**短期N2处理对枇杷果实冷藏品质及抗氧化能力的影响**

摘要

**背景：**枇杷果实在采后过程中容易受到微生物的腐蚀和品质下降。在本研究中，为了寻找一种有效的方法来替代目前用于质量维持的方法，我们研究了短期贮藏前处理对枇杷果实质量和抗氧化能力的影响。

**结果：**枇杷果实在20℃下暴露于100%N2中6h，然后在5℃下贮藏35d。短期N2处理显著延缓了果实腐烂速率的增加，降低了果实的可溶性固形物和可滴定酸含量，从而保持了较好的食用品质，延长了果实的贮藏寿命。显著延缓了膜透性、丙二醛含量和超氧阴离子产生速率的增加。此外，N2处理果实的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性显著高于对照果实，而脂氧合酶活性显著低于对照果实。

**结论：**短期贮藏前N2处理有效地减少了枇杷果实冷藏过程中的腐烂，保持了果实的品质。果实腐烂和品质劣变的减轻与抗氧化能力的提高和脂质过氧化程度的降低有关。

前言：

枇杷是一种原产于中国的常青树。枇杷成熟的果实呈球形或椭圆形，橙色/黄色或白色，果肉柔软多汁。它们因其温和、亚酸、甜味和营养价值而受到世界各地消费者的高度青睐。枇杷果实在炎热多雨的气候下在初夏成熟。果实采收后易受微生物腐烂和品质恶化的影响，其特征是可溶性固形物和可滴定总酸度迅速下降，将采后寿命限制在1-5℃下约10天或30天。虽然已证明各种方法如气调包装、低温调质和施用多胺、水杨酸、茉莉酸甲酯或1-甲基环丙烯等方法可以减少果实腐烂和品质劣变，但仍有必要开发更有效的技术。

超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)等活性氧自由基(ROS)参与了植物的脂质过氧化、膜损伤和衰老。此外，ROS反应在果实衰老过程中起重要作用。ROS的代谢依赖于几种功能相关的抗氧化酶，如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)。超氧化物歧化酶(SOD)被认为通过催化O2·−歧化为H2O2而在抗氧化防御中起关键作用，而CAT和POD则破坏H2O2脂氧合酶(Lpoxygenase，LOX)催化多不饱和脂肪酸的过氧化，被认为是导致植物组织衰老相关膜损伤的主要因素。猕猴桃采后LOX活性增加，这表明LOX也参与了果实的衰老。虽然人们对植物衰老过程中氧化剂和抗氧化活性的产生和调节进行了大量的研究，但2短期N2处理对果实衰老的影响和作用方式还没有很好地阐明。

据报道，短期N2处理可以延缓香蕉果实的成熟，抑制采收荔枝和鲜切马蹄的褐变，减缓番茄果实的腐烂发育，缓解冷藏鳄梨果实的冷害，从而保持这些采收果蔬的品质和延长货架期。最近，Liu等人报告说，短期的N2贮藏前处理可保持组织能量水平和膜完整性，并有效抑制收获荔枝果实果皮组织的褐变。这一结果提示膜脂过氧化程度的降低可能参与了N2短期处理效果的发挥。然而，短期N2处理对枇杷果实采后抗氧化能力和品质的影响尚未见报道。本研究旨在探讨短期N2处理是否能诱导酶促抗氧化系统的活性，从而维持枇杷果实的冷藏品质。

材料与方法

植物材料和处理

枇杷(Eriobotrya japonica Lindl大红袍）果实在浙江某果园成熟期手工采收，2h内运至实验室。选择大小和颜色均匀且没有视觉缺陷的水果，然后随机分成两组，每组180个水果。两组水果均放置在32L罐子中进行处理。初步研究发现，100%氮气处理6h对枇杷果实保鲜效果最好，因此本试验采用此处理时间。将广口瓶放置在20℃下，以100mLmin−1的流速用空气(对照)或100%N2冲洗6h。空气和N2都通过水中的鼓泡被增湿到大约90%的相对湿度(RH)。在处理之后，打开瓶子，并将两组水果在5℃和大约95%RH下储存长达35天。每个处理有三个重复，实验进行了两次。在贮藏初期和贮藏期间间隔7d采集30个果实样品，测定其可溶性固形物(TSS)、可滴定酸度(TA)、腐烂率、膜透性、丙二醛(MDA)含量、超氧阴离子含量以及SOD、LOX和CAT活性。

品质参数的测定与果实腐烂

每个重复的15个水果的果肉组织在研磨机中均质，用芝士布包裹，然后用手压榨。对得到的果汁进行了TSS和TA的分析。使用袖珍折射仪(PAL-1，日本东京)在20℃下测定TS含量。用0.1molL−1NaOH滴定20mL果汁至pH8.1，以%苹果酸表示。在实验过程中，对果实腐烂的严重程度进行了目视评估。任何有明显腐烂症状的水果都被认为是腐烂的。腐烂率(%)定义为(腐烂果实/总果实)×100。

超氧阴离子产生速率、膜透性和丙二醛含量的测定

通过Chaitanya和Naithani的方法测量了超氧阴离子的生成速率。在5 mL含1 mmol L-1二乙基二硫代氨基甲酸酯的50 mmol L-1磷酸钠缓冲液（pH 7.8）中均质约1 g肉组织，以抑制SOD活性。在10 500×g下离心20分钟后，通过还原硝基蓝四唑（NBT）的能力测量上清液中的超氧阴离子（O2-.）。总体积为3 mL的测定混合物包含100 mmol L-1磷酸钠缓冲液（pH 7.8），其中含有1 mmol L-1二乙基硫代氨基甲酸酯，0.3 mL 0.25 mmol L-1NBT和上清液。在Bausch and Lomb Spectronic-20分光光度计中在540nm下测量最终产物的吸光度。O2-.的形成率表示为ΔA540min-1mg-1蛋白。通过江和陈的方法测定膜渗透率，表示为相对电解质泄漏率。从十个水果的赤道区域（每个水果两个圆盘，相对区域的两个圆盘）中冲洗二十个圆盘（2-3毫米厚，直径10毫米），并在25 mL蒸馏水中孵育1小时，并使用电导率仪（HI 9932，意大利Villafranca Padovana）。然后将圆盘煮沸30分钟，冷却至室温，并记录最终的电导率。用Heath和Packer21方法测定by样品中脂质过氧化产物的水平，并表示为MDA含量。用研钵和研棒将约1 g的肉组织在100 g L-1三氯乙酸（TCA）中的2.5 g L-12硫代巴比妥酸（TBA）中研磨。在95°C加热15分钟后，将混合物在冰浴中迅速冷却，并以10000×g离心10分钟。在532nm处读取上清液的吸光度，并通过减去600nm处的吸光度来校正非特异性浊度。空白由100 mL L-1TCA中的2 mL 2.5 g L-1TBA组成。因此，使用155 L mmol-1cm-1的消光系数，以MDA含量对植物中脂质过氧化物和氧化修饰蛋白的浓度进行了定量，并表示为µmol g-1鲜重（FW）。

SOD，CAT和LOX活性的测量

为了进行SOD活性测量，将1 g果肉组织在10 mL的含50 g L-1聚乙烯基聚吡咯烷酮（PVPP）的50 mmol L-1磷酸盐缓冲液（pH 7.8）中研磨，温度为4℃，然后以15 000×g离心15分钟。上清液用作SOD提取物。通过Crosti等人的方法测定了SOD的活性22。SOD活性的一个单位定义为在测定条件下抑制50％的6-羟基多巴胺（6-OHDA）自氧化作用。通过Candan和Tarhan的方法测定CAT活性。在4℃下，在25 mL的50 mmol L-1磷酸盐缓冲液（pH 7.8）中研磨的2.5克肉组织中提取CAT，然后在15 000×g下于4℃离心15分钟。上清液用于确定CAT活性。在包含50 mmol L-1磷酸盐缓冲液（pH 7），10 mmol L-1H2O2和上清液的反应混合物中测定CAT活性。CAT活性的一个单位定义为在25℃分解1 µmol H2O2min-1的酶的量。 LOX是从4 g的肉组织碎中提取的，在4°C于50 mmol L-1磷酸盐中加入1 mL 50 g L-1PVPP，然后在4°C以15 000×g离心15分钟。根据Axelrodet al.24的方法，将上清液用于测定LOX活性。简而言之，将0.2 mL上清液与2.78 mL 100 mmol L-1乙酸钠缓冲液（pH 5.5）和25 µLo fs o d亚油酸亚油酸酯混合作为底物。该反应在30℃下进行，并记录了在234 nm处的吸光度。 LOX活性的一个单位定义为1分钟内234 nm处的吸光度变化为0.01引起的酶法数量。

使用牛血清白蛋白作为标准，通过Bradford25方法估算所有酶提取物中的蛋白质含量。

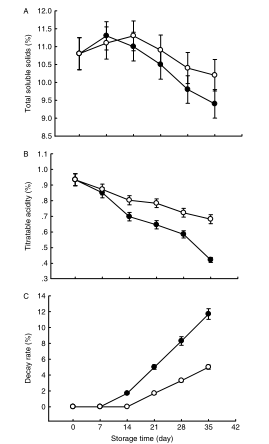
数据分析

使用完全随机的设计进行实验。所有统计分析均使用SPSS（美国伊利诺伊州芝加哥的SPSS Inc.）进行。对数据进行单向方差分析（ANOVA）。通过Duncan的多范围测试进行平均分离。 P <0.05的差异被认为是显著的。

结果和讨论

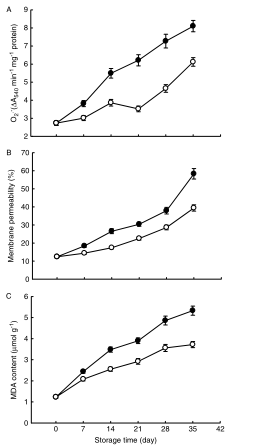
短期施氮对果实品质和腐烂的影响

TSS，TA和果实腐烂率是枇杷果实的重要品质属性。果实中的TSS含量在开始的7天中显示出少量增加，然后在保鲜机中下降。与对照果实相比，短期N2处理显着抑制了TSS含量的下降（图1A）。整个贮藏期间，果实中的TA含量持续下降，但是将果实暴露于N2中6h导致其TA含量的下降幅度显着降低（图1B）。因此，短期N2处理通过保持较高水平的TSS和TA来保持更好的水果味道，这可能是由于香蕉果实的呼吸作用和乙烯产量降低所致。对照果实在5℃下保存14天后显示出腐烂发生率，此后腐烂率随保存时间的增加而迅速增加（图1C）。短期N2处理显着延迟了果实腐烂率。 贮藏35天后，经N2处理的果实的腐烂率比对照果实低57.3％。短期的N2处理也被证明可以降低番茄和荔枝果实的腐烂率。然而，N2处理对疾病的作用方式仍不清楚，需要进一步研究。

图1.短期N2处理对果实在5℃下储存35天的过程中（A）总可溶性固形物，（B）可滴定酸度和（C）fruit果实腐烂率的影响。●：对照组， ○：经过N2处理组。

短期N2处理对超氧阴离子产生速率，膜通透性和MDA含量的影响

短期氮处理对lo果实超氧阴离子生成速率的影响如图2A所示。超氧阴离子的产生速率随储存时间的延长而增加。在整个贮藏过程中，对照果实中的超氧阴离子生成速率明显高于短期N2处理的果实。膜的渗透性也随存储时间的增加而增加，表明膜系统变得更容易泄漏（图2B）。与对照果实相比，短期的N2处理显着抑制了膜通透性的增加。在整个存储期的35天中，对照水果的MDA含量从初始值1.23 µmol g-1FW增加到5.33 µmol g-1FW，而短期N2处理的水果的MDA含量从3.75 µmol g-1FW升高（图2C），表明短期N2处理显着抑制了膜脂的过氧化。 此处发现的膜通透性和MDA含量的变化提供了枇杷果实贮藏过程中膜变质的证据。当ROS的含量超过组织的清除能力时，通常会发生脂质过氧化，膜损伤以及因此而衰老，这导致新鲜水果和蔬菜的贮藏质量和适销性下降。在本研究中，预存储N2处理6 h可显着抑制超氧阴离子生成，膜通透性和MDA含量的增加。这些结果表明，短期N2处理可能会通过延迟超氧阴离子的产生来维持膜的完整性，从而抑制cold贮藏果实的衰老和品质下降。

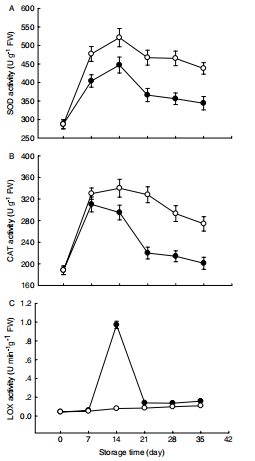
图2.短期N2处理对5果实在5℃贮存35天期间（A）超氧阴离子产生速率，（B）膜通透性和（C）MDA含量的影响。●：对照果实，○：N2处理的水果。

短期N2处理对SOD，CAT和LOX活性的影响

对照和处理过的果实中的SOD活性最初都随着贮藏时间的增加而增加，在第14天达到峰值，然后在其余贮藏期间降低。暴露于短期N2处理的水果在整个贮藏期间均保持明显较高的SOD活性（图3A）。对照和处理后的果实中的CAT活性在储存过程中也开始增加，分别在第7天和第14天达到峰值，然后下降。在短期N2处理的果实和对照果实之间，在储存的前7天中未发现CAT活性的显着差异，但是与之后的对照果实相比，在处理过的果实中观察到了显着更高的CAT活性（图3B）。 CAT活性的最初增强可能是对冷藏或短期N2处理的适应性反应，而在随后的存储阶段中H2O2含量更快的增加可能会导致CAT活性降低。

SOD和CAT是重要的ROS清除酶。 SOD可将超氧化物转化为H2O2，而CAT可将H2O2转化为水。8氧化应激（可能是由于SOD和CAT活性降低以及LOX活性增强）可能有助于枇杷果实的衰老。 Wang等提出，高氧处理延缓桃果实衰老的有效性可能是由于贮藏期间抗氧化酶的减少延迟所致。因此，通过短期的N2处理延迟冷藏的枇杷果实的衰老可能涉及通过增强抗氧化剂防御能力和抑制氧化损伤来减轻脂质过氧化作用。

LOX是真核生物中的一种普遍存在的酶，会导致过氧化的传播。28它被认为是部分形成超氧化物（O2•-）和单线态氧的原因。29因此，LOX被认为是与衰老相关的主要因素。 5如图3C所示，在储存的前14天中，对照果实的LOX活性急剧增加，随后下降，而短期N2处理的果实表现出更加稳定的状态。并且整个存储中LOX活动的增长速度较慢。发现LOX活性增加与胡椒果实和奇异果中脂质过氧化的增强有关。10,30在这项研究中，短期的N2处理显着抑制了LOX活性（图3C）和膜通透性（图2B）的增加。三组结果表明，短期N2处理可能通过抑制LOX活性来维持枇杷果实膜的完整性。

图3.短期N2处理对果实在5℃储存35天期间（A）SOD，（B）CAT和（C）LOX活性的影响：●：对照果实；○：N2处理果实。

结论

研究结果表明，枇杷果实在贮藏前进行纯N2处理6h，能有效地减少果实腐烂，保持口感品质。短期N2处理能减轻冷藏枇杷果实腐烂和品质劣变，与提高抗氧化酶活性和延缓膜脂过氧化有关。作为一种非化学、廉价的采后处理技术，该缺氧处理技术在商业分布条件下值得进一步开发。