in some non-astringent persimmon germplasm native of China. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (2): 370 - 373. (in Chinese)
- 张永卓, 张艳芳, 罗正荣. 2006. 部分中国原产甜柿种质果实脱涩类型的鉴定. *园艺学报*, 33 (2): 370 - 373.