

丁香提取液对脐橙采后生理 相关酶活性的影响

张阿珊¹, 曾 荣², 陈金印^{1*}, 付永琦¹

(1. 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045; 2. 佛山科学技术学院 食品科学系, 广东 佛山 528000)

摘要:为研究丁香提取液对脐橙贮藏过程中发病率和采后生理相关酶活性的影响, 以期丁香在果蔬保鲜中的合理应用提供理论依据, 以 50 mg/mL 的丁香提取液处理纽荷尔脐橙, 浸泡 5 min, 蒸馏水处理为对照, 阴凉通风处晾干后 PE 保鲜袋($d=0.04$ mm) 包装, (7 ± 1) °C、RH 85% 条件下贮藏, 每 10 d 统计青绿霉病发病率和测定相关生理生化指标。结果表明, 与对照相比, 丁香提取液处理显著降低了脐橙果实的发病率, 减少了 MDA 含量的积累, 还可推迟 SOD、POD 活性高峰的出现, 促进 PPO、CHT 及 PAL 活性升高, 而对 GUN 活性的变化影响不明显。说明丁香提取液处理脐橙果实可以有效延缓果实的新陈代谢活动, 减轻膜脂过氧化作用, 延缓果实衰老, 增强果实的防御系统。

关键词:丁香提取液; 脐橙; 采后生理; 酶活性

中图分类号: TS255.36 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)06-1067-05

Effects of Clove Extract on Post-harvested Physiology Associated Enzyme of Navel Oranges

ZHANG A-shan¹, ZENG Rong², CHEN Jin-yin^{1*}, FU Yong-qi¹

(1. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. Department of Food Science, Foshan University, Foshan 528000, China)

Abstract: The aim of the research was to study the effects of clove extract on the disease incidence and postharvested physiology associated enzyme of navel orange during storage. Newhall navel oranges were treated with 50 mg/mL clove extract, soaked for 5 minutes, and stored at (7 ± 1) °C, RH85%, with distilled water treated as the control. The relevant physiological-biochemical quality was measured every 10 days. The results showed that treatment of clove extract can reduce the disease incidence and accumulation of MDA, postpone the appearing time of SOD and POD climactic values. In addition, it is favorable to the increase in PPO activity and CHT activity as well as PAL activity, but has little effect on GUN activity. In summary, treatment of clove extract can not only slower metabolism of the fruit, but also repress the cell membrane oxidation and improve fruit resistance.

Key words: clove extract; navel orange; postharvested physiology; enzyme

收稿日期: 2011-08-31 修回日期: 2011-10-03

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划(2007BAD61B07) 和江西省主要学科学术和技术带头人培养计划项目(050007)

作者简介: 张阿珊(1986—) 女, 硕士生, 主要从事果实采后生理与处理技术研究, E-mail: zhangashan0919@yahoo.com.cn;

* 通讯作者: 陈金印, 教授, 博士, E-mail: jinyinchen@126.com。

赣南脐橙产业是江西省具有国际竞争力的优势主导产业,年种植面积超过10万 hm^2 ,总产量突破110万t,但是80%为中熟品种——纽荷尔,均在11月中、下旬成熟,上市时间过于集中^[1]。随着赣南脐橙种植规模的扩大,果实集中销售的压力越来越严峻。为了调节脐橙果品的上市期,延长其供应期,脐橙果实的贮藏保鲜显得尤为重要。但是以往经常使用的采后化学防腐杀菌剂容易造成果实表面残留,对人体健康和环境产生不利影响。随着人们食品安全和环保意识的提高,化学防腐杀菌剂的使用安全性越来越受到消费者的质疑。天然保鲜剂高效、无毒、低成本,采用其处理的果蔬受到消费者的普遍欢迎^[2]。近年来在果蔬采后保鲜中,出现了以天然防腐剂代替化学合成防腐剂的趋势。所以寻找天然的杀菌剂代替化学防腐保鲜剂来保鲜果蔬已经成为科学工作者研究的热点。

植物中含有很多天然的化学成分,许多植物的提取液具有杀菌、抑菌作用。丁香(*Syzygium aromaticum*)为一种常见的中草药,含有丰富的丁香酚,具有广谱、高效的抑菌作用,对多种霉菌和致病菌均有明显的抑制效果,无任何化学残留和毒副作用,不污染环境^[3]。在我国已有丁香提取液用于草莓、金秋梨、鲜切西兰花等果蔬的贮藏保鲜并取得良好效果的报道^[3-5],而用于脐橙的贮藏保鲜尚未见报道。李百健等^[6]的研究已表明丁香丙酮提取液对柑橘采后致病菌意大利青霉和指状青霉有较强的抑制作用。本试验研究了丁香提取液对脐橙贮藏过程中发病率及采后生理相关酶活性的影响,以期对丁香在果蔬保鲜中的合理应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

纽荷尔脐橙:八到九成熟,采自江西赣州信丰县,采后立即装箱运回江西农业大学果蔬保鲜重点实验室,预贮1d。公丁香:购于江西省樟树市华丰药业。

1.2 试验方法

1.2.1 丁香提取液的制备 称取经粉碎(过40目筛)的丁香100g,加入10倍体积的体积分数为95%乙醇,超声辅助提取2h,过滤后浓缩,制得原液(1g/mL),4℃下保存备用。

1.2.2 试验设计 根据本实验室前期最低抑菌浓度试验^[6],采用50mg/mL为供试丁香提取液浓度。取丁香原液用蒸馏水稀释为50mg/mL,将脐橙放入丁香提取液中浸泡5min,以蒸馏水处理为对照,取出后置于阴凉通风处晾干,PE保鲜袋($d=0.04\text{mm}$)包装,放入冷柜低温贮藏($T:(7\pm 1)^\circ\text{C}$,RH:85%左右)。每个处理100个果用于测定各项指标,60个果用于统计发病率,重复3次。每10d统计果实发病率(以青霉病和绿霉病为主)并测定相关生理生化指标。每次测定随机抽取6~8个果实,各项指标均取果皮测定。

1.2.3 测定方法 发病率/% = 发病果实数/总果数 $\times 100$ (1)

丙二醛(MDA)采用双组分分光光度法测定^[7];超氧化物歧化酶(SOD)采用NBT还原法测定^[7];过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、几丁质酶(ChT)、 β -1,3-葡聚糖酶(GUN)均根据曹建康等^[8]的方法测定。苯丙氨酸解氨酶(PAL)根据高俊凤^[7]的方法改进后测定:称取经液氮研磨后的果皮2g,加入6mL提取液(含50mmol/L、pH8.8 Tris-HCl缓冲液;15mmol/L β -巯基乙醇;5mmol/L EDTA;5mmol/L Vc;1mmol/L PMSF;0.15% PVP)混匀后12000r/min 4℃离心20min,上清液即为PAL粗酶液。反应体系为0.1mL酶提取液,2.9mL反应液(含16mmol/L L-苯丙氨酸,3.6mmol/L NaCl,50mmol/L、pH8.9 Tris-HCl)2份,1份混匀加入0.5mL 6mol/L HCl后立即测定在290nm处的OD值;另1份在37℃下震荡反应1h后,加入0.5mL 6mol/L HCl终止反应,12000r/min离心10min,取上清液在290nm处比色。参比为不加L-苯丙氨酸(加入0.1mL ddH₂O)。OD值每变化0.01就生成1 μg 反式肉桂酸,以每小时生成的肉桂酸的量来表示酶活性。

1.2.4 数据统计分析 采用Excel 2003软件进行数据统计,所有数据为3次重复的平均值和标准差,并应用DPS软件,采用邓肯氏新复极差法对数据进行差异性分析。

2 结果与分析

2.1 丁香提取液对脐橙果实发病率的影响

由表1可知,对照在贮藏后30d出现发病果,丁香提取液处理的果实在贮藏后60d才出现发病果,在整个贮藏期间,处理果的发病率一直低于对照果,贮藏末期对照果发病率达到了9.5%,而处理果发病率只有5.1%,差异极显著($P<0.01$)。

表 1 丁香提取液对脐橙果实发病率的影响
Tab.1 Effect of clove extract on disease incidence during storage

%

处理 Treatment	贮藏天数/d Storage days									
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
丁香 Clove extract	0	0	0	0**	0**	0**	2.2**	3.8**	4.5**	5.1**
对照 Control	0	0	0	2.1**	3.9**	6.0**	6.2**	7.6**	8.3**	9.5**

** 表示差异 1% 水平显著性。 ** significant at 0.01 level.

2.2 丁香提取液对脐橙果实 MDA 含量的影响

MDA 是膜脂过氧化最重要的产物之一。由图 1 可以看出, 贮藏过程中脐橙果实的 MDA 含量一直上升, 贮藏前期上升较缓慢, 30 d 以后开始快速上升。MDA 含量越高, 果实的膜脂过氧化作用越强, 细胞受损伤越厉害。贮藏过程中丁香提取液处理的果实 MDA 含量一直低于对照, 达到差异显著水平 ($P < 0.05$)。

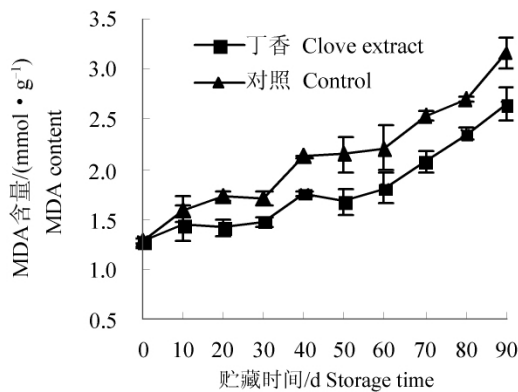


图 1 脐橙果实贮藏过程中 MDA 含量的变化

Fig.1 Change of MAD content in navel orange during storage

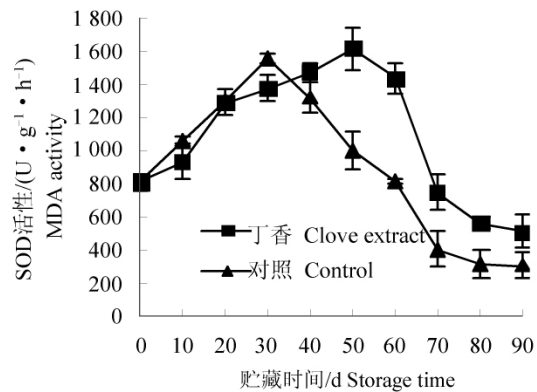


图 2 脐橙果实贮藏过程中 SOD 活性的变化

Fig.2 Change of SOD activity in navel orange during storage

2.3 丁香提取液对脐橙果实 SOD 活性和 POD 活性的影响

SOD 是植物体内清除 O_2^- 的保护酶, 它可以清除细胞自由基, 减少自由基对膜的损伤, 从而延缓细胞衰老。如图 2 所示, SOD 活性在贮藏前期逐渐上升, 达到高峰后下降, 到贮藏末期变化趋于平缓。对照果实在贮藏第 30 天出现 SOD 活性高峰, 峰值为 $1554.5 U/(g \cdot h)$, 而丁香提取液处理的果实比对照晚 20 d, 即在贮藏第 50 天的时候出现活性高峰, 峰值为 $1613.0 U/(g \cdot h)$, 且以后的 SOD 活性显著高于对照 ($P < 0.05$)。

POD 也是植物体内重要的保护酶之一, 丁香提取液处理推迟了 POD 活性高峰的出现(处理比对照晚 10 d), 使贮藏后期处理的 POD 活性高于对照, 但没有改变峰值的大小(图 3)。贮藏初期果实中的活性氧与自由基的产生和消耗相对稳定, 随着贮藏时间越来越长, 产生的自由基和活性氧越来越多, 导致 SOD 活性和 POD 活性的升高直到出现活性高峰, 最后由于果实的衰老, SOD 和 POD 的活性又下降。但 SOD 和 POD 活性的变化并不是同步的, 与 SOD 相比, POD 活性高峰的出现比 SOD 晚 40 d 左右, POD 活性高峰出现在 SOD 活性下降的过程中。SOD 活性下降说明果实开始衰老, 这时候 POD 活性在上升, 这与一般认为果实衰老时 POD 活性上升的观点相符。SOD 与 POD 相互作用可以更好地保护果实细胞, 延缓果实细胞的衰老。

2.4 丁香提取液对脐橙果实 PPO 活性、CHT 活性和 GUN 活性的影响

PPO 可将酚类物质氧化成高毒性的醌类物质从而对入侵病原物进行毒杀, 从而增加植物对病原体的抗性, 还可促进伤口的愈合^[9]。由图 4 可以看出, 在贮藏过程中, PPO 活性先上升后下降, 丁香提取液处理的果实 PPO 活性一直高于对照, 达到差异显著水平 ($P < 0.05$)。CHT 与 GUN 的活性与果实采后抗病性也密切相关。如图 5 所示, 处理和对照的果实 CHT 活性在贮藏前期均先下降, 在贮藏第 30 天的时候开始上升, 但是对照在第 50 天的时候开始缓慢下降, 而丁香提取液处理的果实 CHT 活性仍保持上升的趋势, 在贮藏后期, 处理的果实 CHT 活性明显高于对照, 达到差异显著水平 ($P < 0.05$)。但是处理

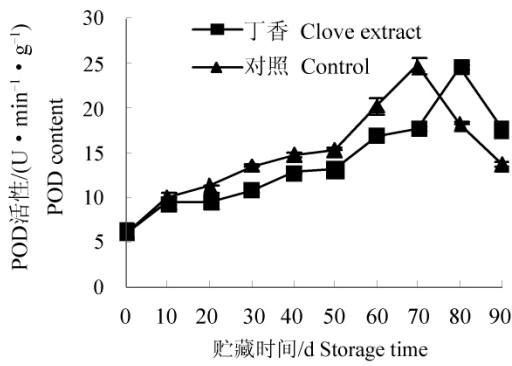


图 3 脐橙果实贮藏过程中 POD 活性的变化

Fig. 3 Change of POD activity in navel orange during storage

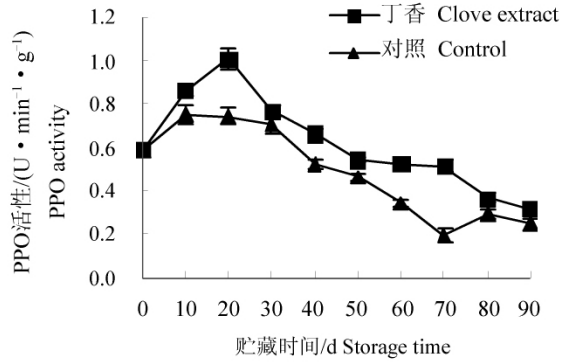


图 4 脐橙果实贮藏过程中 PPO 活性的变化

Fig. 4 Change of PPO activity in navel orange during storage

和对照的 GUN 活性在贮藏过程中均呈下降趋势,贮藏 20 d 以后两者的 GUN 活性都很接近,在贮藏后期稍有起伏地稳定在一个水平上。可知,虽然同是抗性相关酶,但丁香提取液处理使果实的 PPO 和 CHT 活性比对照高,对 GUN 活性却基本没有影响,这可能是由于几种酶的作用机理不一样。

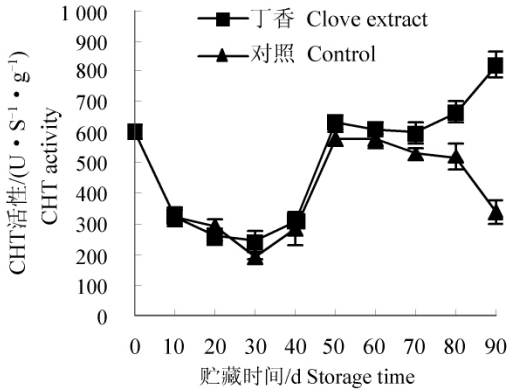


图 5 脐橙果实贮藏过程中 CHT 活性的变化

Fig. 5 Change of CHT activity in navel orange during storage

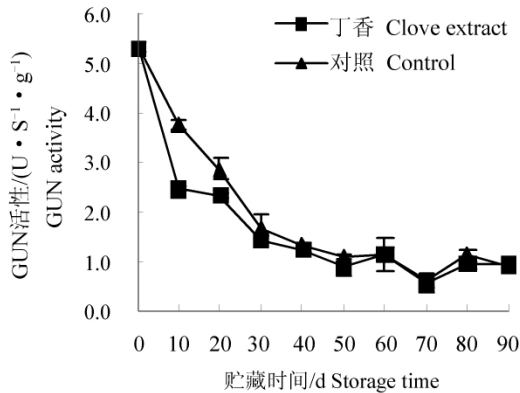


图 6 脐橙果实贮藏过程中 GUN 活性的变化

Fig. 6 Change of GUN activity in navel orange during storage

2.5 丁香提取液对脐橙果实 PAL 活性的影响

PAL 是植物体内苯丙烷代谢途径的关键酶,在植物的次生代谢和抗病代谢中具有重要作用。贮藏过程中 PAL 活性的变化呈现双峰曲线,丁香提取液处理的果实 PAL 活性在 40 ~ 70 d 的时候与对照接近,其他时间都明显高于对照,达到差异显著水平 ($P < 0.05$),且处理的果实第 1 次活性高峰出现的时间比对照早,第 2 次活性高峰出现的时间比对照晚,在贮藏后期,处理的 PAL 活性明显高于对照(图 7)。

3 讨论与结论

柑橘类果品采后主要病害是意大利青霉 (*P. italicum*) 侵染引起的青霉病和指状青霉 (*P. digitatum*) 侵染引起的绿霉病。李百健等^[6]的试验已经表明丁香丙酮提取液对意大利青霉和指状青霉有较强的抑制作用,本试验的研究结果也表明丁香乙醇提取液处理脐橙果实可以显著降低果实贮藏过程中青霉菌病的发病率。

MDA 是膜脂过氧化的产物,可使纤维素分子间的桥键松解,蛋白质发生交联形成变性的高聚物,或抑制蛋白质的合成,加速果实的衰老进程^[10],其含量的多少在一定程度上可以代表细胞膜损伤程度的大小。本试验中,丁香提取液处理降低了果实 MDA 含量的积累,使细胞膜渗透率上升的速度降低。植物组织衰老时,膜脂过氧化作用加强,而 SOD 和 POD 等保护酶类能清除活性氧自由基 O_2^- ,有效防止膜脂过氧化作用^[11]。本试验结果表明丁香提取液处理延缓了 SOD 活性高峰的出现,并抑制其下降。POD 活性的变化常用来作为果实后熟和衰老的一种指标,一般认为果实衰老时 POD 活性上升,参与与衰老有关的氧化反应,抑制该酶的活性可抑制果实的衰老过程^[12]。本试验中,丁香提取液处理抑制了 POD

活性的上升,延缓其活性高峰的出现,且 POD 活性高峰出现在 SOD 活性下降的过程中,这与曾荣等^[10]的研究结果相符。所以试验结果表明,丁香提取液处理使果实清除活性氧自由基能力增强,抑制了膜脂过氧化过程,从而延缓果实衰老。

PPO 与植物抗病性的关系人们已进行了广泛的研究。植物在抵御病原微生物的侵染过程中,抗性相关酶发挥了重要作用,主要包括酚类代谢系统中的一些酶和病原相关蛋白家族。PPO 通过催化木质素及醌类化合物形成,构成保护性屏蔽而使细胞免受病菌的侵害,也可通过形成醌类物质直接发挥抗病作用。本试验中,丁香提取液处理的果实 PPO 活性一直高于对照。CHT 是植物体内一种与防御有关的次生水解酶,能催化真菌细胞壁的重要成分几丁质的水解,从而抑制真菌的生长繁殖,提高植物体抗病性,CHT 活性增强与植物诱导抗性的建立关系密切^[13]。本试验中,在贮藏后期,丁香提取液处理的果实 CHT 活性上升,显著高于对照。说明丁香提取液处理的果实 PPO 和 CHT 活性高,这可能是由于处理提高了果实的抗性。GUN 也是一种病程相关蛋白,是植物抗真菌病的重要抗性物质之一,但是本试验中丁香提取液处理的果实 GUN 活性与对照在整个贮藏过程中都比较接近,均呈下降趋势,说明丁香提取液处理对 GUN 这种抗性酶影响不大,其原因还有待进一步研究。

PAL 是植物体内苯丙烷类代谢途径中的限速酶,调控酚类物质和木质素在植物体中的合成和积累,参与植物抗病次生物质的合成与积累,其活性的高低在一定程度上反映植物在特定时期次生代谢物质合成的速度,是衡量植物抗病能力大小的重要指标^[14]。果实受侵染组织苯丙烷代谢会显著加强,苯丙烷代谢的关键酶 PAL 活性显著增强, PAL 活性升高被认为是系统获得抗性的表现^[15]。诱导 PAL 活性升高能增强植物抗性,相反,抑制 PAL 活性则能抑制植物抗性^[16]。本试验研究结果表明丁香提取液处理使 PAL 活性升高,说明丁香提取液处理可能提高了果实的抗性。

参考文献:

参考文献:

- [1]郭琳琳,刘庆,伊华林.2种保鲜方法对脐橙果实风味和色泽变化的影响[J].果树学报,2007,24(60):792-795.
- [2]曾荣,李平,陈金印.天然保鲜剂与果蔬采后生理[J].食品与发酵工业,2004,37(11):138-142.
- [3]吕建华,周庆新,周沙沙,等.丁香提取液对草莓保鲜效果的影响[J].食品与生物技术学报,2009,28(5):633-636.
- [4]吴文勇.不同中草药提取液对金梨贮藏期的保鲜效果[J].山地农业生物学报,2008,27(3):224-227.
- [5]甄天元,彭晓蓓,李文香,等.丁香提取液对鲜切西兰花保鲜效果的影响[J].食品科学,2011,32(10):279-282.
- [6]李百健,曾荣,黄长干,等.植物杀菌剂的筛选[J].西南大学学报:自然科学版,2010,32(10):28-31.
- [7]高俊凤.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2006:210-213,219-220.
- [8]曹建康,姜微波,赵玉梅.果蔬采后生理生化实验指导[M].北京:中国轻工业出版社,2007:102-105,144-150.
- [9]Mohammadi M, Kazemi H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* induced resistance[J]. Plant Science, 2002, 162(4):491-498.
- [10]曾荣,李平,陈金印.天然保鲜剂涂膜处理对猕猴桃果实活性氧代谢的影响[J].保鲜与加工,2005,5(5):29-31.
- [11]王秋芳,乔勇进,乔旭光,等.臭氧处理对巨峰葡萄品质与生理化的影响[J].果树学报,2010,27(1):63-68.
- [12]Sala Jose M, Lafuente M. Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling[J]. Postharvest Biology and Technology, 2000, 20(1):81-89.
- [13]许梦秋,钟增明,龚琰,等.几丁质酶在植物病害生物防治中的应用[J].现代农业科技,2010(5):122-123.
- [14]Stadnik M J, Buchenauer H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by entomopathogenic fungi in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici*[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2000, 57(1):25-34.
- [15]Marc D A, Zhixiang C, Daniel F K. Possible involvement of lipid peroxidation in salicylic acid mediated induction of PR-1 gene expression[J]. Phytochemistry, 1998, 47(4):555-566.
- [16]张举印,饶景萍,董晓庆,等.壳聚糖复合涂膜对红富士苹果采后生理相关酶活性的影响[J].食品科技,2010,35(3):48-52.

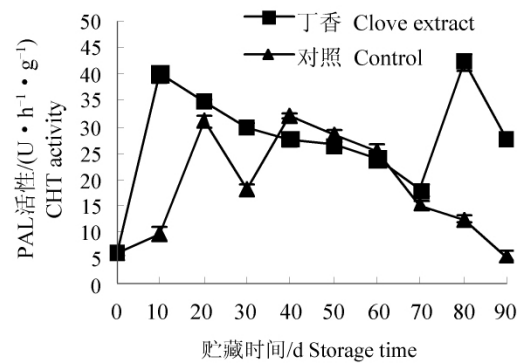


图7 脐橙果实贮藏过程中 PAL 活性的变化

Fig. 7 Change of PAL activity in navel orange during storage