# 不限制氧气条件下，高CO 2水平对低温贮藏的草莓发酵，过氧化和细胞水分胁迫的影响

**摘要：**

为了更好地了解草莓在贮藏气氛中对高CO2的耐受性，研究存在条件：0°C ，20％O2+不同CO2水平（0％，20％或40％）下保存3天和6天的发酵和细胞损伤。分析了丙酮酸脱羧酶（PDC）和醇脱氢酶（ADH）基因表达、发酵代谢产物、结合水和丙二醛（MDA）浓度的变化。在没有添加CO2的情况下储存的草莓中，PDC和ADH的上调与推断代谢产物的增加无关。相比之下，暴露于20％CO2的水果中适度的乙醇发酵似乎对于维持水果代谢，减少脂质过氧化和细胞水分胁迫都是必不可少的。但是，如果CO2浓度增加（40％），所产生的过量乙醛和乙醇与结合水的减少和MDA的产生密切相关。

**关键词：**高CO2水平，发酵基因，乙醛，乙醇，丙二醛，结合水

**1前言：**

低温可用于延长草莓的储存寿命并减缓真菌的腐烂（主要是灰霉病（灰葡萄孢）在低至0°C的温度下生长所致），因此，依靠低温储存来有效地控制灰霉病必须涉及一定的辅助处理以在保持水果的品质的同时增强抗病能力。商业上使用高CO2水平（15-20％）作为限制真菌衰变的有效手段。尽管不同品种对高CO2耐受性不同，并且它们积累了不同水平的发酵代谢产物（如乙醛和乙醇）。这些发酵产物会影响果实的品质，并可能充当天然的杀菌剂或杀虫剂。

草莓以其美味的风味和营养价值而受到高度赞赏，是多酚的特别好来源，其中黄烷-3-醇单元的缩合产生的原花青素是主要的酚类化合物。遗传和生长条件影响原花青素的含量和组成，但是数量差异通常是由环境存储条件驱动的。黄烷-3-醇对人类健康有积极作用，并有助于抵抗不同真菌。有趣的是，短期高CO2处理（20％CO2处理3天）可以积累（ +）-儿茶素和原花青素B1和B3.。在一些涩型水果（例如柿子）中，高CO2处理（95-100％CO2）

可以去涩，主要是乙醛通过聚合反应降低可溶性单宁的浓度。

除上述因素外，高CO2含量还改变了几种耐高CO2含量的水果（如食用葡萄和草莓）的水状态，影响不可冻结（结合）水含量（通过差示扫描量热法（DSC）检测到的）。尽管 乙醇是一种小的极性分子，能够进入膜的水合层并削弱脂质间的氢键，很少研究其对果实细胞水的影响。水分子在维持细胞膜，参与氢键网络或水合层中起主要结构作用。在代谢中，低至5％（w / v）的乙醇浓度会充分降低水的利用率，从而产生代谢性后果。因此，我们假设维持细胞膜结构必不可少的入水扰动可能与发酵代谢产物积累的变化有关。而且(并且与上文一致) 据报道，高CO 2处理的某些影响可能是通过发酵代谢产物的积累而发生的。

然而，过高的CO 2处理也可能对与氧化应激有关的草莓品质产生不利影响。活性氧（ROS）速率提高(导致氧化损伤)是许多压力环境条件下的重要组成部分。ROS被认为是通过直接脂质过氧化作用破坏细胞的完整性而导致损伤。脂质过氧化作用可能导致自由基链反应，通常伴随着多种产物的形成，包括烷烃和羰基化合物。 脂质过氧化最广泛使用的指标是丙二醛（MDA）形成，通常通过硫代巴比妥酸（TBA）测定，但是，其他几种化合物也可与TBA发生反应，导致MDA含量过高。 用二硝基苯hydr（DNPH）衍生化后通过HPLC和紫外检测对MDA进行定量测定，极大地提高了MDA分析的选择性和分析检测极限，因此在本工作中使用这项技术，我们尝试查看过高的CO2处理量（40％）或过分低温的温度（0°C）储存所造成的损坏是否也可归因于氧化应激。

发酵代谢与包括苹果酸在内的呼吸底物的可用性密切相关，苹果酸的氧化脱羧作用导致丙酮酸的形成，最终可能转化为发酵化合物。乙醇发酵代谢的激活应允许NAD +再生，从而可以产生净ATP。在乙醇发酵途径的第一步中，丙酮酸是丙酮酸羧化酶（PDC）的底物，可产生CO2和乙醛。随后，乙醛被还原为乙醇，同时乙醇脱氢酶（ADH）将NADH氧化为NAD +。据报道，在高CO2 /低氧条件下，草莓和香蕉中PDC和ADH的活性和基因表达发生了变化。然而，关于草莓中无限制O2条件下高CO2水平的具体影响的信息很少。

这项研究的目的是首先确定低温和高CO2水平对ADH和PDC表达以及对发酵代谢产物：乙醇和乙醛水平的影响。因此，分析了这些基因和发酵代谢产物的转录丰度，分析了0°C储存期间暴露于不同CO2浓度（0％，20％和40％）3天和6天的Mara desBois草莓中的情况。此外，我们开始去确定能够激活发酵代谢的CO2剂量和暴露时间。为了达到这个目的，确定了呼吸底物的可用性，以及积累的乙醇和乙醛对脂质过氧化和细胞水分胁迫的潜在损害，这是通过分析结合水含量和MDA来完成的。

**2：材料和方法**

**植物材料。** 本研究中使用的有机草莓（F.vesca L. Mara des Bois）是在圣塞瓦斯蒂安·德洛斯·雷耶斯（西班牙马德里）的果园里种植的。 收获第一花序和第二花序的草莓，立即运输到食品科学技术和营养研究所，并选择大小和颜色均一的草莓，将黄酮含量为1 mg / g（鲜重）且收获成熟指数为12（可溶性固形物总量/可调节的酸性比）的草莓分别储存在0°C（±0.5）和相对湿度> 95％的三个密闭容器中，容量为1m3。 在每个容器中存储十五个塑料箱，每个塑料箱包含大约0.5公斤的水果，并暴露于不同的CO2浓度（0％，20％或40％）O2浓度为20%的气体条件下，处理3天和6天后，以刚收获时分析的水果为对照分析草莓。使用气体分析仪测量CO2和O2浓度。在收获时，从每个处理组（0％，20％和40％的CO2处理过的水果）中，选择了45个草莓进行质量分析（pH，可溶性固形物含量，可滴定酸度）和发酵代谢物定量，从每个组中随机取出另外45个水果，分成15批草莓的三批，在液氮中冷冻，并保存在-80°C进行进一步分析。 每个批次的15个草莓作为生物学复制品，并且从三个生物学复制品的每一个中进行了两种不同的测量。

**通过定量RT-PCR评估相对基因表达。**根据Yu et al。，24的方法从草莓样品中提取RNA（用0、20和40％CO2处理0或3天的草莓样品）。 用基于CTBA的提取缓冲液从0.4 g的每个样品中提取总RNA三次，每次3次。通过琼脂糖凝胶电泳和光谱法（评估总RNA的质量和纯度，然后用DNase处理，以去除任何基因组的DNA，然后从每个样品的1μg中合成cDNA。 使用iScript TM逆转录Supermix用于RT-qPCR（Bio-Rad），RT-PCR扩增在96孔板iCycler iQthermal循环仪（Bio®Rad）中进行，并使用iCycler iQTM相关软件（RealTime Detection System Software，版本2.0）进行定量，至少两次独立运行中评估每个基因，使用Primer3软件，使用NCBI数据库和可用文献中的序列（尤其是参考文献21和25）来设计以下基因特异性引物。RT-qPCR中用于丙酮酸脱羧酶（XM\_004302484）的引物对是FvPDC\_F，GTTGCTTGAGTGGGGGTCTC和FvPDC\_R，ATCTGTGAATGCGAATGAAGG; 乙醇脱氢酶（XM\_004290520）为FvADH\_QFw2，GCCCTTCTATACTGTGTCCTC和FvADH\_QRv2，ACTGTT·CTGGCTGACTGGTT。

使用定量RT-PCR（RT-qPCR）测定所有研究基因的相对表达。 为了计算反应效率（最佳范围90-110％）并确定最合适的模板浓度，扩增了从总RNA连续稀释液中合成的cDNA（介于40到2.5 ng之间）。通过绘制循环阈值（Ct）值（y轴）相对于总RNA的对数（x轴）来确定标准曲线和线性方程。基于原始荧光数据（ΔRn）作为输出文件导出并随后导入LinReg PCR程序，计算每个单独运行的效率。通过分析解离曲线，在琼脂糖凝胶上评估和测序（CIB·CSIC基因组部）来验证产品的特异性。F.vesca（XM\_004307470）的actin-97样管家基因不受低温或高CO2水平的调节（数据未显示），因此，它被用作内部参考基因来标准化转录谱（根据2-ΔΔCt方法并相对于校准样品（收获时的果实））。用引物FvActin\_Fw，GGGTTTGCTGGAGATGATG和FvActin\_Rv，CACGATTGG.CCTTGGGATTC扩增肌动蛋白97样。 同样，通过分析琼脂糖凝胶中的解离曲线并通过测序验证了产品的特异性，对于每种处理和样品，评估三个平行实验，每个平行有三个对照。

**乙醇和乙醛含量。**在每个存储期，从三个无花萼的15份草莓的汁液的液面上空分析乙醇和乙醛。 将等分（5毫升）果汁转移到10毫升小瓶中，用卷边盖和TFE /硅胶隔片密封，并在-80°C冷冻，根据Valencia-Chamorro等人的方法，使用气相色谱法（Thermo Trace，Thermo Fisher Scientific）测量乙醇和乙醛，该设置包括自动进样器（HS 2000型），火焰检测器（FID）和1.2 m×0.32 cm（id）的Poropack QS80 / 100色谱柱，进样器温度设置为175°C，色谱柱温度为150°C， 检测器温度为200°C，载气为28 mL / min。从预先在20°C水浴中平衡过的小瓶中取出1 mL顶空样品，然后在40°C下放置15 min，然后将其注入GC中。 通过将保留时间与标准品进行比较，鉴定出乙醇和乙醛，结果以每100 mL果汁中的毫克数表示。

**测定水的含量。** 根据Goñi等人的程序，在配有液氮冷却附件的差示扫描量热仪上测定水馏分的含量。基于熔融热的方法 计算结合水含量，而总水含量是在105°C干燥后获得稳定重量后确定的。

**丙二醛的色谱测定。** 通过高效液相色谱法使用2,4-二硝基苯肼（DNPH）进行衍生化，并遵循Mateos等人先前描述的方法，在色谱条件下稍加修改，即可测定MDA含量。 将约1 g的冷冻水果样品在10 mL超纯水中匀浆，并在30000 g下离心20分钟； 通过0.45μm孔径的膜过滤后，收集上清液以量化MDA。

将样品的等分试样（250μL）放入1.5 mLEppendorf中，并通过在60°C水浴中温育30分钟，将该混合物加入50μL6 M NaOH以实现碱性水解蛋白结合的MDA。然后用125μL的35％（v / v）高氯酸沉淀蛋白质，并将混合物以2800g离心10分钟。 将250μL上清液等分试样转移至另一个Eppendorf小瓶中，并与25μLDNPH混合，制成5 mM的2 M盐酸溶液，最后，将该反应混合物在室温避光保存20分钟。将等份的50μL此反应混合物注入带有Nucleosil 100 RP-18色谱柱（4.0mm×125 mm，5μm粒径，安捷伦）的Agilent 1100 HPLC-DAD上，然后加Lichrospherguard色谱柱（4.0 mm×4.0 mm） ）。用去离子水中的0.2％（v / v）乙酸和乙腈（75:25 v / v）的混合物等度洗脱样品，在室温下以0.7 mL / min的流速施加40分钟，在310 nm处获得色谱图。1,1,3,3-四乙氧基丙烷在1％硫酸中的酸水解制备标准MDA，像实验样品一样，将标准液在60°C下用6 M NaOH处理30分钟，然后用35％的高氯酸沉淀蛋白质并用DNPH衍生化。 浓度以每克鲜重的nmol表示。

**蔗糖和苹果酸含量的测定。** 蔗糖和苹果酸是根据Blanch等人的方法使用万通Advanced compac离子色谱仪（867 IC Metrohm）进行测定的。蔗糖通过HPAEC-PAD和Metrosep Carb 1-250IC色谱柱（4.6 mm×250 mm）测定，苹果酸通过HPAEC和配备有Metrosep有机酸色谱柱的IC-819电导检测器（7.8 mm×100mm）测定。通过保留时间鉴定蔗糖和苹果酸，并根据源自标准的校准曲线进行定量； 它们的含量以毫克/克样品的鲜重表示。数据代表进行两次不同测量的三个重复实验的平均值。

**总可溶性固形物和可滴定酸的测定。** 使用数字折光仪（Atago PR-101，Atago，Japan）测定总可溶性固体，以百分比表示。 通过用0.1N NaOH滴定至pH 8.1（Mettler DL-70，Mettler-Toledo，西班牙）来分析可滴定的酸度。

**统计分析。** 使用SPSS v.19.0执行方差分析（ANOVA）。 使用Tukey检验对方法进行多重比较，显着性水平设置为P <0.05。 分析了CO2处理和储存时间以及处理×时间相互作用的主要影响。

**3结果和讨论：**

1. **CO2对PDC和ADH转录及有害代谢产物的影响。**

为了更好地了解低温和高CO2水平对发酵代谢的影响，我们通过RT-qPCR分析了在20％O2，0、20或40％CO2储存3天和6天的草莓中PDC和ADH编码基因的表达。 （图1）我们分析了编码Fvpdcisoform 2-like（XP\_004302532）的基因的表达，该基因是F中的PDC异构体。 vesca与草莓（Fragaria×ananassa）的Fapdc1（AF333772）同源性最高，已证明是受胁迫条件诱导的。同样地，我们研究了编码的拟南芥ADH同工型XP\_004290568的基因表达，该基因与草莓属（Fragaria×ananassa，P17648）的ADH具有最高同源性，涉及耐寒性。PDC的表达在收获时已经很高，但是在0°C下不添加CO2的存储会诱导其转录物的逐步积累。 3天后，PDC表达增加了40％，而这种增加在6天后达到了77％。然而，在暴露于20％和40％CO2的水果中，PDC的表达与收获时的相似，这表明高CO2水平的施加阻止了低温诱导的PDC转录的增加。这些结果与Ponze-Valadezet等人的发现一致，他们发现在2°C储存的头几天，CO2抑制了Jewelstrawberries中PDC的表达。 即使在60％CO2的气氛下放置7天，也未检测到Chandler草莓中PDCmRNA水平的影响。低温更剧烈地诱导其转录。在不添加CO 2的3天和6天后，ADH的表达分别比收获时的水果高8.5倍和23倍。在暴露于20％CO2的水果中，这种增加更为温和，而当暴露于40％CO2的水果中，这种增加甚至更不明显。在几种植物中已经报道了低温下ADH mRNA的积累。同样在Jewelstrawberry中，在低温下储存第二天后，收获时低的ADH表达增加，尽管没有显示出乙醇的积累。考虑到目前的工作中所有样品O2条件均为20％），我们的结果表明，除O2以外的其他因素都影响PDC和ADH基因的表达。在未添加CO2的条件下，草莓中PDC和ADH转录物的明显积累表明低温参与了两个基因的诱导。

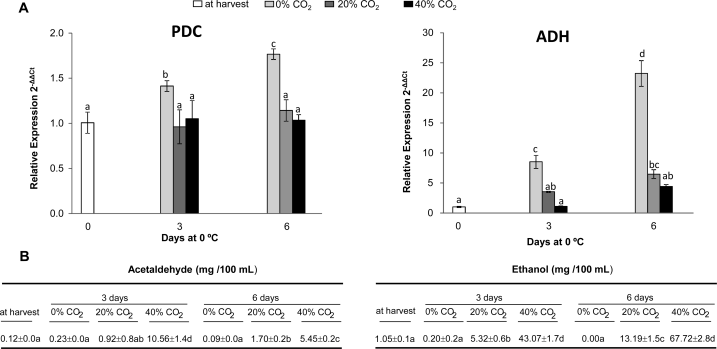


图1.两个直方图（A）表示提供基因的相对表达，而两个表（B）显示提供的代谢产物水平。 直方图反映了收获后（第0天）以及在0°C下在0°C下不同浓度的CO2（0、20， 或40％），保持恒定的O2浓度（20％）。 通过定量RT-PCR测量转录物，并相对于用作参考基因的那些肌动蛋白-97样进行标准化。 使用公式2-ΔΔCt相对于校准品样品（第0天）计算结果，该值代表三个重复样本的平均值±SE（n = 6）。 下表显示了在上述相同条件下乙醛和乙醇（mg / 100 mL）的变化。 每个字母表示由Tukey检验确定的均值之间的显着差异（P <0.05）。

在未添加CO2的草莓中发现最低的乙醇值（图1B），并且6天后甚至未检测到乙醇。相比之下，暴露于CO2后检测到乙醇含量显着增加，而在20％CO2中3天后测得乙醇含量增加了4倍，而在40％CO2中增加了41倍。当水果暴露于CO2 6天时，乙醇的增加更为明显，而未暴露于CO2的水果中却没有发现这种增加。在乙醛的情况下，用40％CO2处理的水果中也发现了最高水平。 此外，在40％CO2暴露3天后，水果中乙醛的增加高于乙醇中观察到的。同样在使用50％CO2和21％保氧量处理过的Chandler草莓中，乙醛相对于未经处理的果实明显增加，并且其水平高于低氧条件下的水平。在20°C下成熟，CO2浓度升高和正常大气氧浓度下，其他水果中的乙醛和乙醇浓度也逐渐升高。此外，Zhang和Watkins表明，CO2处理过的草莓中的累积代谢产物和ADH转录物是温度依赖性的，在20°C时高于在2°C时。我们的结果表明，在暴露于40％CO2下6天的水果中，乙醇值最高（67.7±2.8 mg / 100 mL）。 尽管积累了乙醇，但乙醇的含量却明显低于其他水果如橙汁中的乙醇，也低于Ben-Aire等人指出的柿子中异味的水平（75 mg / 100mL）。同样在40％CO2处理的水果中，最高的乙醛含量被定量，达到10 mg / 100mL的值。在20％CO2处理的水果中，最大乙醇和乙醛含量比40％CO2处理的水果降低了4到10倍。 此外，这些发酵代谢产物的积累与PDC和ADH的最强表达无关。我们的结果表明，PDC和ADH的表达被低温上调，而高水平的CO2则未修饰（PDC）或弱诱导（ADH）。低温驱动下对PDC和ADH的强烈诱导并没有伴随着向乙醇发酵的转变，因此乙醛和乙醇的含量不会随之增加。尽管高CO2似乎会产生明显的影响，从而避免了这项工作中分析的PDC和ADH基因的特异性诱导，但是水果能够基于乙醇和乙醛的积累来维持活跃的发酵代谢。鉴于在别处描述的ADH转录物和乙醇含量之间的差异，以及此处显示的数据，发酵代谢产物与PDC和ADH基因表达之间的相关性仍需要进一步研究。因此，应该进行其他实验以确定是否存在高浓度的CO2特异性诱导的PDC或ADH型。

1. **细胞对各种CO2水平的水分胁迫。**

通过DSC测定结合水含量显示出CO2剂量和暴露持续时间之间存在明显差异（图2）。 在新鲜采摘的草莓中，其结合水（2.5 g / g DW）略低于暴露于20％CO2的水果，后者表现出最高的价值。相比之下，在空气中低温保存的水果中结合水含量降低了，尽管比保持在40％CO2中的水果要少，后者在3天后被量化为明显消耗。然后，低束缚水含量再保持恒定3天，达到0.71 g / g DW的值。 在成熟和储存过程中的几种水果中，已经检测到水馏分的变化。我们目前的结果表明，过高的CO2会导致结合水大量转化为游离水含量，从而影响水的可用性。有趣的是，结合水含量的减少与乙醇（R = -0.887）（图2）和乙醛（R = -0.836，数据未显示）水平的增加呈负相关。用40％CO2处理的草莓显示出最高的发酵挥发性值和最低的结合水值。这种良好的相关性似乎表明乙醛和/或乙醇与结合水之间存在竞争，过多的发酵代谢产物会破坏膜结构。Klemm报告说，醇和水在目标膜分子上竞争，特别是在膜表面附近的脂质和蛋白质竞争。乙醇可以优先结合某些目标并置换水，从而导致构象变化。 使用模型膜系统，FTIR光谱证据表明，酒精对膜表面分子具有非立体特异性结合能力，并且这种结合发生在原本会被氢键水占据的位置。我们的结果表明，发酵代谢物可以调节水在水化层中从氢键网络中的迁移，从而减少结合水。乙醇还会通过削弱脂间氢键（包括水）来扰动细胞膜。此外，正如我们先前报道的那样，40％的CO2处理会影响草莓的细胞结构和水势，我们的结果表明过量的酒精可能会触发细胞的水分胁迫。或者，在未添加CO2的情况下储存的水果中缺乏乙醇可能部分地通过与低温储存相关的膜片硬度变化而限制了膜片的柔韧性。因此，20％CO2处理的有益效果20％CO2处理的有益效果可能归因于膜成分相互作用（包括水）的稳定，将水馏分保持在正常参数范围内对于保持膜组件之间相对恒定的距离以及稳定强烈影响生物膜结构的脂质-脂质相互作用似乎很重要。

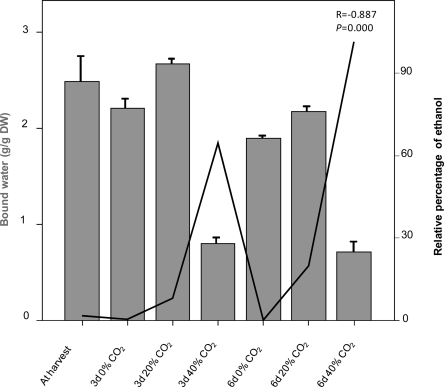


图2.收获后（第0天）和在0°C下于不同CO2浓度（0,20或40％）保存3天后，乙醇和结合水在草莓中的相关性，保持恒定的浓度 O2（20％）。 边界的水含量由阴影条表示，而该线显示了乙醇在最大水平上的相对百分比。 R值和显着性水平显示在该图的右上角。 在结合水和乙醛之间也发现反相关（R = -0.836； P = 0.000）（数据未显示）。

1. **细胞对各种CO2水平下氧化性损伤的响应**

使用HPLC-UV检测作为DNPH衍生物，通过测量MDA定量氧化损伤。 图3显示了用于MDA测定后处理的草莓纯合产物在310 nm处的HPLC色谱图，表明MDA的derivative衍生物，通过在处理前用标准MDA加标样品来确认。获得了良好的色谱峰分离度，没有干扰峰，这可以直接确定MDA衍生物。用这种精确而灵敏的方法，可以明显看出低温和高CO2浓度对脂质过氧化的影响（图3）.3天后，相对于新鲜收获的水果，未添加CO2的果实中MDA含量升高，然后下降，表明自由基诱导 低温存储的初始阶段涉及损坏。当草莓用20％CO2处理3天时，MDA水平升高，但比未添加CO2的草莓降低，然后再保持3天不变。在用40％CO2处理的水果中，检测到的MDA含量高于未添加CO2的草莓，主要是经过6天的处理。

膜磷脂，尤其是多不饱和脂肪酸，易与自由基反应。 水果组织中MDA的显着增加表明脂质过氧化作用增强。脂质过氧化可能是多种环境因素导致的，包括冷却温度。我们的数据表明20％的CO2减少了由严峻的低温引起的氧化应激，支持了先前观察到的鲜食葡萄串的多个组织显着增加的低温存储反应。鉴于40％CO2处理的水果中MDA含量较高，我们认为脂质氢过氧化物的分解可能通过乙醛和/或乙醇的潜在毒性水平的积累而增强，而乙醛和/或乙醇的潜在毒性水平不成比例地影响了该氢键水网络中水分子的置换，从而 破坏膜结构上述膜稳定性的变化与过量的发酵代谢物相关，也可能加速由MDA水平增加所确定的氧化损伤。

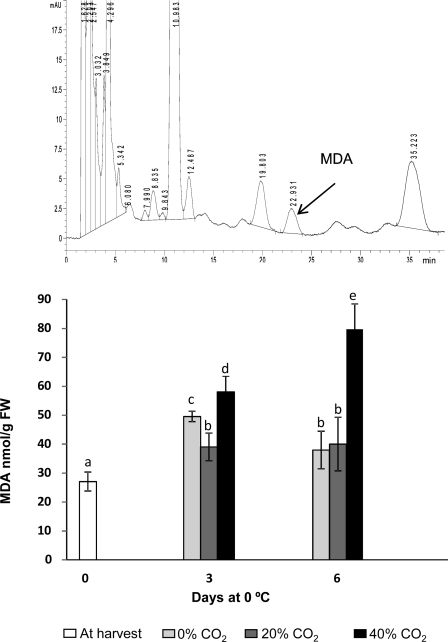


图3.收获后（第0天）和0°C下在0°C下于不同CO2浓度（0、20或20°C下储存3天）中的MDA峰的色谱图，指示了马拉草莓中MDA含量的变化。 40％），保持恒定的O2浓度（20％）。 每个字母都表示图基检验确定的均值之间存在显着差异（P <0.05）。

1. **蔗糖，苹果酸，总可溶性固形物，pH和可滴定酸度随各种CO2水平的变化。**

收获时，经CO2处理的水果中蔗糖保持稳态水平，这是碳水化合物储备的主要成分（表1）。相比之下，在0°C下储存3天和6天后，没有额外的CO2（0％）储存的水果中的蔗糖减少。这些结果表明，在不添加CO2的情况下，果实会耗尽其能量储备，导致储存6天后蔗糖减少，可溶性固形物总量降低。相反，与未添加CO2的低温储存的果实相比，暴露于CO2的果实具有的能量储备和蔗糖含量更高。乙醇合成通常被认为是再生NAD +的手段，以维持糖酵解能量的产生。此外，由于乙醇合成不伴随H +的产生，因此与H +消耗的pH调节器机理相一致，CO2处理的果实中乙醇合成的激活可能起重要作用，因此，这可能是限制细胞质酸化的一种方法 。尽管在这项研究中未进行细胞质pH值测定，但水果提取物的pH值表明，CO2含量过高（40％）的水果表现出最高的pH值和最低的可滴定酸度（表1）。在高CO2气氛下储存的水果中，增加草莓组织的pH值和降低可滴定酸度的现象更为明显。苹果酸含量参与细胞质pH的调节，响应实验处理，内源性苹果酸水平的变化有望引起细胞质pH值的变化。在暴露于20％CO2 3天的水果中发现苹果酸的最低值（表1）。 用20％CO2处理3天的果实中苹果酸的减少可能会阻止细胞质pH的下降，因此，根据上述假设，可能不需要提供高水平的蛋白质。已经提出苹果酸在低氧植物组织中细胞质pH的调节中的重要作用。但是，当暴露于CO2处理的强度更大并持续更长的时间时，这种模式发生了变化。 对于在0°C下未添加CO2储存的水果而言，发酵基因的上调同时限制了乙醇的形成，这意味着乙醇发酵的潜在能力不足。乙醇发酵不仅被认为是在低氧浓度下提供能量的主要因素，而且在大气氧存在下还具有其他重要功能。

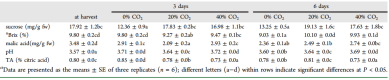


表1.采收后以及3天和6天后，由Fragariavesca Mara des Bois草莓测定的HPAEC和质量参数（总固形物（°Brix），pH和可滴定酸度（TA））中蔗糖和苹果酸含量的变化 在0°C下以不同的CO2浓度（0％，20％或40％CO2）存储，保持恒定的O2浓度（20％）

我们的结果表明，在无限制的氧气条件下暴露于高CO2之后，水果中发酵代谢的激活以及相关的乙醇和乙醛的产生可能代表了能量产生的基本补充代谢途径。暴露于20％CO2的草莓中有利的发酵代谢，且发酵代谢物水平显着增加，应促进消耗还原能力和H +。此外，根据在这些处理过的水果中被量化的苹果酸的减少，似乎可以通过激活苹果酸脱羧来增强NADH在20％CO2处理过的水果中的再氧化。 已经报道了用20％CO 2处理的水果刺激NADP-ME活性。因此，已经将发酵代谢的活化描述为水果对胁迫条件的适应性反应。因此，可调节的乙醇和乙醛水平的调节被允许在水果的草莓组织中积累，这似乎是赋予高CO2水平耐受性的极其重要的保护机制，从而减少了对极低温的损害。

我们的数据表明，在低温下未添加CO2的草莓中PDC和ADH基因的表达大大超过了发酵代谢产物的速率。此外，随着CO2的增加，PDC和ADH的转录水平逐渐降低表明，发酵基因的诱导与低温贮藏相关。我们的结果表明，用20％的CO2处理草莓会显着增加发酵代谢产物的水平，从而激活发酵代谢。此外，良好的发酵代谢与苹果酸脱羧活化的结合可能是一种保护机制。暴露于40％的CO2时，由于果实中发酵代谢产物的过度积累，排他性提供性新陈代谢引起了损害，急性MDA产生见证了氧化应激的升高。此外，过量的乙醇和乙醛积累会潜在地加速膜完整性的丧失，从而引起类似于细胞水分胁迫的结合水部分的丧失。因此，水果中乙醇和乙醛水平的受控调节与苹果酸脱羧的活化可能部分解释了复杂的过程，例如低温和有益的高CO2浓度之间的交叉耐受性。

这项研究表明，在无氧条件下，0°C下草莓中ADC和PDC的上调，而发酵产物未积累。此外，低温下的存储与氧化应激有关，过高的CO2（40％）加剧了氧化，并受有益的高CO2（20％）的控制。此外，发酵产品的积累与结合水状态的显着变化相关，而没有游离的水的影响。