

李低温酶促褐变机理的研究

史 辉¹, 龙超安²

(1. 宁德师范学院 生物系, 福建 宁德 352100; 2. 华中农业大学 园艺林学学院, 湖北 武汉 430070)

摘 要:以美国紫李为试材,测定了经间歇升温 and 热处理后果实的褐变度、抗氧化酶活性、抗氧化剂含量、膜质过氧化水平、总酚和可滴定酸含量的变化规律。结果表明:热处理和间歇升温延缓了李果褐变的发生,维持体内高水平的抗氧化活性和总酚以及可滴定酸含量,抑制多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)的活性和膜质过氧化产物—丙二醛(MDA)含量的积累。同时发现,对照果实 POD 活性与总酚含量和褐变度密切相关($r=-0.9157$ 和 0.9782)。说明对照果实在冷藏过程中由于内源清除活性氧能力的减弱,使膜质过氧化作用加剧,从而造成细胞膜系统结构和功能的改变,细胞中区域化分布被打破,酚类底物与 POD、PPO 接触,最终导致果实组织褐变。

关键词:李;褐变;抗氧化酶;抗氧化剂;膜质过氧化

中图分类号: S 662.3 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)19-0136-04

李(*Prunus salicina* Lindl)果多成熟于高温季节,由于皮薄汁多,在常温下贮藏期较短,在 0℃下贮藏时会因冷害而导致果肉褐变。果实的生理褐变已研究有 60 多年的历史,但是由于生理活动的复杂性,对褐变机理仍不能确切阐明^[1]。Mayer 和 Harel^[2]的研究指出,正常的植物组织不发生褐变与细胞内酚类物质和 PPO 的区域化分布有关。鞠志国等^[3]研究了莱阳茌梨原生质体、液泡中酚类物质及 PPO 的活性,发现液泡是酚类物质贮存和积累的场所,但不含 PPO, PPO 主要集中在细胞质中,也有存在于细胞膜和细胞壁上,证明了 PPO 与多酚的区域性分布。酚类物质与 PPO 的区域性分布保护了组织细胞的正常生理活动,防止褐变的发生。目前国内对李果酶促褐变机理的研究尚未见报道。该试验选取 2 种变温方式处理采后李果实,并结合生产中常用的低温胁迫条件作对照,通过对褐变度、抗氧化酶活性、抗氧化剂含量、膜质过氧化水平和总酚(TP)含量等在褐变过程中的变化进行研究,以期对膜质过氧化引起的细胞区域化分布的打破及其与果实褐变的关系进行深入研究,为李果贮藏保鲜提供理论依据和技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验方法

供试品种为美国紫李(*Prunus salicina* cv. Purple), 6 月份采自华中农业大学果树实验基地。采后当天运回

实验室,在常温下选择成熟度一致,大小均匀,无机械损伤和病虫害的果实,在相对湿度为 85%~90%、温度可自动调节的冷库内进行以下 3 个处理。热处理(Heat treatment):刚采收的果实置于温度为 37℃,相对湿度为 85%~90%的热空气中处理 24 h,然后在 -0.5~0℃下贮藏,记为 H;间歇升温(Intermittent warming):-0.5~0℃贮藏,每 15 d 移至 18~20℃并保持 1 d,然后转回 -0.5~0℃下贮藏^[4],记为 I;最后以 -0.5~0℃下贮藏的果实为对照组,记为 CK。以上各处理均重复 3 次。

1.2 测定指标

褐变度(BD)的测定参考 Lee 等^[5]的方法。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)的提取采用李向东的方法^[6],酶活性的测定分别参考 Rao^[7]、张志良^[8]和 Pizzocaro^[9]的方法。总酚(TP)含量的测定参考陈昆松等^[10]的方法。丙二醛(MDA)含量的测定采用李合生的方法^[11]。抗坏血酸(ASA)含量的测定采用陈建勋等的方法^[12]。可滴定酸(TA)含量的测定采用酸碱滴定法。

2 结果与分析

2.1 处理对果实褐变度的影响

前 4 周,各处理果褐变度基本没有增加。28 d 后 CK 果褐变度开始急剧增加(图 1),到 35 d 时,部分果实的果肉上可观察到明显的褐变斑,56 d 时果肉 100%的面积发生褐变;H 处理在 28 d 后褐变度开始缓慢增加,56 d 时,极少部分果实的果肉上观察到轻微的褐变斑,贮藏到最后仅有部分果实发生轻微的果肉褐变;I 处理在 63 d 的贮藏期间褐变度一直维持在采收水平,没有上升趋势,果肉上未发现褐变斑。说明 I 和 H 处理有抑制褐变的作用,I 处理效果最好($P<0.01$)。

第一作者简介:史辉(1979-),男,硕士,讲师,现主要从事果品保鲜与生物技术研究工作。E-mail: Shihui79@yahoo.com.cn.

基金项目:宁德师范学院校级科研资助项目(2009202)。

收稿日期:2010-07-06

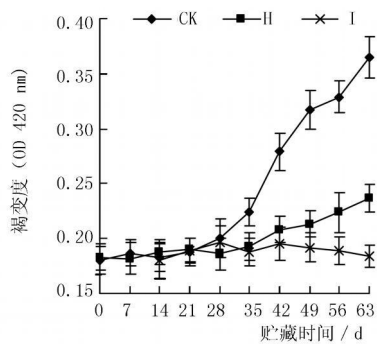


图1 不同处理果实褐变度的变化

2.2 抗氧化活性变化及膜质过氧化水平与褐变的关系

从图 2 可知, 各处理的 SOD 活性在前 4 周内逐渐下降, 到 28 d 时, 各处理达到最低值并开始回升, 到贮藏结束, 各处理活性基本相等并达到采收时的水平, 贮藏初期 CK 的下降趋势最显著, 其活性也显著 ($P<0.05$) 弱于 I 和 H 处理; 而各处理的 MDA 含量在整个贮藏期间呈先升后降趋势, 前 28 d 内 MDA 含量急剧上升, CK 的

上升速度最快, 各处理在 28 d 时达到最高值, 之后随贮藏时间的延长, MDA 含量又逐渐下降, 并趋于稳定, 从 14 d 开始, CK 的 MDA 含量显著高于其它 2 种处理 ($P<0.05$)。各处理果的 SOD 和 MDA 活性和含量的变化规律相符合, 且 SOD 活性的下降和 MDA 含量的上升均发生在褐变度上升之前。I 和 H 处理能显著提高 SOD 活性抑制 MDA 的产生, 提高果实对低温的抗性, 这与它们延缓果实褐变度的增加是一致的。POD 的活性随着贮藏时间的延长而逐渐升高(图 2), I 和 H 处理果实在一定程度上抑制了 POD 活性的上升, POD 的活性变化与 MDA 含量的变化无明显相关性, 但 CK 中 POD 与总酚和褐变度含量的变化具有很强的相关性 ($r=-0.9157$ 和 0.9782), POD 可能参与了酚类物质的氧化而导致褐变。

贮藏期间各处理果实的 ASA 均呈下降趋势(图 2)。I 和 H 处理果的 ASA 含量分别在 28 d 和 42 d 后显著高于 CK ($P<0.05$), 说明 I 和 H 处理有利于保持果实内较高的还原型 ASA 含量, 提高果实品质, 增强果实的抗氧化能力。

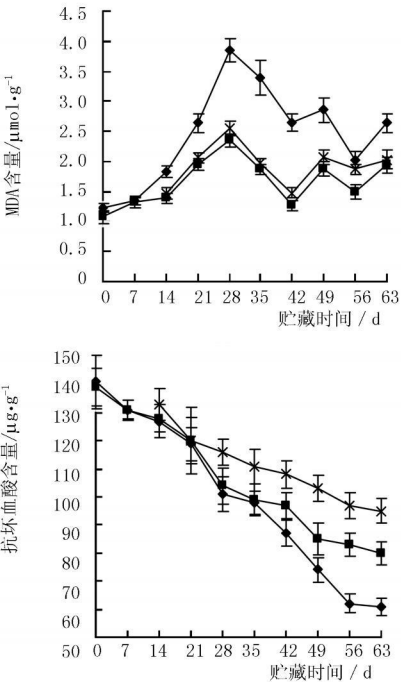
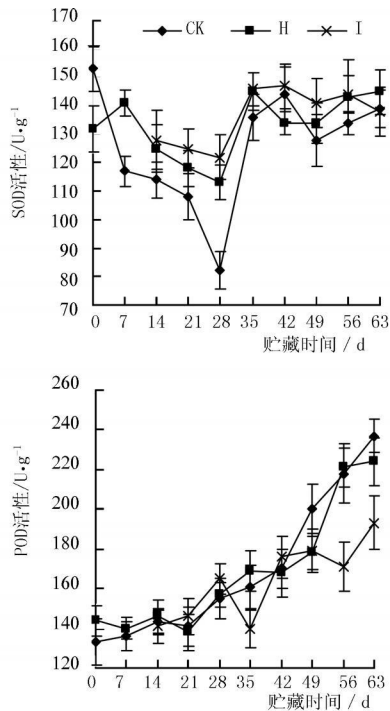


图2 不同处理果实超氧化物歧化酶、过氧化物酶活性和丙二醛、抗坏血酸含量的变化

2.3 PPO 活性、总酚含量及褐变三者之间的关系

刚采收时, PPO 活性较低, 贮藏期间 PPO 活性逐步增加, 达到最高水平后又开始下降, I 和 H 处理与 CK 果的 PPO 活性变化趋势相似(图 3), 但 I 处理的 PPO 活性始终低于 CK 的 PPO 活性, 且 I 和 H 2 个处理的 PPO 峰值均低了 CK。在贮藏后期, 随着褐变的进行, 各处理

酚类物质含量和 PPO 活性均下降(图 3)。

酚类在贮藏初期有略微的升高随后下降, CK 和 H 处理果贮藏 21 d 后, 总酚含量开始逐渐下降, 而 I 处理果总酚含量的下降比其它 2 种处理推迟了 7 d(图 3)。I 和 H 2 种处理显著抑制了总酚含量的下降, 分别在 28 d 和 42 d 后显著高于 CK ($P<0.01$)。CK 中总酚含量的

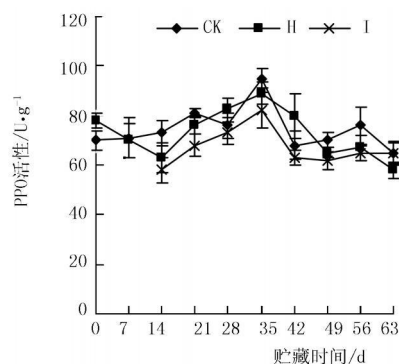


图3 不同处理果实多酚氧化酶活性和总酚含量的变化

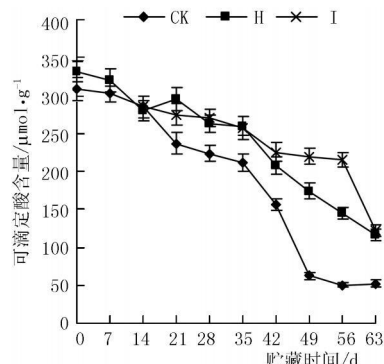
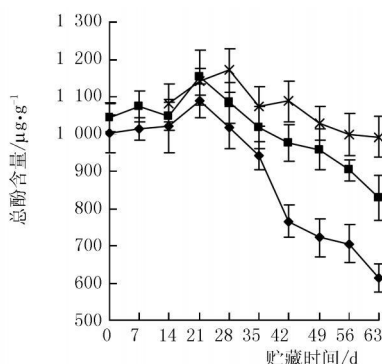


图4 不同处理果实可滴定酸含量的变化

减少(21 d)发生在褐变度的上升(28 d)之前,且二者呈明显的负相关($R = -0.9664$)。上述试验进一步说明李果实褐变是以酚类底物消耗为基础的生化反应。

2.4 可滴定酸(TA)含量的变化

贮藏过程中各处理的 TA 呈下降趋势(图4)。CK 果 TA 在前 35 d 内呈稳步下降,35 d 后,随着褐变 TA 的含量急剧下降,并显著低于其它 2 种处理($P < 0.01$)。

3 讨论

自由基生物学说认为,逆境胁迫使植物自由基产生和清除的平衡系统遭到破坏,自由基的增加可导致膜的过氧化加剧,并由此导致了膜系统结构和功能的破坏,膜差别透性的丧失^[13-14]。从试验结果来看,在贮藏前 28 d,CK 果实的 SOD 活性急剧下降,MDA 含量急剧升高(图2),这可能是因为在低温胁迫下,果实内源抗氧化酶活性降低,清除活性氧自由基的能力随之下降,活性氧自由基的产生和清除平衡受到破坏,使活性氧自由基水平增高,过剩的活性氧自由基攻击生物膜磷脂中不饱和脂肪酸双键而导致脂质的过氧化反应,相应地 MDA 含量也升高。在贮藏 28 d 后,SOD 活性上升,MDA 的含量又开始下降,其原因可能是果实内抗氧化酶活性在活性氧自由基的诱导下,其活性升高,从而增强了清除活性氧自由基的能力,降低活性氧自由基的水平,相应地 MDA 含量下降。相反,间歇升温 and 热处理果在低温胁迫下仍能维持较高的 SOD 活性和较低的 MDA 含量,从而避免了对细胞造成的损伤。同时,还发现 CK 果 SOD 活性下降和 MDA 含量升高达到峰值后(28 d),褐变度开始上升,接着果肉出现褐变斑(35 d)。可见,褐变发生前果实细胞内的膜系统经历了严重的氧化分解代谢。

李果实褐变初期,酚类底物含量及多酚氧化酶的活力增加,并相应出现高峰。随着褐变的进行和完成,底物含量减少,酶活力下降(图3)。这与前人对香蕉^[15]、梨^[16]、雷笋^[17]、龙眼^[18]的研究结果类似,贮藏初期果实内酚类物质含量的增加是由于苯丙氨酸解氨酶催化苯丙氨酸脱氨形成肉桂酸,肉桂酸进一步羟化形成各种酚

类化合物^[9],底物减少是由于褐变反应的消耗大于酚类的合成所致。而多酚氧化酶活力下降,则可理解为酶促反应的反馈控制作用。由于产物增加,负反馈加强,促使酶活力的下降。而间歇升温处理的李果贮藏期间多酚含量变化不大,未发生褐变,PPO 活性却呈先升后降趋势,且 PPO 活性与总酚和褐变度无相关性,这说明李的酶促褐变并非单纯由 PPO 引起,单纯多酚与 PPO 活性不能作为褐变的限制因子,PPO 活性不能作为判断李褐变程度的指标。

林植芳^[20]、蒋跃明^[15]、林河通^[21]的研究表明 POD 既是膜保护酶—清除 H_2O_2 ,同时又是多种底物的氧化酶,在细胞代谢过程中,POD 消解 H_2O_2 ,利用 H_2O_2 释放出的氧氧化酚类物质发生褐变。但该试验中 POD 活性在贮藏期间的逐步升高,以及间歇升温 and 热处理在一定程度上抑制了 POD 活性的上升,这与果实 MDA 含量先升后降以及间歇升温 and 热处理果实 MDA 含量显著低于 CK 不相符,推测在李果实抗氧化作用中 POD 占次要地位。该试验中发现李 POD 与总酚含量和褐变度的变化具有很强的相关性($r = -0.9157$ 和 0.9782),推测李果实中催化褐变反应的酶主要为 POD,其次才是 PPO。

ASA 是植物体内有效的自由基清除剂,在 ASA-GSH 循环中,它们协同作用,清除活性氧自由基,在维持膜结构完整性和防御膜脂被自由基和脂氢过氧化物过氧化中起重要作用^[22]。前人的工作还发现抗坏血酸能使邻苯醌重新还原成邻苯二酚^[23-24]。在该试验中间歇升温 and 热处理保护了细胞内的还原型 ASA 含量(图2),较高水平的还原型 ASA 不但有利于清除自由基,延缓衰老,而且它还可将醌还原为酚,防止由于醌的聚合而导致的褐变。

在采后果蔬体内,有机酸主要是以呼吸底物的形式被消耗。因此,果蔬的 TA 呈下降趋势。TA 含量的快速下降(35 d 后)发生在组织褐变之后(第 35 天),因为酶促褐变的发生使果实代谢活动加强,刺激呼吸,加快有机酸的消耗。这说明了酶促褐变是导致 TA 含量快速

下降的原因,而 TA 含量的下降不是导致褐变的原因。

综上所述,李低温褐变是由多种因素影响的复杂过程,其机理可能是由于低温胁迫下,果实抗氧化酶(包括 SOD、CAT 等)活性和抗氧化剂(包括 ASA、GSH 等)含量下降,内源清除活性氧、自由基能力的减弱,使膜质过氧化作用加剧,从而造成细胞膜系统结构和功能的改变,细胞中区域化分布被打破,酚类底物与 POD、PPO 接触,在 2 种酶的催化作用下氧化形成褐色物质,最终导致果实组织褐变。至于低温胁迫下李果实活性氧自由基水平和抗氧化酶系统的变化与果实褐变的关系,还需做进一步的研究。

参考文献

[1] 孙蕾,王太明,乔勇进,等.果实褐变机理及研究进展[J].经济林研究,2002,20(2):92-94.
[2] Mayer A M, Harel E. Polyphenol oxidase in plants [J]. Phytochemistry, 1979, 18: 193-215.
[3] 鞠志国,朱广廉,曹宗巽.莱阳茺梨果实褐变与多酚氧化酶及酚类物质区域化分布的关系[J].植物生理学报,1988,14(4):356-361.
[4] 孙秀兰,刘兴华,张华云,等.变温贮藏对黑琥珀李品质及生理特性的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2001,29(2):109-113.
[5] Lee C Y, Kagan V, Jaworski A W, et al. Enzymatic browning in relation to phenolic compounds and polyphenoloxidase activity among various peach cultivars [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990, 38: 99-101.
[6] 李向东,王晓云,张高英,等.花生叶片衰老过程中某些酶活性的变化[J].植物生理学报,2001,27(4):353-358.
[7] Rao M V, Paliyath G, Ommrod D P. Ultraviolet and ozone induced biochemical changes in antioxidant enzymes of Arabidopsis thaliana [J]. Plant Physiology, 1996, 110: 125-136.
[8] 张志良.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,1994:154-155.
[9] Pizzocaro F, Torreggiani D, Gilardi G. Inhibition of apple polyphenoloxidase(PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 1993, 17: 21-30.

[10] 陈昆松,于樑,周山涛.鸭梨果实气调贮藏过程中 CO₂ 伤害机理初探[J].中国农业科学,1991,24(5):83-88.
[11] 李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2000:260-261.
[12] 陈建勋,王晓峰.植物生理学实验指导[M].广州:华南理工大学出版社,2002:125-126.
[13] 王宝山.生物自由基与植物膜伤害[J].植物生理学通讯,1988,14(2):12-16.
[14] Cheeseman K H, Slater T F. An introduction to free radical biochemistry [J]. British Medical Bulletin, 1993, 49: 479-483.
[15] 蒋跃明,陈绵达,林植芳,等.香蕉低温酶促褐变[J].植物生理学报,1991,17(2):157-160.
[16] Larrigaudiere G, Lenthic L, Vengrell M. Relationship between enzymatic browning and internal disorders in controlled atmosphere stored pears [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998, 78(2):232-236.
[17] 陆胜民,孔凡春.低氧气调包装对去壳雷笋褐变和木质化的影响[J].植物生理与分子生物学报,2004,30(4):387-392.
[18] 林河通,席均芳,陈绍军.龙眼果实采后失水果皮褐变与活性氧及酚类代谢的关系[J].植物生理与分子生物学报,2005,31(3):287-297.
[19] 张维一.果蔬采后生理学[M].北京:农业出版社,1993:245-246.
[20] 林植芳,李双顺,张东林,等.采后荔枝果实中氧化和过氧化作用[J].植物学报,1988,30(4):382-387.
[21] 林河通,席均芳,陈绍军,等.龙眼采后生理和病理及贮运技术研究进展[J].农业工程学报,2002,18(1):185-190.
[22] Sigid K, Ina Z, Heinz C. Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of ricinus communis by ascorbate peroxidase [J]. Plant Cell Physiology, 1990, 31(7):1005-1013.
[23] Jiang Y M, Fu J R. Biochemical and physiological changes involved in browning of litchi fruit caused by water loss [J]. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 1999, 74(1):43-46.
[24] Amiot M J, Fleuriet A, Cheynier V, et al. Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruits and vegetables [C] // Tomas-Barberan F A, Robins R J. Phytochemistry of Fruits and Vegetables-Proceedings of the Phytochemical Society of Europe. Vol. 41. Oxford, London, UK: Clarendon Press, 1997:51-85.

Study on the Enzymatic Browning Mechanism of Plum During Low Temperature Storage

SHI Hui¹, LONG Chao-an²

(1. Department of Biology, Ningde Normal College, Ningde, Fujian 352100; 2. College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070)

Abstract: Plum (cv. Purple) fruits were treated with hot air and intermittent warming after harvest. Brown degree, antioxidative enzyme activities, antioxidant content, membrane peroxidation level, total phenols and titratable acid contents of the fruits were investigated. The results showed that the treatments of hot air and intermittent warming distinctly postponed the symptom of flesh browning. Both treatments maintained endogenous high level antioxidant activities and the contents of total phenols and titratable acid. The activities of PPO, POD and the accumulation of the content of MDA were also inhibited by the treatments of hot air and intermittent warming. The results showed that POD activity correlated with total phenols and brown degree closely in control fruits ($r = -0.9157$ and 0.9782). The data suggested that the activity of scavenging of active oxygen was declined and membrane peroxidation was enhanced by chilling stress in control fruits. In turn, this results in the leakage and decomposition of the cell membrane system. Furthermore, the compartment of flesh cell can be destroyed and polyphenols meets POD and PPO, so the browning of the fruits developed.

Key words: plum; browning; antioxidative enzyme; antioxidant; membrane peroxidation