

热空气处理对草莓果实品质和抗氧化活性的影响

郑 聪, 王华东, 王慧倩, 王 静, 郑永华*

(南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘 要: 研究热空气处理(45 ℃, 3.5 h)对草莓在20 ℃、4 d贮藏期间果实品质、抗氧化活性及相关基因表达的影响。结果表明, 热空气处理可以显著抑制果实腐烂的发生, 延缓果实硬度、总黄酮、总酚和VC含量的下降, 抑制花青素的积累, 保持较高的DPPH自由基清除能力和还原力。另外, 热处理可显著促进果实中黄酮醇合酶、查耳酮合酶和苯丙氨酸解氨酶基因的表达, 而抑制 β -木糖苷酶和花青素合酶基因的表达。这些结果表明, 热空气处理可以通过调控相关基因的表达, 较好地保持果实的品质和抗氧化活性。

关键词: 草莓; 热空气; 品质; 抗氧化活性; 基因表达

Effect of Hot-Air Treatment on Quality and Antioxidant Activity of Strawberry Fruit

ZHENG Cong, WANG Hua-dong, WANG Hui-qian, WANG Jing, ZHENG Yong-hua*

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The effects of hot-air treatment (45 ℃ for 3.5 h) on fruit decay and antioxidant activity as well as the expression of antioxidant enzymes-related genes in strawberry fruit during storage at 20 ℃ for 4 d were investigated. The results indicated that the hot-air treatment significantly reduced fruit decay incidence, delayed the decreases in fruit firmness and the contents of total phenolics, total flavonoids and vitamin C, retarded the accumulation of anthocyanin, and maintained higher diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity and reducing power. Meanwhile, the expression of genes encoding flavonol synthase, chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase were enhanced whereas the gene expression levels of β -xylosidase and anthocyanidin synthase were reduced by this hot air treatment. These results demonstrate that hot-air treatment can maintain fruit quality and antioxidant activity by regulating the expression of quality-related genes.

Key words: strawberry; hot-air treatment; quality; antioxidant activity; gene expression

中图分类号: TS255.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)12-0223-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201412046

草莓果实柔软多汁、酸甜可口, 同时富含花青素等多种活性成分, 营养丰富, 深受消费者的喜爱^[1]。然而草莓果实含水量高、组织娇嫩, 采后呼吸代谢旺盛, 果实易发生软化、失水萎蔫和腐烂霉变, 因而难以贮运, 常温条件下放置1~2 d感官品质就会发生明显的劣变^[2-3], 严重制约了草莓产业的发展。因此, 如何延长草莓果实的贮藏期已经成为亟待解决的问题。目前, 国内较多采用化学方法保鲜果蔬, 该法虽然效果显著, 但也带来潜在的环境污染健康危害问题, 因此果蔬的化学保鲜受到了越来越多的质疑和限制。

热处理作为一种安全、有效的果蔬保鲜方法, 不仅能有效抑制由微生物引起的果实腐败^[4], 还能起到延缓果实衰老和延长货架期的作用^[5]。已有研究表明, 热空气处理能显著降低草莓果实贮藏期间的呼吸强度, 维持较高的总酸水平^[6], 同时能有效延缓果实的软化, 抑制贮藏后期果实腐烂指数上升^[7]。但热空气处理对草莓果实活性成

分和抗氧化活性影响及其与相关基因表达的关系尚未见报道。本课题组前期通过响应面法优化试验, 发现45 ℃热空气处理3.5 h对抑制草莓果实采后腐烂的效果最佳。在本实验中将进一步研究热空气处理条件对草莓果实品质、活性成分、抗氧化活性及相关基因表达的影响, 以期从分子水平探讨热处理对延缓草莓果实衰老和调控营养品质的可能机理, 为热处理在草莓果实采后保鲜中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

实验所用草莓品种为红艳(*Fragaria* × *ananassa* Duch. cv. Hongyan), 选择大小、成熟度基本相同、果形端正、无病虫害、无机械伤害的果实。

收稿日期: 2013-12-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31172003); 公益性行业(农业)科研专项(201303073)

作者简介: 郑聪(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为农产品加工与贮藏。E-mail: 2011108058@njau.edu.cn

*通信作者: 郑永华(1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为农产品贮藏加工。E-mail: zhengyh@njau.edu.cn

无水乙醇、乙酸乙酯、三氯化铁（均为分析纯），甲醇（色谱纯） 国药集团化学试剂有限公司；铁氰化钾、无水氯化锂 西陇化工股份有限公司；1,1-二苯基-2-三硝基苯肼（1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH）、Follin试剂 美国Sigma公司；Tris、焦碳酸二乙酯（diethyl pyrocarbonate, DEPC）、亚精胺 北京索莱宝科技有限公司；十六烷基三甲基溴化铵（hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB） 美国Biosharp公司。

GL-20G-H型冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂；UV-1600型紫外-可见分光光度计 上海美普达仪器有限公司；TA-XT2i质构仪 英国Stable Micro System公司；伯乐PCR扩增仪 上海天呈科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 草莓的处理

经过前期响应面试验，得出热空气处理增强草莓抗病性的最佳条件为：45℃，3.5 h。将草莓随机分为2组进行以下处理：1）不经过任何处理，20℃恒温放置3.5 h，作为对照（CK）；2）45℃热空气处理3.5 h（HAT）；将各处理组果实用塑料盒（20 cm×12 cm×8 cm）分装，每盒30个果实，塑料盒外套0.01 mm厚聚乙烯保鲜袋保湿。随后将果实置于（20±1）℃，相对湿度90%~95%的恒温箱中贮藏4 d，每天观察果实腐烂情况，同时取样用液氮速冻并于一20℃保存用于测定各项指标。每个处理共150个果实，重复3次。

1.2.2 指标的测定

1.2.2.1 腐烂指数的测定

草莓果实的腐烂指数参照陈学红等^[8]的方法测定。按果实腐烂面积大小划分为4个级别：0级，无腐烂；1级，腐烂面积占果实面积小于25%；2级，腐烂面积占果实面积的25%~50%；3级，大于果实面积50%。按下式计算腐烂指数：

腐烂指数/%=Σ（腐烂级别×该级果实数）/（最高腐烂级别×总果实数）×100

1.2.2.2 硬度的测定

用TA-XT2i质构仪测定果实硬度。探头（SMSP/5）直径5 mm；下压距离5 mm；下压速率1 mm/s。取最大值，每个果实分别测定阴阳面赤道部位，重复10次，取平均值。

1.2.2.3 总酚、总黄酮、花青素和VC含量的测定

总酚含量测定采用Flion-Ciocalte法^[9]，以儿茶酚质量浓度为横坐标，吸光度为纵坐标制作标准曲线。总黄酮含量的测定采用裴咏萍等^[10]的三氯化铝法测定，以显色液中芦丁的质量（mg）做标准曲线。花青素含量的测定采用pH示差法^[11]。VC含量用2,6-二氯靛酚法测定，结果以mg/100 g表示，以鲜质量计。

1.2.2.4 DPPH自由基清除率和总还原力的测定

DPPH自由基清除率参照Larrauri等^[12]的方法来测定，结果以清除百分率来表示。还原力采用Oyaizu^[13]的方法来测定，结果以三氯化铁反应液在700 nm波长处的吸光度来表示。

1.2.2.5 品质相关基因的表达

热空气处理后的草莓果实置于20℃条件下贮藏，处理完后即刻对处理组和对照组果实进行取样，取样时间为：0、3、6、9、12 h。

运用RT-PCR方法研究草莓果实品质相关基因的表达。品质相关基因包括*beta xylosidase*（*FaXyl1*）、*flavonol synthase*（*FLS*）、*anthocyanidin synthase*（*FaANS*）、*chalcone synthase*（*FrCHS*）和*phenylalanine ammonia-lyase 6*（*PAL6*）。草莓果实的总RNA提取参照Jaakola等^[14]的CTAB方法进行提取，同时做了一些修改。液氮中研磨4 g草莓果肉，转移样品至5倍体积65℃水浴中预热的CTAB（含2%巯基乙醇）提取液的离心管中（10 min），期间激烈涡旋，离心取上清。加入等体积的氯仿，离心取上清，重复提取一次，将上清转移至新离心管中，加入1/4体积的10 mol/L LiCl，4℃条件下沉淀过夜。12 000 r/min、4℃离心20 min。沉淀用500 μL SSTE溶液洗，使其充分溶解等体积氯仿抽提2次，取上清，加入2倍体积无水乙醇，混匀后-20℃沉淀30 min（3 h）以上。12 000 r/min、4℃离心20 min，弃上清，干燥，溶于适量DEPC水。待RNA沉淀完全溶解后于一20℃保存。用Thermo Nano Drop 2000分光光度计测定RNA浓度。反转录反应参照两步法RT-PCR程序进行。进行PCR扩增时所用的引物序列如下：*FaXyl1*: sense AGCCTACTTGTGCTGACC, antisense GTTTCCTATCATCGTTTCG; *FLS*: sense TGG AAG- GGAAGAAAGGGTG, antisense GAATGGTGAGGGCGGACA; *FaANS*: sense TTATCAACCACGGCATCT, antisense TCTAATCCCAAGCCAAGT; *FrCHS3*: sense GTCCGTTAAGCGTCTCAT, antisense GGCT-CCGTCACTATCAGG; *PAL6*: sense GTGAAAGAAGCGAAGAAGG, antisense GAAGCTCGGAGCAGT-ATG; 18S rRNA: sense AGCAAGCCTACGCTCTGG, antisense GGTGCCCTTCCGTCAATT。

1.3 数据处理与分析

采用Origin 8.0进行数据处理，SPSS统计软件进行单因素方差分析（One-way ANOVA），用邓肯多重比较方法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 热空气处理对草莓果实腐烂的影响

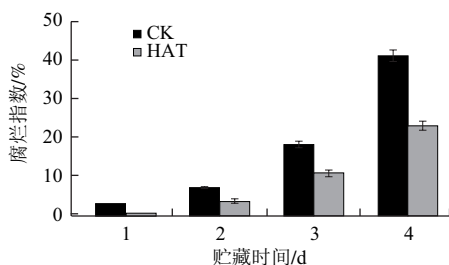


图1 热空气对草莓果实腐烂指数的影响

Fig.1 Effect of hot-air treatment on decay index in strawberry fruit

由图1可知,随着贮藏时间的延长,草莓果实的腐烂指数呈上升趋势,热空气处理能显著抑制草莓果实的腐烂。在贮藏第4天,对照草莓果实腐烂指数达到40.9%,而热处理组仅为23.3%,显著低于对照果实 ($P<0.05$)。

2.2 热空气处理对草莓果实硬度和 β -木糖苷酶 (*FaXylI*) 基因表达的影响

草莓在贮藏期间果实的硬度逐渐下降,导致果实的软化和贮藏性的下降。热处理可延缓草莓果实硬度的下降,在整个贮藏期中热处理果实的硬度显著高于对照果实 ($P<0.05$) (图2)。热空气处理可显著抑制草莓果实中 β -木糖苷酶 (*FaXylI*) 基因的表达,热处理12 h后 *FaXylI* 基因表达水平虽然有所回升,但仍明显低于对照果实 (图3)。这表明热处理能通过抑制 β -木糖苷酶基因的表达,抑制细胞壁中半纤维素的降解,从而保持草莓果实的硬度。

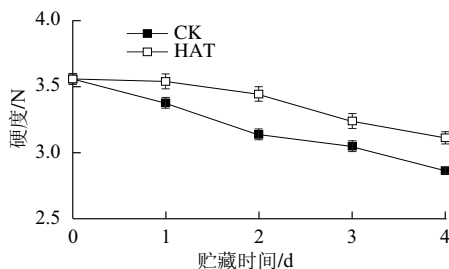


图2 热空气对草莓果实硬度的影响

Fig.2 Effect of hot-air treatment on firmness in strawberry fruit



图3 热空气对草莓果实*FaXylI*基因表达的影响

Fig.3 Effect of hot-air treatment on expression of *FaXylI* gene in strawberry fruit

2.3 热空气处理对草莓果实总黄酮、总酚、VC和花青素含量的影响

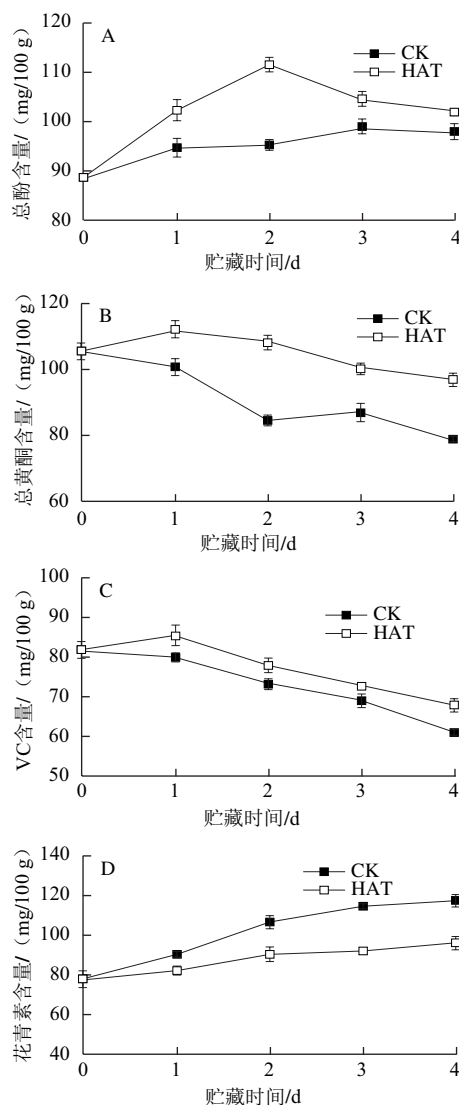


图4 热空气处理对草莓果实总酚(A)、总黄酮(B)、VC(C)和花青素(D)含量的影响

Fig.4 Effect of hot-air treatment on contents of total phenolics (A), total flavonoids (B), VC (C) and anthocyanin (D) in strawberry fruit

由图4可见,草莓果实采后总黄酮和VC含量逐渐下降,而总酚和花青素含量呈缓慢上升趋势。热空气处理可延缓黄酮和VC含量的下降,促进总酚的积累。在整个贮藏期中,热处理果实的总黄酮、总酚和VC的含量都显著高于对照果实 ($P<0.05$),从而维持较高的活性成分含量。但热空气处理显著抑制了草莓果实中花青素的积累 ($P<0.05$),经4 d贮藏后,对照果实的花青素含量达118.3 mg/100 g,显著高于处理果实的104.9 mg/100 g。

2.4 热空气处理对草莓果实酚类等活性成分代谢途径中关键酶基因表达的影响

如图5所示,热空气处理可显著促进草莓果实

中黄酮醇合酶 (flavonol synthase, FLS)、查耳酮合酶 (chalcone synthase, CHS) 和苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 等黄酮类和酚类物质合成关键酶基因的表达, 而抑制花青素合成酶基因 (*FaANS*) 的表达。这与热空气处理能保持较高的总黄酮和总酚含量而抑制花青素在果实中累积的结果 (图 4D) 一致。

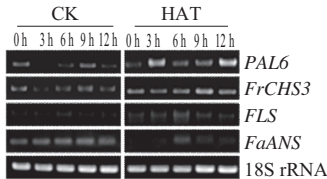


图 5 热空气对草莓果实活性成分合成关键酶基因表达的影响
Fig.5 Effect of hot-air treatment on expression of genes involved in synthesis of bioactive compounds in strawberry fruit

2.5 热空气处理对草莓果实DPPH自由基清除能力和总还原力的影响

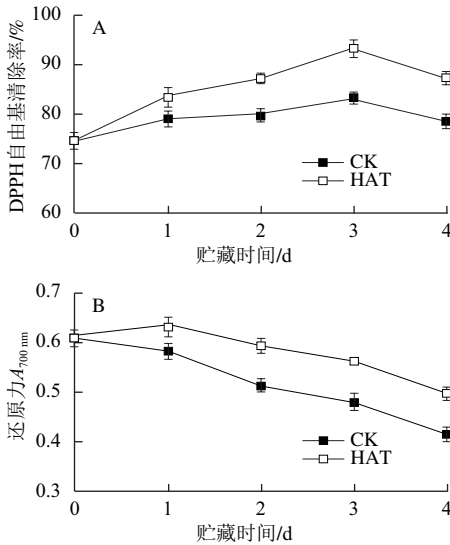


图 6 热空气对草莓果实DPPH自由基清除能力 (A) 和还原力 (B) 的影响

Fig.6 Effect of hot-air treatment on DPPH scavenging activity (A) and reducing activity (B) in strawberry fruit

如图6所示, 草莓果实在贮藏期间DPPH自由基清除力总体呈上升趋势, 而还原力则呈下降趋势。在整个贮藏期间, 热空气处理果实的DPPH自由基清除力和总还原力都显著 ($P<0.05$) 高于对照果实, 这与热空气处理能保持较高的黄酮、多酚和VC等抗氧化物质含量 (图4) 有关。

3 讨论与结论

果实软化是影响草莓果实采后贮藏和货架期的一个

重要因素。草莓果实软化主要是由于细胞壁中的果胶物质和半纤维素降解所致^[15]。木聚糖是果胶物质和半纤维素的重要组分, 它在内切 β -1,4-木糖酶的催化下水解成寡聚木糖, 后者再由 β -木糖苷酶进一步水解产生木糖。研究发现在草莓果实成熟软化过程中, 编码 β -木糖苷酶 (*FaXyl1*) 基因的mRNA大量积累, 并在整个成熟期保持较高的 β -木糖苷酶活性^[16-17]。热处理可以抑制草莓果实 β -木糖苷酶等细胞壁降解酶的活性, 保持较高的果实硬度^[18], 这些结果说明 β -木糖苷酶的作用与草莓果实的软化有密切关系。本实验研究发现热空气处理可显著抑制草莓果实中 β -木糖苷酶 (*FaXyl1*) 基因的表达, 同时延缓果实硬度的下降, 这进一步证实了 β -木糖苷酶在草莓果实的软化中起到重要作用。

草莓中富含VC、黄酮类和酚类等生物活性成分^[19], 这些活性成分有助于提高草莓果实的抗氧化能力^[20], 其中多酚类物质是草莓抗氧化的主要物质基础^[21]。PAL是苯丙烷类代谢途径中的第一关键酶^[22], 与酚类物质的合成密切相关, 而FLS和CHS是黄酮类合成的关键酶, 其活性高低直接决定黄酮类化合物的积累^[23]。在本研究中, 热空气处理可显著促进PAL6、FrCHS3和FLS基因的表达, 同时维持果实中较高的总酚和总黄酮含量。由此可见, 热空气处理可以通过增强黄酮和多酚类合成途径中关键酶基因的表达, 从而提高果实中这些活性成分的含量。花青素合成酶 (anthocyanidin synthase, ANS) 是花青素合成的关键酶, 但花青素不稳定, 在热胁迫下极易降解, 导致花青素积累量的下降^[24-25]。本研究发现, 草莓果实在贮藏过程中, 花青素合成酶基因*FaANS*大量表达, 花青素不断积累, 草莓果实颜色变深, 而热空气处理后的果实中*FaANS*基因的表达水平极低, 同时果实中花青素积累量显著低于对照, 可见热空气处理通过抑制*FaANS*基因的表达, 从而抑制了花青素的合成和积累。在本研究中虽然热处理果实的花青素含量明显低于对照果实, 但由于热处理能保持较高的黄酮、多酚和VC等抗氧化物质含量, 因而使处理果实的抗氧化活性明显高于对照果实。

本实验研究结果表明, 热空气处理可显著抑制草莓果实腐烂的发生, 延缓果实硬度下降, 从而保持果实的食用品质; 热空气处理可通过促进黄酮类和酚类物质合成关键酶基因的表达, 保持较高的总黄酮和总酚含量, 从而提高果实的抗氧化能力和营养价值。

参考文献:

- PURNIMA G, OLENA K, STEPHEN M N, et al. Sensory analysis of individual strawberry fruit and comparison with instrumental analysis[J]. Postharvest Biology and Technology, 2009, 52(2): 164-172.
- FAN Yan, XU Ying, WANG Dongfeng, et al. Effect of alginate coating combined with yeast antagonist on strawberry

- (*Fragaria*×*ananassa*) preservation quality[J]. Postharvest Biology and Technology, 2009, 53(1/2): 84-90.
- [3] 徐放, 张鹏宇, 吴小虎, 等. 不同草莓保鲜方法的比较研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(3): 1237-1239; 1242.
- [4] COUEY H M. Heat treatment for control of postharvest diseases and insect pests of fruits[J]. HortScience, 1989, 24(2): 198-202.
- [5] 孔祥佳, 郑俊峰, 林河通, 等. 热处理对果蔬贮藏品质和采后生理的影响及应用[J]. 包装与食品机械, 2011, 29(3): 34-39.
- [6] 李健, 张萌, 李丽萍, 等. 热处理对草莓品质与活性氧代谢影响的多变量解析[J]. 食品科学, 2013, 34(16): 306-310.
- [7] DOTTO M C, POMBO M A, MARTINEZ G A, et al. Heat treatments and expansin gene expression in strawberry fruit[J]. Scientia Horticulturae, 2011, 130(4): 775-780.
- [8] 陈学红, 郑永华, 杨震峰, 等. 高氧处理对草莓采后腐烂和品质的影响[J]. 农业工程学报, 2004, 20(5): 200-202.
- [9] SLINKARD K S, SINGLETON V L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1977, 28(1): 49-55.
- [10] 裴咏萍, 李维林, 张涵庆. 三氯化铝比色法测定中药中总黄酮含量的方法改进[J]. 现代中药研究与实践, 2009, 23(4): 58-60.
- [11] 刘洪海, 张晓丽, 杜平, 等. pH示差法测定烟73葡萄中花青素含量[J]. 中国调味品, 2009, 34(4): 110-117.
- [12] LARRAURI J A, SANCHEZ M C, SAURA C F. Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1988, 46: 2694-2697.
- [13] OYAIZU M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine[J]. Japanese Journal of Nutrition, 1986, 44: 307-315.
- [14] JAAKOLA L, PIRTTILA A M, HALONEN M, et al. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit[J]. Molecular Biotechnology, 2001, 19(2): 201-203.
- [15] NEAL G E. Changes occurring in the cell walls of strawberry during ripening[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1987, 100: 253-256.
- [16] MARTINEZ G A, CHAVES A R, CIVELLO P M. β -Xylosidase activity and expression of a β -xylosidase gene during strawberry fruit ripening[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2004, 42: 89-96.
- [17] BUSTAMANTE C A, ROSLI H G, ANON M C, et al. Beta-xylosidase in strawberry fruit: isolation of a full-length gene and analysis of its expression and enzymatic activity in cultivars with contrasting firmness[J]. Plant Science, 2006, 171 (4): 497-504.
- [18] VICENTE A R, COSTA M L, MARTINEZ G A, et al. Effect of heat treatments on cell wall degradation and softening in strawberry fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2005, 38(3): 213-222.
- [19] FRANCO V D V, ANNA M T, DANIEL G, et al. Bioactive compounds and antioxidant capacity of camarosa and selva strawberries (*Fragaria* × *ananassa* Duch.)[J]. Foods, 2013, 2: 120-131.
- [20] RICARDO M F, FERREYRA S Z, ALICIA A, et al. Growth and ripening season effects on antioxidant capacity of strawberry cultivar Selva[J]. Scientia Horticulturae, 2007, 112: 27-32.
- [21] 刘文旭, 黄午阳, 曾晓雄, 等. 草莓、黑莓、蓝莓中多酚类物质及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(23): 130-133.
- [22] 姜翠翠, 陈桂信, 潘东明, 等. 油木奈果实苯丙氨酸解氨酶基因的分选与表达分析[J]. 西北植物学报, 2013, 33(3): 0465-0471.
- [23] WANG Yechun, STEVEN C, OLIVER Y. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 91(4): 949-956.
- [24] ZHOU Xingwen, FAN Zhengqi, CHEN Yue, et al. Functional analyses of a flavonol synthase-like gene from *Camellia nitidissima* reveal its roles in flavonoid metabolism during floral pigmentation[J]. Journal of Biosciences, 2008, 38(3): 593-604.
- [25] BOLIVAR A, CEVALLOS C, LUIS C Z. Stability of anthocyan in-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants[J]. Food Chemistry, 2004, 86: 69-77.