

热空气处理对杨梅果实采后活性氧代谢和热激蛋白合成的影响

汪开拓^{1,2}, 郑永华^{1,*}

(1.南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095; 2.重庆三峡学院生物系, 重庆 404100)

摘 要: 研究热空气处理对杨梅果实采后活性氧代谢以及热激蛋白合成的影响。以 48℃ 热空气处理杨梅果实 3h, 随后于(1 ± 1)℃ 贮藏 12d, 并每隔 3d 测定果实腐烂率, 膜脂氧化指标脂氧合酶(LOX)活性, 活性氧代谢相关酶超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性以及超氧阴离子自由基(O₂⁻·)和羟自由基(·OH)生成量, 并同时检测热激蛋白(HSP)合成水平。结果表明, 热处理可显著延缓果实贮藏期间 SOD、CAT 和 APX 活性的下降, 诱导 HSP 的合成, 从而抑制 O₂⁻· 和 ·OH 的积累和 LOX 活性的上升, 减轻了过量活性氧自由基对细胞膜的损害。热空气处理延缓杨梅果实采后衰老并减少腐烂的机制与其平衡活性氧代谢和诱导热激蛋白的合成密切相关。

关键词: 杨梅; 热空气; 活性氧; 热激蛋白; 衰老; 腐烂

Effect of Hot Air Treatment on Active Oxygen Metabolism and Heat-shock Protein Biosynthesis in Chinese Bayberry

WANG Kai-tuo^{1,2}, ZHENG Yong-hua^{1,*}

(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Department of Biology, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404100, China)

Abstract: The effects of hot air treatment on active oxygen metabolism and heat-shock protein (HSP) biosynthesis in harvested Chinese bayberry were investigated in this study. The fruit were pretreated with hot air at 48 °C for 3 h, then stored at (1 ± 1) °C for 12 d. Decay incidence, the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) and lipoxygenases (LOX), and the production of superoxide anion and hydroxyl radicals as well as HSP level were determined at 2-day intervals during storage. Hot air treatment significantly delayed the decrease in the activities of SOD, CAT and APX and induced HSP biosynthesis, resulting in inhibition of the accumulation of superoxide anion and hydroxyl radicals and the increase in LOX activity and alleviation of the oxidative damage to plasma membrane. These results suggest that the mechanism of delaying fruit senescence and inhibiting fruit decay by hot air treatment may be closely associated with maintenance of the balance between active oxygen metabolism and the induction of HSP biosynthesis.

Key words: Chinese bayberry; hot air; active oxygen; heat-shock protein; senescence; decay

中图分类号: TS255.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)08-0291-05

杨梅(*Mycira rubra* Sieb. et Zucc.)为我国特色水果, 果实柔软多汁, 酸甜可口且富含多种抗氧化物质, 故深受广大消费者喜爱。但杨梅果实含水量高、组织娇嫩且无外果皮包裹, 同时成熟与采收期也恰逢江南初夏的高温多雨季节, 果实生理代谢极为旺盛, 采后迅速衰老腐烂^[1]。活性氧衰老理论是近年来被广泛接受的衰

老理论之一: 正常植物体内活性氧产生与消除处于平衡状态, 但逆境环境会破坏植物体内活性氧代谢的平衡, 使其细胞内积累过量的活性氧自由基, 从而导致细胞膜脂过氧化和膜透性上升并攻击细胞器从而加速植物体的衰老^[2]。所以, 抑制杨梅果实采后活性氧自由基的过度累积能有效的延缓其采后衰老进程, 抑制腐烂的发生。贮

收稿日期: 2011-01-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071616)

作者简介: 汪开拓(1983—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为农产品贮藏与加工。E-mail: 2007208016@njau.edu.cn

* 通信作者: 郑永华(1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为果蔬贮运技术。E-mail: zhengyh@njau.edu.cn

前热处理作为一种绿色环保的果蔬保鲜技术,能有效抑制多种果蔬采后活性氧的过度积累和膜脂过氧化。例如,热处理可以平衡葡萄细胞内的活性氧代谢,从而降低了冷藏期间膜脂过氧化程度^[3];热处理同样能够显著提高枇杷过氧化氢酶(catalase, CAT)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性,从而减少活性氧自由基的过度积累,抑制细胞膜相对电导率的上升^[4];45℃、3h热空气处理则显著诱导了草莓果实内抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)和过氧化物酶(peroxidase, POD)活性的上升,从而清除了过量的H₂O₂与O₂⁻·,抑制了氧化伤害和腐烂的发生^[5]。前期研究发现^[6],48℃、3h热空气处理可以有效抑制杨梅果实采后腐烂的发生,但有关热空气处理对杨梅采后活性氧代谢的影响尚未见报道。因此,本研究以48℃的热空气处理杨梅果实3h,分析其对果实采后活性氧代谢相关酶活性以及果实衰老和腐烂的影响,以期从活性氧衰老理论的角度探讨热空气延缓果实衰老和减少腐烂的机制,为热空气处理在杨梅保鲜的应用提供理论依据。此外,最近研究也发现,植物热激蛋白具有分子伴侣(molecular chaperone)功能^[7],其在平衡活性氧代谢的过程中也起着重要作用^[3]。本实验同时分析该热空气处理对杨梅果实热激蛋白合成的影响,以期从热激蛋白作为分子伴侣的角度阐释热处理平衡活性氧代谢的机理。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

供试材料为八分熟的“乌种”杨梅果实(*Myciira rubra* Sieb. et Zucc. Cv. Wumei),采摘于江苏省苏州市西山镇,采收后4h内运回实验室,去除未成熟,病虫害和机械损伤的果实,挑选大小和颜色基本一致的果实,摊开自然风预冷。

核黄素、甲硫氨酸、β-巯基乙醇、5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸盐(BCIP) 国药集团化学试剂有限公司;氮蓝四唑(NBT) 南京基天生物技术有限公司;α-萘胺 上海泗联化工厂;G-250考马斯亮蓝 上海化学试剂公司;双丙烯酰胺、二甲基亚枫 南京赛吉科技有限公司;小麦HSP70多克隆抗体、碱磷酸标记的山羊抗兔IgG 美国Sigma公司;盐酸羟胺、交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)、乙二胺四乙酸(EDTA)、三氯乙酸(TCA)、硫代巴比妥酸(TBA)、抗坏血酸、对氨基苯磺酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、醋酸、醋酸钠、盐酸、丙酮(均为国产分析纯)。

GL-20G-H型冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂;硝酸纤维膜(NC膜) 美国Invitrogen公司;UV-1600型分光光度计 上海美谱达仪器有限公司;DYCZ-24DN垂直板电泳仪、DYCP-40C转印仪 北京市六一仪器

厂;TY-80S脱色摇床 南大南达生物技术开发公司;凝胶成像分析系统 美国伯乐公司。

1.2 材料处理

在前期实验中,将杨梅果实分别在36~60℃热空气中处理1~3h。处理结束后,将果实通风冷却1h后用聚乙烯塑料盒(20cm×12cm×8cm)分装,于(1±1)℃贮藏12d后测定果实腐烂率。结果发现48℃、3h热空气处理对杨梅果实采后腐烂的抑制效果最佳^[6]。因此以此作为热处理条件。将挑选出的果实随机分为2组,处理组用48℃热空气处理3h,对照组在20℃密闭放置3h,各处理组200个果实左右,重复3次。处理结束后,将果实通风冷却1h后用塑料盒分装,在(1±1)℃、相对湿度90%~95%贮藏12d。分别在果实处理前(0d)和处理后贮藏期间每隔3d取样进行分析测定。

1.3 指标测定

1.3.1 腐烂率

杨梅果实表面出现霉菌性病斑即记为烂果。

腐烂率/%=(烂果数/总果数)×100

1.3.2 酶活性和蛋白质含量测定

称取10g果肉,加入50mL内含1.33mmol/L EDTA和1g/L PVPP的50mmol/L磷酸缓冲液(pH7.8)冰浴匀浆,随后以10000×g冷冻离心20min,取上清液用于测定超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、抗坏血酸过氧化物酶和脂氧合酶活性和蛋白质含量。蛋白质含量按考马斯亮蓝法测定^[8]。

SOD活性测定:参考Beauchamp等^[9]的方法进行,以抑制NBT光还原50%为1个酶活力单位,结果以U/mg表示;CAT活性测定:参考Cakmak^[10]方法进行,以反应液每分钟在240nm处吸光度(A)变化0.001为1个酶活力单位,结果以U/mg表示;APX活性测定:参照Nakano等^[11]方法进行,以每分钟反应液在290nm处吸光度(A)变化0.001为1个酶活力单位,结果以U/mg表示;LOX活性测定:参考Todd^[12]方法,以反应液每分钟在234nm处吸光度(A)变化0.001为1个酶活力单位,结果以U/mg表示。

1.3.3 超氧阴离子自由基(O₂⁻·)和羟自由基(·OH)生成量测定

称取5g果肉用10mL体积分数0.2%甲酸的冷丙酮匀浆,随后以12000×g冷冻离心15min,收集上清液。沉淀再用10mL预冷的丙酮提取2次,再以12000×g冷冻离心10min。合并上清液,定容至25mL用于O₂⁻·和·OH生成量测定。

O₂⁻·生成量测定:参考苏新国^[13]方法,结果以nmol/(g·min)表示;·OH生成量测定:参照Halliwell^[14]的脱氧核糖法,结果以nmol/(g·min)表示。

1.3.4 热激蛋白(heat-shock protein, HSP)的 Western-blot 分析

2g 果肉用 10mL 内含 15mmol/L β -巯基乙醇的 100g/L TCA 溶液冰浴匀浆, 随后以 $10000 \times g$ 冷冻离心 30min。离心后的沉淀物用冰丙酮洗涤两次后过夜, 再以 $12000 \times g$ 冷冻离心 30min。沉淀物经冷冻干燥后再溶解于 5mL 预冷过的电泳缓冲液[100mmol/L Tris-HCl(pH8.7), 5mmol/L 抗坏血酸, 2mmol/L EDTA, 1mmol/L 二甲基亚砜和 1mmol/L PVPP]。上述蛋白提取液以 $15000 \times g$ 冷冻离心 30min 去除细胞碎片, 上清液用作电泳分析。

SDS-PAGE(SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳): 参照 Laemmli^[15]的方法进行。分离聚丙烯酰胺胶质量浓度为 12g/100mL, 浓缩胶质量浓度为 4g/100mL。每个电泳道中蛋白上样量为 40 μ g, 在 100~120V 的电压条件下进行电泳。参照 Zhang 等^[16]的方法进行 Western-blot 实验, 蛋白经过电泳分离后, 切去浓缩胶, 将分离胶上的多肽在 30V 恒定电压下转移至 0.45 μ m NC 膜上。随后, 将 NC 膜转移至一抗(小麦 HSP70 多克隆抗体)缓冲液中, 在 20r/min 摇床中摇晃过夜。接着再将 NC 膜转移至碱性磷酸酶欧联的第 2 抗体(碱磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG)缓冲液中摇晃过夜。用 NBT 和 BCIP 的混合溶液对 NC 膜上的蛋白谱带进行显色操作, 用 IMAGEQUANT 软件进行蛋白免疫信号强度的定量分析。

1.4 数据分析

所有指标测定均重复 3 次。运用 SPSS 12.0 软件进行数据处理分析, 用邓肯氏多重比较法进行差异显著性检验, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 热空气处理对杨梅果实采后腐烂的影响

腐烂率是杨梅果实最重要的品质指标。如图 1 所示, 随着贮藏时间延长, 杨梅果实的腐烂率呈不断上升的变化趋势, 对照果实在 1 $^{\circ}$ C 贮藏 12d 后腐烂指数达到 57.8%, 基本失去商品性。而热空气处理可显著($P < 0.05$)抑制杨梅果实在贮藏期间腐烂率的上升; 1 $^{\circ}$ C 贮藏 12d 后, 经热空气处理的果实, 其腐烂率仅为 15.6%, 极显著($P < 0.01$)低于对照果实。

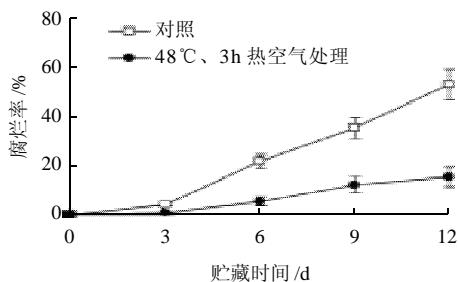


图 1 热空气处理对杨梅果实腐烂率的影响

Fig.1 Effect of hot air treatment on decay incidence in Chinese bayberry

2.2 热空气处理对杨梅果实 SOD、CAT、APX 和 LOX 活性的影响

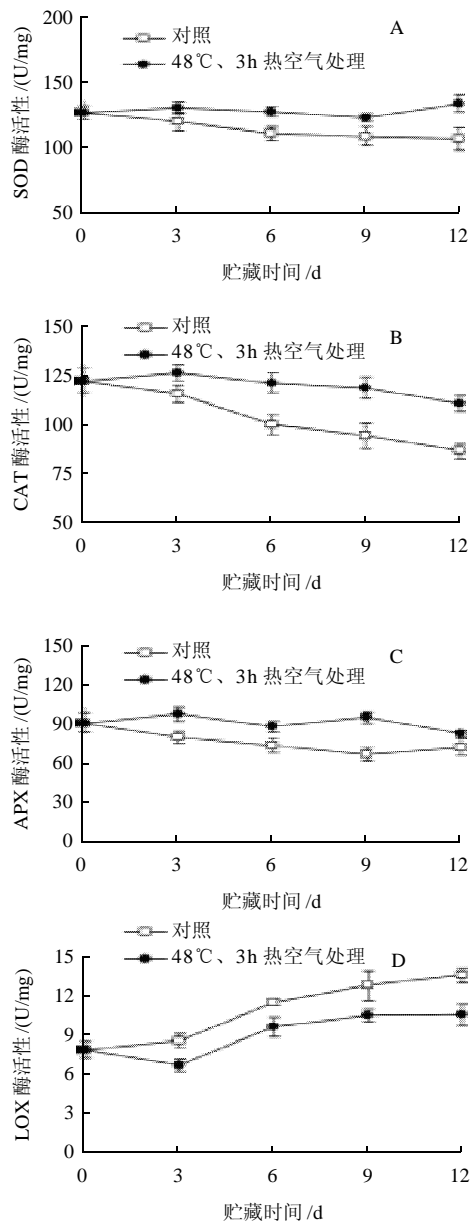


图 2 热空气处理对杨梅果实 SOD(A)、CAT(B)、APX(C)和 LOX(D)活性的影响

Fig.2 Effect of hot air treatment on the activities of SOD (A), CAT (B), APX (C) and LOX (D) in Chinese bayberry

SOD、CAT 和 APX 是植物组织中清除过量活性氧自由基的关键酶类; LOX 是细胞膜脂氧化的关键酶, 其活性的大小直接反映植物体的衰老程度。如图 2 所示, 在 1 $^{\circ}$ C 贮藏期间, 杨梅果实 SOD、CAT 和 APX 活性呈缓慢下降趋势, 而 LOX 活性却随着贮藏时间的延长而逐渐升高。热空气处理显著($P < 0.05$)延缓果实 SOD、CAT 和 APX 活性的下降, 使其活性在整个贮藏期间均显著($P <$

0.05)高于对照果实。另一方面,热空气处理明显抑制果实 LOX 活性的升高,在贮藏期间热处理果实的 LOX 显著($P < 0.05$)低于对照果实。

2.3 热空气处理对杨梅果实超氧阴离子自由基和羟自由基生成量的影响

超氧阴离子自由基和羟自由基是植物体中最典型的两种活性氧自由基。如图3所示,对照果实的超氧阴离子自由基和羟自由基生成量在贮藏期间迅速增加。热空气处理可显著($P < 0.05$)抑制超氧阴离子自由基和羟自由基的产生,从而减少活性氧自由基的过度积累。

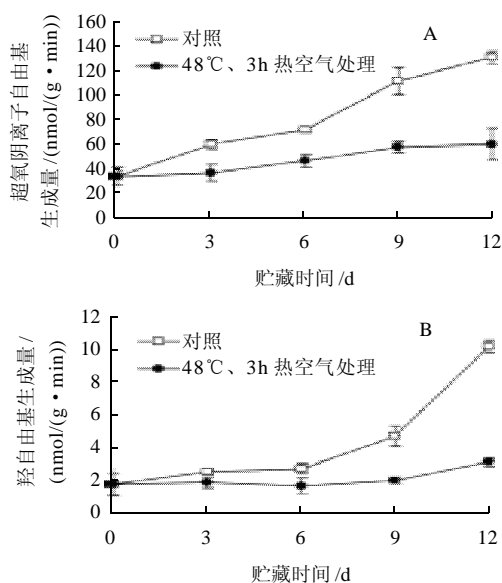
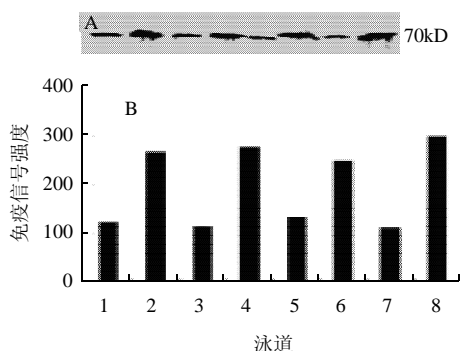


图3 热空气处理对杨梅果实超氧阴离子自由基(A)和羟自由基(B)生成量的影响

Fig.3 Effect of hot air treatment on production of superoxide anion (A) and hydroxyl radicals (B) in Chinese bayberry

2.4 热空气处理对杨梅果实热激蛋白合成的影响



1、3、5和7泳道的蛋白谱带分别来源于1℃贮藏3、6、9d和12d后的对照果实;2、4、6和8泳道蛋白分别来源于1℃贮藏3、6、9d和12d后的热空气处理果实。

图4 杨梅果肉细胞HSP70的Western-blot图谱(A)和对应的免疫信号强度(B)

Fig.4 Western blots of HSP70 isolated from Chinese berries (A), and corresponding intensity of each band (B)

应用多克隆HSP70抗体对杨梅果实在1℃贮藏期间的热激蛋白进行Western-blot分析。结果表明:热处理果实在贮藏期间,其果肉细胞中HSP70免疫检测信号强度明显高于对照果实,这说明热空气处理能够有效诱导杨梅果实中热激蛋白的合成(图4)。

3 讨论与结论

果实采后衰老与组织内活性氧代谢的失调密切相关。SOD、CAT和APX是植物体内酶促活性氧清除系统的主要酶类,SOD特异性的将 O_2^- 歧化成 H_2O_2 ,而CAT和APX能将 H_2O_2 或 $\cdot OH$ 降解为无毒的 H_2O ,3种酶相互协调作用从而有效抑制了活性氧的过度积累和膜脂过氧化。热空气处理可诱导枇杷^[4]和草莓^[5]果实中CAT、SOD和APX活性的上升从而减轻了活性氧自由基过度积累,抑制细胞膜相对电导率和膜脂过氧化产物丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量的上升,延缓了果实衰老进程。在本实验中,48℃、3h热空气处理同样能够有效抑制杨梅果实在贮藏期间SOD、CAT和APX活性的下降以及膜脂氧化指标LOX活性的上升,同时热处理果实的腐烂率也显著的低于对照果实,这说明热空气处理能够通过维持杨梅果实活性氧代谢平衡来延缓果实衰老,从而间接提高了果实抗病性。

一般认为热激蛋白是一类在生物体受到高温胁迫时才大量表达的低分子质量蛋白质。近年来研究表明,诸多生物(如病害)与非生物(如缺水,低温、高盐浓度、厌氧、重金属离子、营养匮乏等)等因素均可诱导HSP的产生^[17]。大部分HSP都具有分子伴侣功能,主要参与生物体内新生肽的运输、折叠、组装、定位以及变性蛋白的复性和降解^[7]。而且,在逆境下产生的HSP可能赋予植物交叉抗性(cross-tolerance),即一种逆境条件诱导的HSP可增加植物体对另一种逆境的抗性^[18]。贮藏前适当的热处理能诱导一些果蔬如葡萄^[3]、香蕉^[19]和菠菜^[20]中分子质量为17kD和70kD的HSP合成,同时果蔬采后活性氧积累、衰老和腐烂明显也得到了抑制,这说明经热胁迫产生的HSP具有平衡活性氧代谢、延缓采后衰老和腐烂的交叉作用。本实验在杨梅果实上得到了类似结果:48℃的热空气处理杨梅果实可促进HSP70的合成并在随后贮藏中维持了较高水平,同时果实活性氧代谢相关酶的活性也明显上升,这说明诱导的HSP可能参与了这些抗逆酶的合成,从而延缓果实衰老并提高抗病性,抑制采后病害的发生。

参考文献:

- [1] 席巧芳,郑永华,应铁进,等.杨梅果实采后的衰老生理[J].园艺学报,1994,21(3):213-216.
- [2] ALSCHER R G, DONAHUE J L, CRAMER C L. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationship in green cells [J]. Physiologia

- Plantarum, 1997, 100(2): 224-233.
- [3] ZHANG Junhuan, HUANG Weidong, PAN QiuHong, et al. Improvement of chilling tolerance and accumulation of heat shock proteins in grape berries (*Vitis vinifera* cv. Jingxiu) by heat pretreatment[J]. Postharvest Biology and Technology, 2005, 38(1): 80-90.
- [4] 芮怀瑾, 尚海涛, 汪开拓, 等. 热处理对冷藏枇杷果实活性氧代谢和木质化的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(14): 304-308.
- [5] VICENTE A R, MARTINEZ G A, CHAVES A R, et al. Effect of heat treatment on strawberry fruit damage and oxidative metabolism during storage[J]. Postharvest Biology and Technology, 2006, 40(2): 116-122.
- [6] WANG Kaituo, CAO Shifeng, JIN Peng, et al. Effect of hot air treatment on postharvest mould decay in Chinese bayberry fruit and the possible mechanisms[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 141(1): 11-16.
- [7] VIERLING E. The roles of heat shock proteins in plants[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1991, 42(1): 579-620.
- [8] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1): 248-254.
- [9] BEAUCHAMP C, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels[J]. Analytical Biochemistry, 1971, 44(1/2): 276-287.
- [10] CAKMAK I, STRBAC D, MARSCHNER H. Activities of peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds[J]. Journal of Experimental Botany, 1993, 44(1): 127-132.
- [11] NAKANO Y, ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. Plant Cell Physiology, 1981, 22(5): 867-880.
- [12] TODD T F, PALIYATH G, THOMPSON J E. Effect of chilling on the activities of lipid degrading enzymes in tomato fruit microsomal membranes[J]. Plant physiology and biochemistry, 1990, 30(5): 517-522.
- [13] 苏新国, 郑永华, 张兰, 等. 菜用大豆采后用不同浓度 1-MCP 处理对贮藏期间衰老及腐烂的影响[J]. 植物生理与分子生物学报, 2003, 36(3): 318-323.
- [14] HALLIWELL B, GUTTERIDGE J M C, ARUOMA O I. The deoxyribose method: a simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 165(1): 215-219.
- [15] LAEMMLI U K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(4): 680-685.
- [16] ZHANG Dapeng, WANG Yongzhang. Post-translational inhibitory regulation of acid invertase induced by fructose and glucose in developing apple fruit[J]. Science, 2002, 45(3): 309-321.
- [17] WANG Wangxia, VINOCUR B, ALTMAN A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance[J]. Planta, 2003, 218(1): 1-14.
- [18] SABEHAT A, WEISS D, LURIE S. Heat shock proteins and cross-tolerance in plants[J]. Physiologia Plantarum, 1998, 103(3): 437-441.
- [19] CHEN Jianye, HE Lihong, JIANG Yueming, et al. Role of phenylalanine ammonia-lyase in heat pretreatment-induced chilling tolerance in banana fruit[J]. Physiologia Plantarum, 2008, 132(3): 318-328.
- [20] GÓMEZ F, FERNANDEZ L, GERGOFF G, et al. Heat shock increases mitochondrial H₂O₂ production and extends postharvest life of spinach leaves[J]. Postharvest Biology and Technology, 2009, 49(2): 229-234.