

低温对荔枝果肉膜脂过氧化和保护酶活性的影响

胡位荣^{1,2}, 张昭其^{1*}, 季作梁¹, 刘顺枝²

(1. 华南农业大学广东省果蔬保鲜重点实验室, 广东 广州 510642; 2. 广州大学生物与化学工程学院, 广东 广州 510405)

摘要: 对‘白蜡’荔枝果肉在 3℃ 和 -1℃ 下的贮藏效果及果肉膜脂过氧化和保护酶活性进行了研究。结果表明, 去果皮的荔枝果肉在 3℃ 下贮藏 40 d, -1℃ 下保鲜 50 d, 不表现冷害症状。低温下果肉的细胞膜透性、丙二醛 (MDA) 含量逐渐增加。冷藏 30 d, -1℃ 与 3℃ 果肉之间的膜透性、MDA 含量没有显著差异, 但 30 d 后, -1℃ 处理明显延缓了果肉膜透性和 MDA 含量的增加。在 3℃ 下贮藏果肉的超氧化物歧化酶 (SOD) 和抗坏血酸过氧化物酶 (ASA-POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性在 20 d、过氧化物酶 (POD) 活性在 30 d 时分别到达峰值。-1℃ 延缓了这些保护酶活性的升高并降低了峰值。

关键词: 荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.); 果肉; 低温冷藏; 膜脂过氧化; 保护酶

中图分类号: Q945.78

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2005)01-0008-05

Effect of Low-temperature Storage on Membrane Lipid Peroxidation and Activities of Cell Defense Enzyme in Litchi Pulp

HU Wei-rong^{1,2}, ZHANG Zhao-qi¹, JI Zuo-liang¹, LIU Shun-zhi²

(1. Guangdong Provincial Key Lab. of Postharvest Physiology and Technology of Fruits and Vegetables, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. School of Biology and Chemistry Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510405, China)

Abstract: Pulp of litchi (cv. Baila) was used to investigate the changes of membrane lipid peroxidation and the activities of cell protective enzymes during storage at low temperatures. The results showed that the litchi pulp could be maintained well for 40 days at 3℃ or 50 days at -1℃ without symptoms of chilling injury. The cell membrane electrolyte leakage and malondialdehyde (MDA) content of the pulp stored at 3℃ or -1℃ increased gradually with time of storage, and showed no marked difference between the two temperature treatments within 30 d of storage. However, the treatment at -1℃ significantly delayed the increase of cell membrane electrolyte leakage and MDA content after 30 days of storage. The activities of superoxide (SOD), ascorbic acid-peroxidase (ASA-POD), catalase (CAT) in the pulp stored at 3℃ reached their peaks at the 20th day and peroxidase (POD) at the 30th day. Storage at -1℃ inhibited the activities of these protective enzymes and reduced their peak values, thereby, significantly slowed down pulp senescence.

Key words: Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.); Pulp; Low-temperature storage; Membrane lipid peroxidation; Protective enzyme

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 以其色艳、肉白、汁多、味佳而著称, 但荔枝采后果皮易褐变、果肉质变、果实腐烂, 被认为是最不耐贮的水果之一。国内外对荔枝果实采后生理及贮运保鲜技术研究主要集中在果皮上, 即试图防止其“色变”^[1,2]。对于荔枝

果肉“味变”的研究多局限于果肉营养成分变化, 而有关果肉的其他生理生化变化极少报道^[3]。已有的研究表明, 植物膜系统结构和功能完整性的丧失是衰老初期的基本特征^[4]。其中, 细胞膜脂过氧化作用形成的自由基等直接或间接地参与了组织的衰

收稿日期: 2004-01-05 接受日期: 2004-04-01

基金项目: 国家自然科学基金农业倾斜项目(30070534)资助

* 通讯联系人 Corresponding author

老进程。本文以‘白蜡’果肉为材料,研究低温特别是果实冷害温度条件下贮藏时荔枝果肉的膜脂过氧化和超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等保护酶活性的变化,以完善荔枝果实冷害生理,为探索荔枝长期保鲜新方法提供理论基础。

1 材料和方法

材料与处理 采自茂名的8-9成熟的荔枝白蜡(*Litchi chinensis* Sonn. cv. Baila),入库预冷,挑选无病虫害和机械伤的果实,经0.5%漂白粉(有效成分为有效氯)及 0.5 g L^{-1} 施保功依次浸泡2 min,晾干,仔细剥取大小相近的白蜡果肉,分装在塑料托盘中,用0.01 mm厚保鲜薄膜包装,以橡皮圈扎紧袋口,分别贮藏(3 ± 0.2)、(-1 ± 0.2) $^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱中(Sanyo牌,日本制造)。定期观测果肉外观及品质的变化,并取样冰冻。同时,用0.03 mm厚聚乙烯薄膜袋包装部分完整果实,置于(3 ± 0.2)、(-1 ± 0.2) $^{\circ}\text{C}$ 下贮藏,做比较观察。重复3次。

果肉、果实贮藏效果观察 定期取果肉、果实观察,以果肉的透明度、色泽、流汁与否、病菌生长等判断果肉的衰老程度;以果皮褐变指数、冷害褐变症状、病斑、果肉完好、硬实程度判断果实的贮藏效果。

果肉膜透性的测定 定期取果肉9个,蒸馏水漂洗2次,滤纸吸干,放入烧杯中,加双蒸水200 ml,薄膜封口,室温($28\text{--}30^{\circ}\text{C}$)放置30 min,以DDS-11A型电导仪测定浸出液的电导度。随后再将果肉及浸出液回流煮沸30 min,测定果肉全渗电导度。以浸出液电导度占全渗时电导度的百分率表示膜透性大小。重复3次。

MDA含量测定 参照邵从本等^[3]的方法,定期取荔枝果肉12个,剪取3.0 g,液氮磨碎,加入预冷的5.0 ml 0.05 mol/L pH 7.8磷酸缓冲液和0.2% PVP(聚乙烯吡咯烷酮 polyvinylpyrrolidone)匀浆。 4°C 下 $15\ 000\times\text{g}$ 离心15 min。取1 ml上清液于刻度试管中,加入3 ml 硫代巴比妥酸,记下刻度,置于沸水浴中反应30 min,取出冰水冷却,用双蒸水补足, $4\ 000\times\text{g}$ 离心20 min,以0.5%硫代巴比妥酸溶液为空白,分别测定 OD_{532} 、 OD_{600} 值。用 $\Delta E_{532\text{nm}-600\text{nm}}=155$ 计算MDA含量。重复3次。

果肉保护酶活性的测定 按MDA方法提取酶液,测定SOD^[5]。另从12个荔枝果肉取3.0 g,液氮磨碎,加入预冷的5.0 ml 0.15 mol/L磷酸缓冲液

(pH 6.8)和0.2% PVP匀浆。在 4°C 下 $16\ 000\times\text{g}$ 离心15 min,上清液用于POD、ASA-POD、CAT活性的测定,POD、ASA-POD和CAT活性分别按照张昭其^[2]、赵会杰^[6]和曾韶西^[7]的方法测定。重复3次。

2 结果和分析

2.1 果肉的低温贮藏效果

在低温条件下,白蜡果肉的贮藏期明显延长。 3°C 下贮藏30 d果肉透明,结构完整;40 d时果肉表面出现微小皱纹,第50天果面呈现出水状,略微浑浊;之后部分果面长出白色霉斑、红色斑点,触摸果面有发粘感觉。而 -1°C 下果肉在50 d时果面虽然有细微皱纹,但没有病菌侵染,果汁色泽正常(图1);60 d后,果肉与托盘的接触面塌陷,其余果面完好。完整果实在 3°C 下40 d时果皮已严重褐变,开始出现病菌;第50天,36.5%的果实被霜霉疫病侵染,果皮病斑崩裂,果肉表面开始出现黑斑块,随后,整个果实腐烂,果肉流汁、酸腐。 -1°C 贮藏30 d的果实果皮已完全冷害褐变;50 d的果皮虽然深褐色,但未出现病害,果肉结构、色泽仍然正常(图1);60 d时,果肉表面开始呈现均匀的浅褐色,是由冷害褐变果皮中的褐变物内渗所致;随贮藏时间延长,果皮上仍然没有可见的病原物,果肉表面的褐色加深,但没有出现腐烂或酸败现象。

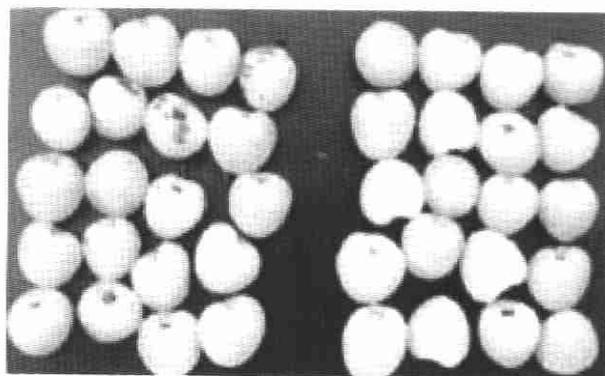


图1 白蜡果实不同温度冷藏50 d时的果肉外观(左: 3°C ;右: -1°C)

Fig. 1 Appearance of pulp of litchi 'Baila' fruits after 50 days of storage at 3°C (left) and -1°C (right)

2.2 对细胞膜透性的影响

白蜡果肉膜透性在低温贮藏过程中持续增加(图2A)。贮藏30 d内, -1°C 和 3°C 处理果肉的膜透性变化很接近;但30 d后,处理间的差异增大,达到显著水平($p < 0.05$)。 3°C 贮藏的果肉在第40天和第50天的膜透性分别为32.96%和56.42%;而

-1℃贮藏的果肉分别为 27.5%、34.83%，贮藏 60 d 的为 54.08%。

2.3 对 MDA 含量的影响

低温延缓了白蜡果肉 MDA 含量的增加(图 2B)。低温贮藏 30 d,MDA 保持较低的含量,3℃贮藏

的果肉的 MDA 含量略低于-1℃的。但 30 d 之后,MDA 含量均增加。3℃贮藏的果肉从第 30 天的 0.56 nmol g⁻¹ FW 升高到第 50 天的 1.84 nmol g⁻¹ FW,比新鲜果肉增加了 3.49 倍;-1℃下的果肉 MDA 含量变化比较小,60 d 时仅比新鲜果肉增加了 1.85 倍。

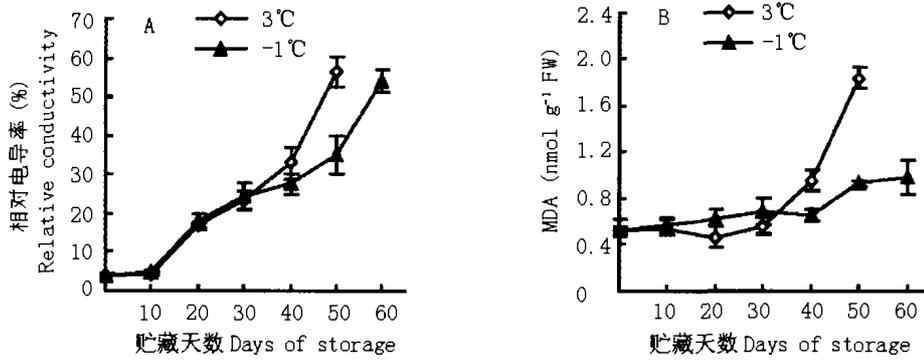


图 2 低温对白蜡果肉细胞膜透性(A)和 MDA 含量(B)的影响

Fig. 2 Effect of low temperature storage on cell membrane permeability (A) and malondialdehyde content (B) in litchi pulp

2.4 对保护酶活性的影响

SOD 活性 果肉在低温下 SOD 活性开始时降低,第 10 天后才回升(图 3)。3℃贮藏的果肉在第 20 天达到高峰值,随后较快地下降。-1℃下第 30 天时升至峰值,此后下降,第 50 天后又略有回升。

在整个贮藏期内,-1℃下果肉的 SOD 活性均低于 3℃的,活性高峰出现时间推迟,而且高峰值也下降了 23.5%。

POD 活性 从图 3 可以看出,3℃贮藏的果肉 POD 活性变化动态与-1℃基本相似。果肉低温

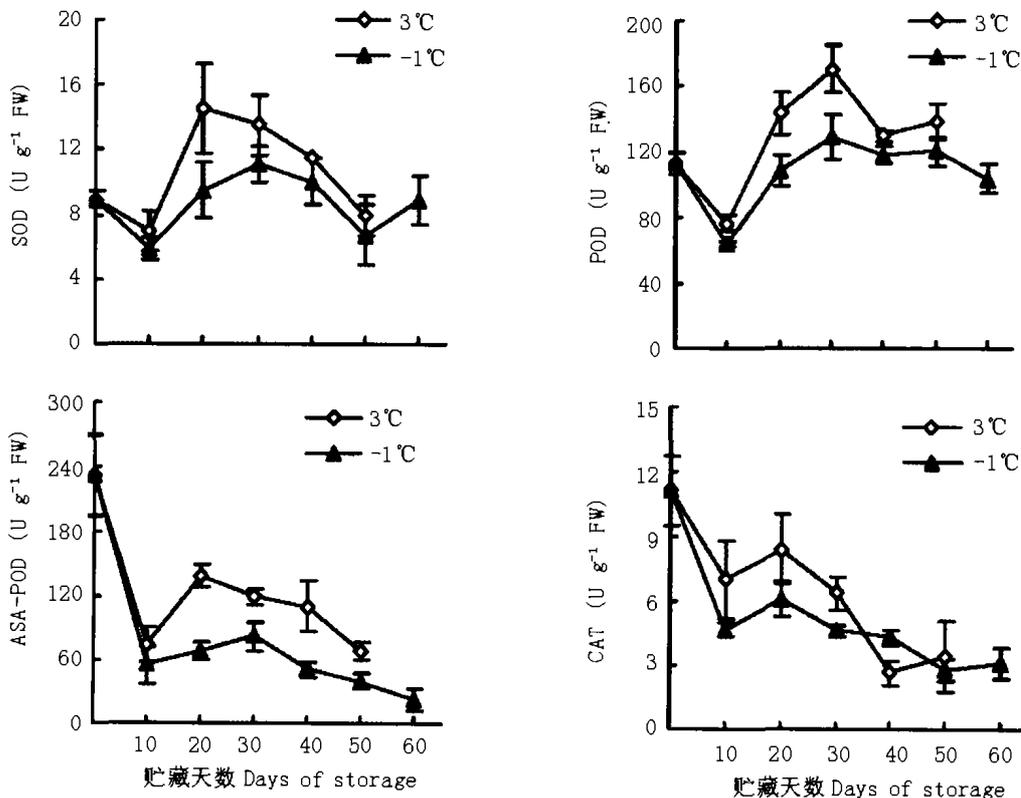


图 3 低温贮藏对荔枝果肉 SOD、POD、ASA-POD 和 CAT 活性的影响

Fig. 3 Effect of low temperature storage on activities of SOD, POD, ASA-POD and CAT in litchi pulp

贮藏后 POD 活性立即降低,适应低温环境后,开始升高,第 30 天达到高峰。 -1°C 下的果肉 POD 活性总是低于 3°C 果肉,峰值比 3°C 贮藏的果肉低 24.1%。

ASA-POD 活性 低温环境抑制了果肉 ASA-POD 活性(图 3)。在 3°C 下贮藏 10 d,白蜡果肉 ASA-POD 活性从常温的 $231.75\text{ U g}^{-1}\text{ FW}$ 降到 $75.21\text{ U g}^{-1}\text{ FW}$,随后活性回升,第 20 天形成小峰,之后缓慢下降。 -1°C 下果肉的 ASA-POD 活性变化趋势与 3°C 相似,只是活性高峰推迟到第 30 天出现;而且在整个贮藏过程中,ASA-POD 活性低于 3°C 果肉。

CAT 活性 低温贮藏使果肉的 CAT 活性呈下降趋势(图 3)。 3°C 下果肉的 CAT 活性在贮藏 10 d 内下降,随后上升,在第 20 天达到高峰,第 40 天后略有回升。 -1°C 下果肉 CAT 活性也在第 20 天形成一小峰,之后缓慢降低。虽然 3°C 的果肉 CAT 活性比 -1°C 果肉活性高(除第 40 天外),但它们之间的差异并不显著($p<0.05$)。

3 讨论

一般认为,荔枝果实贮藏适温是 3°C 。在 3°C 以下贮藏果实易发生冷害导致果皮褐变^[8]。本研究发现在 -1°C 下,去果皮的白蜡果肉没有出现冷害症状,50 d 时果肉结构、色泽正常(图 1);完整的白蜡果实在 -1°C 下贮藏 30 d 时果皮虽然已经完全冷害褐变,但是,贮藏到 60 d 甚至更长时间,其果肉仍然可以食用。考虑到荔枝果实结构的特殊性^[9],可以肯定地说,荔枝果肉的冷害临界温度明显低于果皮的冷害临界温度;因此,对于像荔枝一类的果实,可以先采用一定措施抑制果皮的冷害和褐变,然后将果实贮藏于果皮冷害临界点温度与果肉冷害临界点温度之间(如 -1°C)。这样一方面有利于抑制或控制采后病害的发生发展,另一方面又尽可能地降低了果肉的代谢活动,保存果肉的风味、品质,从而可大大延长果实保鲜贮运期。

膜透性的大小是植物衰老或受胁迫程度的指标之一^[10]。黄晓钰等^[9]发现荔枝果皮细胞电解质渗漏率达到 50% 时果实遭受不可逆的冷害。从图 2A 可知,在冷藏过程中,荔枝果肉的相对电导率呈持续上升趋势,在 30 d 内,2 种温度处理间没有明显差异,但在 3°C 贮藏 50 d 和 -1°C 贮藏 60 d 时膜透性都超过了 50%,开始出现衰败,表明果肉细胞膜透

性在低温贮藏期间的变化同样可以作为荔枝果肉衰老程度的指标之一。

在植物衰老过程中,清除自由基的酶系统活性的下降或紊乱会导致植物自身活性氧代谢失调,体内积累大量活性氧,诱导膜脂发生过氧化,导致膜脂过氧化产物增加,对植物造成伤害,加速衰老。可见,植物活性氧代谢失衡与植物的衰老进程是密切相关的^[4]。在本试验中,荔枝果肉冷藏 30 d 的 MDA 含量变化相对较小,随后,在 3°C 下的果肉 MDA 含量迅速增加,而 -1°C 下上升缓慢(图 2B)。在整个冷藏过程中,去果皮的白蜡果肉在 -1°C 下的 SOD、POD、ASA-POD 及 CAT 活性基本上都低于 3°C 果肉(图 3),这可能是因为,在不引起冷害的温度范围内,温度越低,相关酶活性受到的抑制程度越大。 -1°C 和 3°C 下果肉的酶活性变化趋势相似,即从常温移入低温环境时,酶活性被抑制,随后即回升,达到高峰后下降。由此可以推测,在低温贮藏前期,果肉通过自身的代谢调节以适应低温环境,使 SOD、CAT、POD 活性提高,以清除果肉的自由基,尽可能地延缓膜脂过氧化,降低果肉衰老速度。这可以从果肉的保护酶活性变化及 MDA 含量变化早于膜透性的变化得到证明(图 2、3)。荔枝采后贮藏过程中,果皮中发生的氧化和过氧化作用也呈现类似的变化规律^[3,11,12]。另外,ASA-POD 在冷藏前期较高的活性,有利于使果肉 Vc 分解,消除果肉中的 H_2O_2 。但在贮藏后期,随着果肉膜脂过氧化反应加强,MDA 含量增加(图 2B),膜系统被破坏,膜透性增加(图 2A),加上自由基清除酶的活性减弱(图 3),不能有效快速地清除体内的 O_2^- 和 H_2O_2 ,导致自由基积累,毒害细胞,MDA 含量和膜透性进一步增加,造成膜系统严重破坏,胞内物质外渗,最后果肉衰败。虽然在冷藏 10-30 d 期间,在 3°C 下果肉的 MDA 略低于 -1°C (图 2B);相应的,在 3°C 贮藏的果肉的保护酶系统活性维持在较高水平(图 3),但在整个贮藏期间, -1°C 处理较好地维持了果肉活性氧代谢的动态平衡,从而延缓了衰败进程。因此,如果在较好地解决了荔枝果皮护色难题后,将荔枝果实贮藏 in 更低的温度环境中(如 -1°C),可望进一步延长荔枝贮运保鲜期。

参考文献

- [1] Holcroft D M, Mitcham E J. Postharvest physiology and handling of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) [J]. Postharv Biol Techn, 1996, 9: 265-281.

- [2] Zhang Z Q(张昭其), Pang X Q(庞学群), Duan X W(段学武), et al. The anthocyanin degradation and anthocyanase activity during the pericarp browning of lychee fruit [J]. *Sci Agri Sin(中国农业科学)*, 2003, 36(8):945-949.(in Chinese)
- [3] Lin Z F(林植芳), Li S S(李双顺), Zhang D L(张东林), et al. The changes of oxidation and peroxidation in postharvest lychee fruit [J]. *Acta Bot Sin(植物学报)*, 1988, 30(4):382-387.(in Chinese)
- [4] Paliyath G, Droillard M J. The mechanism of membrane deterioration and disassembly during senescence [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1992, 30:789-812.
- [5] Shao C B(邵从本), Luo G H(罗广华), Wang A G(王爱国), et al. Comparing of methods for testing superoxide dismutase activity [J]. *Plant Physiol Comm(植物生理学通讯)*, 1983, (5):46-49.(in Chinese)
- [6] Zhao H J(赵会杰). Testing method of ascorbic acid content and ascorbic acid-peroxidase activity [A]. In: *Institute of Plant Physiology in Shanghai, CAS(中国科学院上海植物生理研究所), Shanghai Society for Plant Physiology (上海市植物生理学会). The Modern Experimental Manual of Plant Physiology [M]. Beijing: Science Press, 1999. 315-316.(in Chinese)*
- [7] Zeng S X(曾韶西). Enzymatic reactions related with chlorophyll degradation of cucumber cotyledon under low temperature and sunshine [J]. *Acta Phytophysiol Sin(植物生理学报)*, 1991, 17(2): 171-182.(in Chinese)
- [8] Huang X Y(黄晓钰), Kang D M(康德妹), Ji Z L(季作梁). The optimum storage temperature for litchi fruits and chilling injury to them [J]. *J South China Agri Univ(华南农业大学学报)*, 1990, 11 (3):13-18.(in Chinese)
- [9] Huang H B(黄辉白). Advances in fruit physiology of the arillate fruits of litchi and longan [J]. *Annu Rev Hort Sci(园艺学年评)*, 1995, 1:107-120.(in Chinese)
- [10] Markhart III A H. Chilling injury: a review of possible causes [J]. *HortScience*, 1986, 21(6):1329-1333.
- [11] Chen Y Z(陈贻竹), Li P(李平), Wang Y R(王以柔), et al. The effect of chilling temperature on respiration, electrolyte leakage and cold-storage life in litchi fruit [J]. *Acta Hort Sin(园艺学报)*, 1987, 14(3):169-173.(in Chinese)
- [12] Jiang Y M, Fu J R. Biochemical and physiological changes involved in browning of litchi fruit caused by water loss [J]. *J Hort Sci Biotechn*, 1999, 74(1):43-46.