

贮温对龙眼果肉采后衰老中的抗氧化能力及 相关酶的影响

张强¹, 韩冬梅², 李建光², 吴振先¹

(1 华南农业大学 园艺学院, 广东省果蔬保鲜重点实验室, 广东 广州 510642;

2 广东省农业科学院 果树研究所, 广东 广州 510640)

摘要:以石硖龙眼 *Dimocarpus longana* Lour. cv. Shixia 为试材, 研究了不同贮温下 3 种抗氧化能力 (总抗氧化能力 TAOC、抑制超氧阴离子能力、抑制羟自由基能力)、相关酶 [过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)] 及氧化产物 [丙二醛 (MDA)、过氧化氢 (H_2O_2)] 在龙眼采后果肉衰老过程中的变化规律及相互关系。结果表明: 在 4 和 20 °C 2 种贮温下, 龙眼果肉均经历了一个不可逆的衰老过程, 且高温下的衰老速度远超过低温; 氧化产物、3 种抗氧化能力和相关酶因贮藏温度不同而出现变化规律和作用水平差异; 在较高贮温下, 龙眼果肉更易遭受活性氧自由基的伤害, 且 POD、SOD 和 CAT 对自由基的诱导反应比低温下更加积极。3 种抗氧化能力指标在 2 种贮温下彼此之间均无显著相关性; 4 °C 下, SOD 在龙眼果肉低温衰老过程中的抗氧化作用不明显, POD 和 CAT 发挥了主要作用; 20 °C 下, CAT 抗氧化作用不明显, 而 SOD 和 POD 与抑制 O_2^- 能力以及 MDA、 H_2O_2 含量密切相关, 且发挥了主要作用。

关键词: 龙眼果肉; 衰老; 抗氧化能力; 抗氧化酶

中图分类号: S667.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2012)01-0018-05

Effects of Storage Temperature on the Oxidation Resistance and Relevant Enzymes During the Postharvest Senescence of Longan Aril

ZHANG Qiang¹, HAN Dong-mei², LI Jian-guang², WU Zhen-xian¹

(1 Guangdong Key Lab for Postharvest Science of Fruit and Vegetable, College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The variation and inter-relations between the three kinds of antioxidant capacity (total oxidation resistance, the capacity to inhibit superoxide anion and hydroxyl radical), relevant enzymes [peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT)], and the oxidation products [malonaldehyde (MDA) and (H_2O_2)] during the postharvest senescence of longan (cv. Shixia) aril stored at 4 °C and 20 °C were studied. The results showed that the longan aril suffered a process of irreversible senescence during the storage at high and low temperatures, and the senescence progress at high temperature far shorter than that at low temperature. The variation and effect levels in the peroxide products, three kinds of antioxidant capacity and relevant enzymes varied with the different storage temperatures. Furthermore, longan aril was more subject to the damage from free oxygen radicals at high storage temperature than low temperature, and POD, SOD and CAT were more positive to be induced by free oxygen radicals. The correlation analysis showed that there were no significant differences between the three oxidation resistance. POD and CAT played a more important role than SOD in anti-oxidation during the senescence of longan aril at 4 °C, while SOD and POD were closely related to the capacity to inhibit superoxide anion, MDA and H_2O_2 contents and played a more important role than CAT.

收稿日期: 2011-01-12

作者简介: 张强 (1982—), 男, 硕士研究生; 通信作者: 吴振先 (1971—), 男, 教授, E-mail: zhenxwu@scau.edu.cn

基金项目: 国家荔枝龙眼产业技术体系资助项目 (CARS-33-14)

Key words: longan aril; senescence; oxidation resistance; antioxidase

龙眼 *Dimocarpus longana* Lour. 是原产我国南亚热带名贵水果,以营养丰富、风味甜美著称,但龙眼是我国南方最难保鲜的水果之一,其成熟于酷暑季节,采后衰老的特征表现主要有2个:果皮褐变和果肉自溶,自溶后的果肉流汁进而腐烂^[1-2]。目前,关于龙眼采后果肉衰老机理研究,主要集中在果肉细胞壁结构及相关酶^[3]、果肉细胞膜透性及自由基衰老等方面。自从植物衰老研究引入自由基伤害学说以来,活性氧自由基与植物衰老的关系研究也在不断深入,但在龙眼果肉中的相关研究却鲜有报道。韩冬梅等^[2]研究发现龙眼果肉衰老过程中,细胞膜透性和丙二醛(MDA)含量逐渐增加,相关抗氧化酶[过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)]活性发生特征性变化。郑雪芳等^[4]研究发现龙眼果肉中的SOD、POD和CAT3种酶活性与腐烂程度都有一定的相关性,且随腐烂程度加重而呈现先上升后下降的趋势。但单一的抗氧化成分不能准确反应生物体实际抗氧化应激能力的高低,构成果实抗氧化能力的两大防御体系包括酶促与非酶促体系,其各组成物质在果实衰老过程中所发挥的作用也存在差异^[5]。关于龙眼采后果肉衰老过程中活性氧自由基清除系统相关酶活性与总抗氧化能力的变化及相互关系的研究迄今鲜见报道。本试验以广东省主栽龙眼品种“石硖”为材料,就此问题开展较为详细的研究,旨在为深化龙眼采后果肉衰老机理和调控技术研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于2005—2006年2年内重复完成,石硖龙眼 *D. Longana* Lour. cv. Shixia 取自广东省农业科学院果树研究所龙眼园,采收成熟度为九至九成五。上午采摘,当天运回实验室,选取大小均匀、无病虫害、无畸形及机械伤的果实用于试验。

用 $1\,000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ‘强力’消毒剂浸泡果实1 min,再以 $500\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的施保功溶液浸果1 min,晾干。以0.02 mm厚的低密度聚乙烯袋(LDPE)包装,每袋30个果,一部分置于20℃冷库中贮藏,另一部分置于 $(4.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 的恒温箱(SANYO, MIT-533)中贮藏,每个贮藏温度下各贮藏32袋,每次取3袋果实作为样品。

1.2 取样方法

20℃贮藏的果实,每天取样;4℃贮藏的果实,每7 d取样1次。随机抽取2袋果中的10个果,剥取果肉,混合后迅速以液氮冻结、粉碎、封存,贮于-40℃低温冰箱里,用于酶活性测定,重复3次;剩余的

60个果实用于硬度指标测定。

1.3 果肉硬度、酶活性和氧化能力测定

1.3.1 果肉硬度 随机抽取2袋果中的10个,剥开果皮,将果肉分成两半,叠在一起后用KM-5型硬度计测量,每重复测20个值,取平均值。重复3次。

1.3.2 POD活性 酶液提取参照蒋跃明^[6]的方法,测定参照曾邵西^[7]的方法略作修改,以1 g果肉鲜质量每分钟 $D_{470\text{ nm}}$ 变化0.01表示一个酶活力单位(U)。每处理重复3次,每重复测定3次。

1.3.3 CAT活性 酶液提取同1.3.2,活性测定参照Chance等^[8]的紫外分光光度法,以每分钟 $D_{240\text{ nm}}$ 减少0.1为一个酶活力单位(U)。每处理重复3次,每重复测定3次。

1.3.4 SOD活性 参照邵从平等^[9]的方法,略有改动,以抑制氮蓝四唑(NBT)光化还原50%作为一个酶活力单位(U)。每处理重复3次,每重复测定3次。

1.3.5 MDA含量 酶液提取同1.3.4,测定参照Heath等^[10]的方法,用 $(D_{532\text{ nm}} - D_{600\text{ nm}})/(155\text{ dm})$ 计算MDA含量, d 为比色杯光程, m 为果肉鲜质量。每处理重复3次,每重复测定3次。

1.3.6 氧化能力 过氧化氢(H_2O_2)含量、抑制超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)能力、抑制羟自由基($\cdot\text{OH}$)能力以及总抗氧化能力(TAOC)的测定均参照试剂盒说明进行,试剂盒均来自南京建成生物技术有限公司。

1.4 数据统计及作图分析

使用SPSS 13.0软件进行数据的方差分析和相关性分析,利用Excel 2003软件进行绘图和部分数据分析。

2 结果与分析

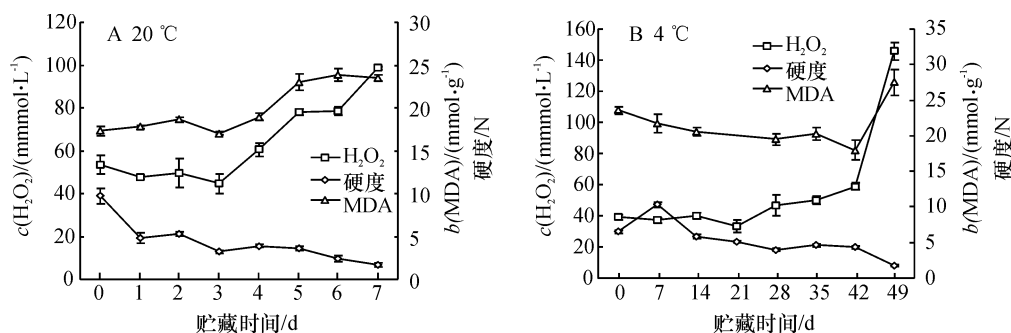
2.1 贮藏期间龙眼果肉硬度变化

石硖果肉硬度在2种贮温下的变化总体上呈下降趋势(图1)。4℃贮温下,贮藏7 d后果肉硬度达到最大值,之后硬度逐渐下降,直至第42天,硬度急剧降低,果肉表现为自溶、流汁。20℃贮温下,果肉硬度从贮藏初期就逐渐下降,直至第7天降到最低,接近于0,果肉开始明显流汁、糜烂。

2.2 贮藏期间龙眼果肉 H_2O_2 和 MDA 含量的变化

2种贮温下的龙眼果肉 H_2O_2 含量均呈上升趋势。4℃贮温下,果肉 H_2O_2 含量前21 d变化不大,但从21 d起缓慢上升,42 d时急剧上升,这时果肉已经糜烂流汁。20℃贮温下,前3 d H_2O_2 含量变化不大,3 d后快速上升,在第7天时达到最高。

2种温度下,整个贮藏期间MDA含量缓慢上升,且20℃下上升趋势更加明显(图1)。

图1 贮藏期间龙眼果肉硬度、 H_2O_2 和 MDA 含量的变化Fig. 1 Changes in hardness, H_2O_2 and MDA contents in longan aril during storage

2.3 贮藏期间龙眼果肉酶活性的变化

2种贮温下的 POD 活性均呈逐渐上升的趋势. 4 °C 贮温下, 28 d 前 POD 活性缓慢上升, 之后上升速率明显加快, 从第 28—42 天, POD 活性上升了 32%, 从第 42—49 天, 上升了 37.6%. 20 °C 贮温下, POD 活性在整个贮藏期间保持持续上升的趋势 (图 2).

2种贮温下的 CAT 活性变化规律明显不同. 4 °C

贮温下, CAT 活性总体呈下降的趋势, 35 d 以前缓慢下降, 之后显著降低. 20 °C 贮温下, CAT 活性变化在第 1、4 天有 2 个峰值, 但第 4 天后下降不明显, 从第 2 天开始, CAT 活性是上升的 (图 2).

2种贮温下的 SOD 活性均表现为先下降后上升的趋势. 4 °C 贮温下, 35 d 之前 SOD 活性缓慢下降, 之后快速上升. 20 °C 贮温下, 1 d 前 SOD 活性略有下降, 之后持续升高至最高 (图 2).

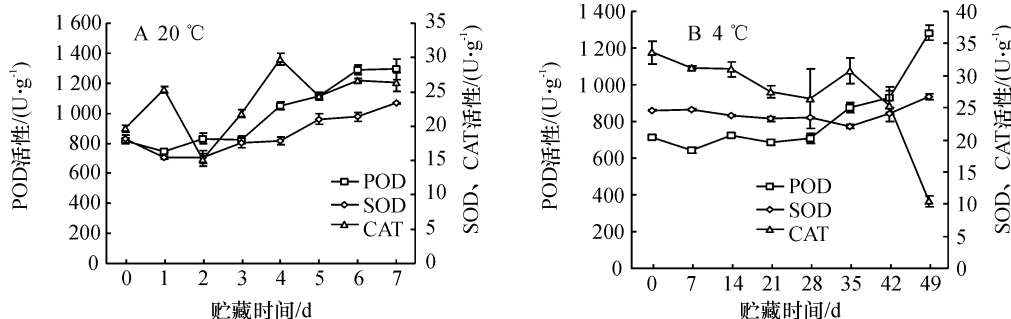


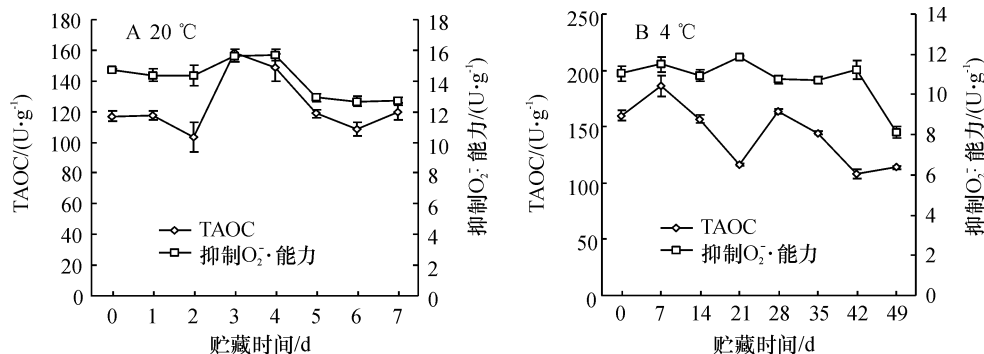
图2 贮藏期间龙眼果肉 POD、SOD 和 CAT 活性的变化

Fig. 2 Changes in POD, SOD and CAT activities in longan aril during storage

2.4 贮藏期间龙眼果肉 TAOC 以及抑制 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 能力的变化

4 °C 贮温下, TAOC 总体呈双峰型下降趋势, 在 21 d 时有一个低值, 之后快速上升, 28 d 后逐渐下

降. 20 °C 贮温下, TAOC 变化呈单峰型, 2 d 后急剧上升, 第 3 天达最高值, 之后逐渐降低, 但贮藏前、后期 TAOC 相近. 2种贮温下的 TAOC 变化均表现为峰型特征 (图 3).

图3 贮藏期间龙眼果肉 TAOC、抑制 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 能力的变化Fig. 3 Changes in TAOC and the capacity to inhibit $\text{O}_2^{\cdot-}$ in longan aril during storage

4 ℃贮温下, 42 d 前果肉抑制 O_2^- · 能力变化不大, 之后大幅下降. 20 ℃贮温下, 抑制 O_2^- · 能力在 4 d 前变化平稳且略有上升, 之后下降, 但幅度不大. 该能力在 2 种贮温下的变化差异主要表现在贮藏后期的下降幅度不同(图 3).

4 ℃贮温下, 14 d 前果肉抑制 · OH 能力略下降, 之后大幅上升, 42 d 时达一峰值, 此后至贮藏末期, 抑制 · OH 能力逐渐下降. 20 ℃贮温下, 该能力呈持续下降的趋势, 且 5 d 后下降速度加快. 2 种温度下, 抑制 · OH 能力在贮藏前期均下降, 但在中后期则完全相反, 且低温下的抑制水平远高于常温(图 4).

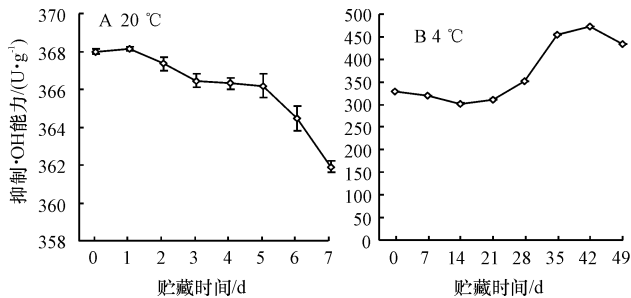


图 4 贮藏期间龙眼果肉抑制 · OH 能力的变化

Fig. 4 Changes in the capacity to inhibit · OH in longan aril during storage

表 1 4、20 ℃贮温下龙眼果肉抗氧化能力、相关酶和硬度之间的相关性分析¹⁾

Tab. 1 The correlations between the antioxidant capacity, relevant enzymes and hardness at 4 and 20 ℃ in longan aril during storage

贮温/℃	项目	TAOC	抑 O_2^- ·	抑 · OH	SOD	POD	CAT	H_2O_2	MDA	硬度
4	TAOC	1								
	抑 O_2^- ·	0.317	1							
	抑 · OH	-0.576	-0.448	1						
	SOD	-0.148	-0.653	0.028	1					
	POD	-0.646	-0.891 **	0.726 *	0.565	1				
	CAT	0.609	0.849 **	-0.473	-0.665	-0.883 **	1			
	H_2O_2	-0.498	-0.956 **	0.536	0.723 *	0.955 **	-0.942 **	1		
	MDA	0.249	-0.732 *	0.256	0.625	0.529	-0.357	0.611	1	
	硬度	0.743 *	0.660	-0.570	-0.136	-0.740 *	0.722 *	-0.667	-0.108	1
20	TAOC	1								
	抑 O_2^- ·	0.683	1							
	抑 · OH	-0.029	0.621	1						
	SOD	-0.103	-0.731 *	-0.870 **	1					
	POD	-0.159	-0.720 *	-0.883 **	0.911 **	1				
	CAT	0.354	-0.162	-0.455	0.472	0.576	1			
	H_2O_2	-0.277	-0.815 *	-0.891 **	0.943 **	0.933 **	0.485	1		
	MDA	-0.396	-0.898 * *	-0.786 *	0.865 **	0.935 **	0.437	0.925 **	1	
	硬度	-0.197	0.407	0.734 *	-0.510	-0.658	-0.532	-0.558	-0.632	1

1) * 显著相关($P < 0.05$), ** 极显著相关($P < 0.01$).

3 讨论

3.1 不同贮藏温度对龙眼果肉衰老、抗氧化能力及相关酶的影响

2 种贮藏温度下, 龙眼果肉硬度变化规律一致, 呈现逐渐降低的趋势. 由于低温导致细胞质流动性

2.5 龙眼贮藏期间果肉抗氧化能力、相关酶和果肉硬度之间的相关性分析

4 ℃贮温下, 3 种抗氧化能力指标之间无显著相关性. 与抑制 O_2^- · 能力极显著相关的酶是 POD 和 CAT, 与抑制 · OH 能力显著相关的酶仅有 POD, 且 POD 和 CAT 极显著负相关; H_2O_2 含量与抑制 O_2^- · 能力和 CAT 极显著负相关, 与 POD 极显著正相关、与 SOD 显著正相关; MDA 含量与抑制 O_2^- · 能力显著负相关, 与其他指标没有显著相关. 另外, 硬度与 TAOC、CAT 显著正相关、与 POD 显著负相关, 与其他指标无显著相关性(表 1).

20 ℃贮温下, 3 种抗氧化能力指标之间无显著相关性. 硬度仅与抑制 · OH 能力显著正相关, 与其他指标无显著相关性. 抑制 O_2^- · 能力与 MDA 含量极显著负相关, 与 SOD、POD 及 H_2O_2 含量显著负相关; 抑制 · OH 能力与 POD、SOD 及 H_2O_2 含量极显著负相关. 3 种抗氧化酶之中, CAT 与其他指标无显著相关性; SOD 与 POD 极显著正相关. 另外, MDA 和 H_2O_2 含量均与抑制 O_2^- · 能力、抑制 · OH 能力、SOD 和 POD 显著或极显著相关, 且两者之间亦极显著正相关(表 1).

降低而使果肉在贮藏初期表现为硬度稍有上升, 之后随着细胞衰老, 果肉硬度下降至接近 0, 说明龙眼果肉在贮藏过程中经历着一个不可逆的衰老过程, 且高温下的衰老速度远超过低温.

在植物有机体的衰老过程中, 自由基的不断产生和消除与机体内各种氧化作用及相关自由基清除

系统发挥作用密切相关^[11],温度的影响又表现出一定的复杂性.在变化规律方面,2种温度下,果肉总抗氧化能力(TAOC)、抑制 O_2^- ·能力、SOD和POD活性、MDA和 H_2O_2 含量的变化规律大致相近,而抑制 $\cdot OH$ 能力、CAT活性变化规律存在显著差异.在作用水平方面,低温下的TAOC、CAT活性和MDA含量与常温下较为接近;抑制 O_2^- ·能力和 H_2O_2 含量总的来说较低或稍低;抑制 $\cdot OH$ 能力和SOD活性较高.较高温度下的龙眼果肉生理活动比低温下旺盛,易于衰老^[2],本研究中2种贮温下的抗氧化能力差异主要在于常温下抑制 $\cdot OH$ 能力和SOD活性较低,抑制 O_2^- ·能力、CAT和POD活性及 H_2O_2 含量较高并维持较高水平,表明龙眼果肉在较高贮温下,更易遭受来自 $\cdot OH$ 、 H_2O_2 和 O_2^- ·等活性氧自由基的伤害,但POD、SOD和CAT对自由基的诱导反应比低温下更为积极.

3.2 龙眼果肉衰老过程中抗氧化能力与相关酶的关系

由于单一的抗氧化成分难以准确反应生物体实际抗氧化应激能力,且单一成分的变化尚不能完全说明氧化损伤已经发生及其程度,而TAOC可以较为综合的反映机体总的抗氧化能力,反映出组织对氧化刺激的抵抗力或者易感性^[5,12].抑制 O_2^- ·和 $\cdot OH$ 能力则是反映生物体对 O_2^- ·和 $\cdot OH$ 这2种特定自由基的系统清除能力的重要指标,与相关防御系统清除物质及其能力有关.本研究中的相关分析表明,这3种抗氧化能力指标在2种贮温下彼此之间均无显著相关性,也说明TAOC不能够反映出龙眼果肉在衰老过程中各种抗氧化能力的高低及其相互间的协同作用,因此研究机体某些特定的抗氧化成分及氧化物质的改变,能够更准确地评价其抗氧化能力的高低.

研究表明,4℃下SOD在龙眼果肉低温衰老过程中的抗氧化作用不明显,POD和CAT发挥了主要作用,且两者极显著负相关;活性氧自由基对果肉的伤害形式以 O_2^- ·和 H_2O_2 为主,而膜脂氧化产物的形成与 O_2^- ·的产生关系密切.低温下SOD的抗氧化作用不太明显,可能有其他形式的抗氧化物质共同参与 O_2^- ·的清除过程,并发挥重要作用.在20℃下,与果肉衰老密切相关的指标仅有抑制 $\cdot OH$ 能力,SOD和POD与之密切相关,且两者极显著正相关,并与抑制 O_2^- ·能力、MDA和 H_2O_2 含量密切相关,表明POD和SOD在常温下发挥了主要的抗氧化作用, O_2^- ·、 $\cdot OH$ 和 H_2O_2 均是伤害龙眼果肉的主要活性氧自由基,而CAT在抗氧化过程中的作用不明

显,说明CAT非清除 H_2O_2 的主要物质,可能有其他形式的抗氧化物质共同参与了这一过程.可见,在不同温度条件下,龙眼果肉的自由基伤害形式和抗氧化途径均有所侧重,从而表现出温度变化所带来的复杂生理活动形式.

POD酶在2种温度下均表现出了积极的抗氧化作用,与果肉抑制 $\cdot OH$ 和 O_2^- ·能力的变化表现出较高的关联性.但2种温度下POD活性与抑制 $\cdot OH$ 能力的关系相反,在20℃下,随着POD活性升高,抑制 $\cdot OH$ 能力反而下降,可能是因为高温下 $\cdot OH$ 积累浓度过高,抑制 $\cdot OH$ 能力消耗较快,因而逐渐降低;或者有其他形式抗氧化物质与POD协同作用,从而导致抑制 $\cdot OH$ 能力和POD活性变化规律不一致,这些问题还有待进一步研究探讨.

参考文献:

- [1] 施清. 龙眼采后生理特性及保鲜技术研究[J]. 福建果树, 1990(2): 1-4.
- [2] 韩冬梅, 吴振先, 陈维信, 等. 龙眼采后果肉生理生化变化研究[J]. 华南农业大学学报, 2002, 23(1): 20-23.
- [3] 林河通, 赵云峰, 席珂芳. 龙眼果肉采后果肉自溶过程中的细胞壁组分及其降解酶活性的变化[J]. 植物生理与分子生物学报, 2007, 33(2): 137-145.
- [4] 郑雪芳, 林抗美, 张秋芳, 等. 龙眼贮藏过程中相关保护酶活性的变化分析[J]. 中国农学通报, 2008, 24(增刊): 89-91.
- [5] 卢小英, 叶怀庄, 蔡德雷, 等. 用总氧自由基清除能力测定生物样品及抗氧化剂的总抗氧化能力[J]. 环境与健康, 2003, 20(5): 275-276.
- [6] 蒋跃明. 荔枝(*Litchi chinensis* Sonn)果实采后果皮褐变的研究[D]. 广州: 中山大学, 1997.
- [7] 曾邵西. 低温光照下与黄瓜子叶叶绿素降低有关的酶促反应[J]. 植物生理学报, 1991, 17(2): 171-182.
- [8] CHANCE B, MAEHLY A C. Assay of catalase and peroxidase[J]. Methods Enzymol, 1995(20): 755-764.
- [9] 邵从平, 罗广华, 王爱国, 等. 几种检测超氧化物歧化酶活性反应比较[J]. 植物生理学通讯, 1983(5): 46-49.
- [10] HEATH R L, PACKER L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I: Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation[J]. Arch Biochemistry Biophysical, 1968, 125(1): 189-198.
- [11] SIES H. Biochemistry of oxidative stress[J]. Angewandte Chemie, 1986, 25(12): 1058-1071.
- [12] LEJA M, A MARECZEK, ROZEK A S. Antioxidant ability of broccoli flower buds during short-term storage[J]. Food Chemistry, 2001, 72(2): 219-222.

【责任编辑 周志红】