

# 机械损伤对富士苹果酶促褐变的影响

王艳颖<sup>1,3</sup>, 胡文忠<sup>1,\*</sup>, 庞坤<sup>2</sup>, 朱蓓薇<sup>3</sup>, 范圣第<sup>1</sup>

(1. 大连民族学院生命科学学院, 辽宁 大连 116600 2. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023

3. 大连工业大学生物与食品工程学院, 辽宁 大连 116034)

**摘 要:** 研究了富士苹果机械损伤后在 5℃ 和 18℃ 贮藏条件下对生理变化及酶活性的影响。结果表明, 机械损伤后的果实相对电导率急剧增大、L\* 值迅速下降、多酚含量逐渐降低、丙二醛(MDA) 含量逐渐上升, 果肉快速发生褐变。机械损伤提高了多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD) 和过氧化氢酶(CAT) 的活性, 抑制了超氧化物歧化酶(SOD) 的活性。随着贮藏时间的延长, 除了 PPO 外, 其它指标都呈现了上升、下降的反复过程, 说明组织自身的保护酶系统对胁迫具有生理防御作用, 而且在低温贮藏时酶活性较强而能有效地延缓果实的衰老。

**关键词:** 机械损伤; 富士苹果; 多酚氧化酶; 酶促褐变

## Effects of Mechanical Damage on Enzymatic Browning in Fuji Apples

WANG Yan-ying<sup>1,3</sup>, HU Wen-zhong<sup>1,\*</sup>, PANG Kun<sup>2</sup>, ZHU Bei-wei<sup>3</sup>, FAN Sheng-di<sup>1</sup>

(1. College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China;

2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;

3. School of Biological and Food Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

**Abstract:** The effects of mechanical damage on physiological changes and the enzymatic activity of Fuji apples during storage at 5°C and 18°C were investigated. The results showed that the relative electrical conductivity increases rapidly, L\* value decreases rapidly, the content of polyphenol decreased gradually, the content of malondialdehyde(MDA) increases gradually and flesh becomes brown rapidly in Fuji apples after mechanical damage. The activities of polyphenol oxidase(PPO) and peroxidase(POD) and catalase (CAT) all increase while the activity of superoxide dismutase (SOD) is restricted after mechanical damage. The parameters show the increasing and reducing cycles except PPO after extension of storage. It also showed that the protective enzyme system of injured tissue defends stress and the better activity of enzyme delays aging of fruit during low temperature storage.

**Key words** mechanical damage; Fuji apple; polyphenol oxidase; enzymatic browning

中图分类号: S379.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0430-05

富士(Fuji)苹果是20世纪80年代初从日本引进我国的优良品种, 具有果肉硬脆、可溶性固形物含量高、品质好、耐贮藏等优点, 目前已成为我国第一大苹果主要栽培品种<sup>[1]</sup>。近年我国富士苹果产量逐年递增, 质量不断提高, 但苹果在采后包装、运输、贮藏到消费者手中的整个过程都不可避免地受到如挤压、振动、碰撞等不同程度的机械损伤, 尤其是近年鲜切果蔬加工业的发展, 使苹果在加工过程中受到严重的机械损伤。机

械损伤使果实天然的组织结构遭到破坏, 膜透性增加, 酚类物质和多酚氧化酶(PPO)迅速接触而导致果实发生酶促褐变<sup>[2-4]</sup>, 这些变化不仅影响了苹果的外观质量, 也加速了其营养成分的损失<sup>[5]</sup>, 更导致苹果的商品价值和食用品质的下降。同时机械损伤也为微生物侵染开辟了途径, 使苹果衰老加快, 腐烂增加, 造成苹果在贮运过程中尤其是贮藏后期损失严重<sup>[6]</sup>。为了探索采后富士苹果受机械损伤后酶促褐变的机制, 本实验通过人工模

收稿日期: 2007-04-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571302; 30671458); 辽宁省教育厅高等学校科研基金资助项目(2005L057)

作者简介: 王艳颖(1968-), 女, 工程师, 硕士研究生, 研究方向为果蔬加工保鲜工艺及理论。E-mail:wyy@dlnu.edu.cn

\* 通讯作者: 胡文忠(1959-), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品科学与食品生物技术。E-mail:hwz@dlnu.edu.cn

拟机械伤害, 研究伤害部位生理代谢的变化, 为采后果蔬的科学贮运与加工提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料及处理

材料: 2006年10月末采自瓦房店松树镇朝阳村果园, 选用色泽一致、大小均匀、无病虫害和无机机械伤的富士苹果为试验材料, 采后当天运至实验室, 并贮藏在1℃、相对湿度90%~95%的冷库中备用。

机械损伤处理方法: 将苹果置于离地面50cm高处, 采用自由落体跌至理石地面上, 每个果实正反面各产生一处机械伤, 以不经跌落的果实为对照, 分别贮藏在5℃和18℃两种条件下。每1~2d取样测定相关指标, 每次每处理取3~5个果实进行分析。

### 1.2 仪器设备

CR400/CR410型色差计 日本Konica Minolta公司; 电子天平 梅特勒-托利多(上海)有限公司; BR4i型高速冷冻离心机 法国Jouan公司; T-25型匀浆机 德国IKA公司; UV-2100型紫外可见分光光度计 尤尼柯上海仪器有限公司; SiM-F140型制冰机 日本三洋公司; 组合式气调库 大连冷冻机股份有限公司; Lambda 25型紫外可见分光光度计 美国Perkin Elmer公司; 电导率仪 美国Thermo Electron Corporation公司。

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 果肉颜色的测定

用色差计测定。

#### 1.3.2 相对电导率的测定

参照席筠芳的方法<sup>[7]</sup>。

#### 1.3.3 多酚含量的测定

参照Pirie法<sup>[8]</sup>并修改: 5g果肉组织与预冷的25ml 1% HCl-甲醇溶液充分研磨提取, 然后于4℃下12000×g离心10min, 上清液直接用于比色, 样品重复测定3次。酚类含量以OD<sub>280</sub>/g FW表示。

#### 1.3.4 PPO、POD活性及MDA含量的测定

##### 1.3.4.1 提取液的制备

取10g去皮果肉, 加1g PVPP于20ml 0.2mol/L磷酸缓冲液(pH6.4)中, 冰浴研磨, 4℃下13000×g离心30min, 取上清液测定酶活性和MDA含量。

##### 1.3.4.2 PPO活性测定

参照Galeazzi等的方法<sup>[9]</sup>并加以改进, 将0.5ml粗酶提取液加入3ml 0.5mol/L的邻苯二酚溶液(用0.2mol/L pH6.4的磷酸缓冲液配成)中。反应温度为25℃, 加酶液后5s开始扫描10s内398nm处吸光度变化, 样品重复测定3次。酶活性以 $\Delta OD_{398nm}/\text{min} \cdot \text{g FW}$ 表示。

##### 1.3.4.3 POD活性的测定

按照Putter的方法<sup>[10]</sup>并稍作修改, 将0.5ml粗酶提取液加入2ml 0.3%愈创木酚(用0.2mol/L pH6.4的磷酸缓冲液配成)中, 在30℃水浴中平衡5min, 然后加入1ml 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(用0.2mol/L pH6.4的磷酸缓冲液配成), 混匀, 1min后扫描1min内460nm处吸光度变化, 样品重复测定3次。酶活性以 $\Delta OD_{460nm}/\text{min} \cdot \text{g FW}$ 表示。

##### 1.3.4.4 MDA含量的测定

参照Heath和Pacontroler的方法<sup>[11]</sup>, 将1.5ml粗酶提取液加入2.5ml 0.5%的硫代巴比妥酸(TBA, 用15%的三氯乙酸配成)溶液中, 混匀后在沸水域中煮沸18min, 迅速用自来水冷却, 并在10000×g离心机中离心10min。取上清液在532nm和600nm波长下分别测定吸光度, 样品重复测定3次。

##### 1.3.5 SOD活性的测定

采用NBT方法<sup>[12]</sup>, 以50%抑制的酶液量为1个酶活单位。

##### 1.3.6 CAT活性的测定

参照Acbi法<sup>[13]</sup>并修改, 取5g果肉, 加入10ml预冷的pH7.5 0.05mol/L的磷酸缓冲液(内含50mmol/L二硫苏糖醇和1% PVPP)在冰浴中研磨成匀浆, 12000×g 4℃下离心20min, 收集上清液立即用于CAT酶活测定。CAT反应体系包括粗酶液200 $\mu$ l和3ml 20mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 以蒸馏水作参比。在240nm处测定2min内的样品吸光度, 样品重复测定三次。

## 2 结果与分析

### 2.1 机械损伤对富士苹果相对电导率的影响

细胞质膜完整性的破坏是果实衰老的重要标志。膜的损伤表现为失去选择透性, 电解质漏泄增大。细胞膜透性可以用相对电导率大小来衡量。如图1所示, 对照果的相对电率随贮藏期的延长均显示逐渐上升的趋势, 且随温度的升高而增幅较大。机械损伤使富士苹果的相对电导率急剧上升, 伤后当天的相对电导率达到63.29%, 是对照果的1.37倍, 以后相对电导率总体又呈现逐渐下降的趋势。但在贮藏过程中, 相对电导率呈现不同程度的下降、上升的反复过程, 而5℃贮藏的相对电导率比18℃的相对电导率变化速度较快、降幅较大。说明机械损伤破坏了细胞膜结构, 细胞液外渗, 导致相对电导率迅速上升。随着组织自身新陈代谢的不断进行, 愈伤组织逐渐形成, 组织的失水和电解质外渗得到了控制, 相对电导率逐渐下降。而且低温贮藏有效地抑制了相对电导率的上升。

### 2.2 机械损伤对富士苹果多酚含量的影响

对照果实的多酚含量均呈前期上升、后期下降的趋

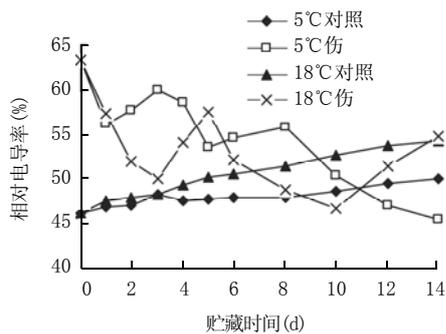


图1 机械损伤对富士苹果相对电导率的影响

Fig.1 Effects of mechanical damage on relative electrical conductivity of Fuji apples

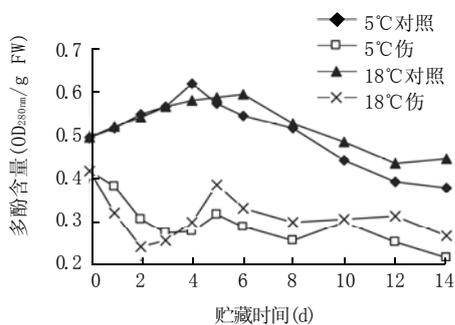


图2 机械损伤对富士苹果多酚含量的影响

Fig.2 Effects of mechanical damage on polyphenol conductivity of Fuji apples

势,如图2所示。机械损伤使苹果的多酚含量迅速下降,伤后当天多酚含量降为对照的84%,而且温度越高,下降幅度越大。同时,受伤果的多酚含量在贮藏期间显示了下降、上升的反复过程,贮藏期末,5°C和18°C贮藏的多酚含量分别为对照的58%和60%。实验结果表明,机械伤导致了酶促褐变的发生,消耗了大量的酚类物质,而且温度越高,酚类物质消耗就越多。随着贮藏期的延长,受损伤的组织可能产生酚类等次生代谢物质,参与愈伤组织的形成;或者伤处周围的酚类物质在浓度梯度作用下不断向伤处转移,导致酚类物质含量有所回升。而且在低温贮藏过程中酚类物质的生理代谢较缓慢,减弱了酶促褐变的趋势,这对果蔬的保鲜是有利的。

### 2.3 机械损伤对富士苹果PPO活性的影响

多酚氧化酶(PPO)在组织细胞内以两种形式存在,一种具有催化活性的游离态(FPPO)存在于细胞质中;一种以潜在活性的结合态(BPPO)存在于细胞膜上,果蔬一旦遭到机械损伤,造成细胞质膜的破裂,BPPO便游离出来,转化为具有催化活性FPPO<sup>[3]</sup>。如图3所示,受伤果的PPO活性与对照都呈现贮藏前期上升后期下降的趋势,两者都在第4d达到峰值,但PPO活性相差不大,苹果受到机械损伤的当天,PPO活性明显高于对照;贮藏

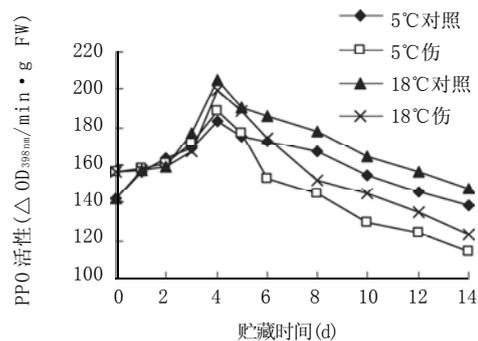


图3 机械损伤对富士苹果PPO活性的影响

Fig.3 Effects of mechanical damage on PPO activity of Fuji apples

藏后期的PPO活性明显低于对照,而且5°C贮藏的PPO活性低于18°C的PPO活性。实验结果表明,机械伤导致细胞膜上的BPPO转化为具有催化活性的FPPO,加速了酶促褐变的趋势。贮藏后期低温明显地抑制了PPO的活性。所以,既使受机械损伤的果实,在低温条件下贮藏仍然是有利的。

### 2.4 机械损伤对富士苹果POD活性的影响

POD是植物在逆境条件下酶促防御系统的关键酶之一,它与SOD、CAT相互协调配合,清除过剩的自由基,以提高植物的抗逆性<sup>[14]</sup>。图4所示,对照果POD活性都呈现先上升后下降的趋势,温度越高,酶活性越低。而苹果受到损伤后,POD活性明显高于对照,温度越低,POD活性越高。5°C和18°C贮藏的POD活性分别于第4d和第3d达到峰值,分别比对照高72%和17%。随着贮藏时间的延长,POD活性也呈现下降、上升的反复过程,但低温条件下POD活性变化得比较缓慢。贮藏期末,5°C贮藏的POD活性仍在上升,是同期18°C处于下降阶段POD活性的1.9倍。实验结果表明,POD活性伴随着机械伤害而上升,这与Miller A R等在黄瓜上的试验结果<sup>[15]</sup>相一致,而且POD活性与CAT活性变化趋势相似,说明POD和CAT一样在清除自由基

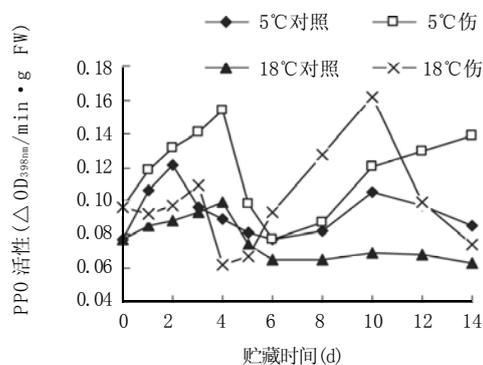


图4 机械损伤对富士苹果POD活性的影响

Fig.4 Effects of mechanical damage on POD activity of Fuji apples

延缓果实快速衰老方面起到快速保护作用。

2.5 机械损伤对富士苹果 MDA 含量的影响

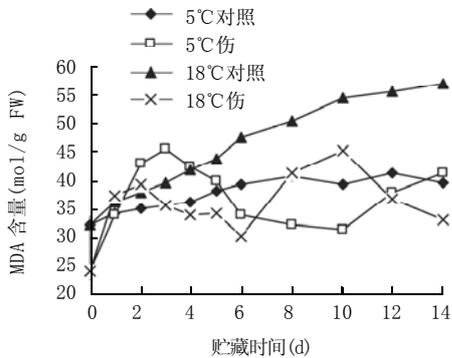


图5 机械损伤对富士苹果 MDA 活性的影响

Fig.5 Effects of mechanical damage on MDA activity of Fuji apples

果蔬组织中活性氧产生和清除之间的不平衡，导致活性氧的积累，从而促进膜脂过氧化作用<sup>[16]</sup>，MDA 是膜脂过氧化的产物。如图 5 所示，对照果实的 MDA 含量都显示了上升趋势，温度越高，上升幅度越大。苹果受到机械损伤后，MDA 含量逐渐上升，5℃和 18℃贮藏的 MDA 含量分别于第 3d 和 2d 达到第一次峰值，分别比对照高 28% 和 4%。然后又经过下降、上升的反复过程，但 5℃贮藏的 MDA 含量上升和下降速度较慢。这说明机械损伤加速了膜脂过氧化，使 MDA 含量逐渐上升。但随着细胞膜保护酶系统不断清除活性氧等自由基，贮藏后期膜脂过氧化作用减弱，从而减轻了酶促褐变的程度，而且在低温条件下，膜脂过氧化速度较慢。

2.6 机械损伤对富士苹果 SOD 活性的影响

植物对由细胞内过剩自由基而引发或加剧的膜脂过氧化作用，有酶促和非酶促两类防御系统，SOD 是酶促防御系统的重要保护酶。本试验结果如图 6 所示，损伤后的苹果 SOD 活性在贮藏前期和后期分别明显低于对照，18℃贮藏初期的 SOD 活性下降幅度较大，贮藏第

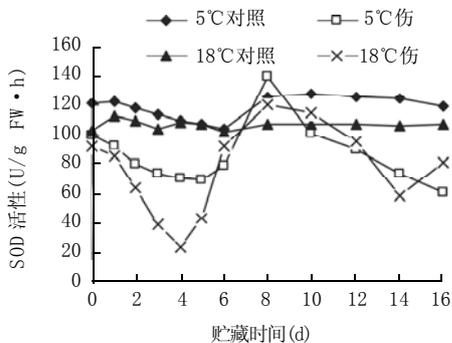


图6 机械损伤对富士苹果 SOD 活性的影响

Fig.6 Effects of mechanical damage on SOD activity of Fuji apples

4d 时下降至最低值，是同期 5℃贮藏的 35%。然后两者又开始回升，在第 8d 达到最大值，分别比对照高 11% 和 13%。然后两者又逐渐下降。实验结果说明机械损伤抑制了果实 SOD 活性，从而加速了受伤果实的衰老进程。随着贮藏时间的延长，SOD 活性又呈现先上升后下降的趋势，说明果实在衰老过程中也能激发 SOD 活性，提高组织对逆境的抗氧化能力。而且，低温贮藏的 SOD 活性较高，能有效地延缓受伤组织的快速衰老。

2.7 机械损伤对富士苹果 CAT 活性的影响

果实衰老源于活性氧的积累，活性氧产生和清除之

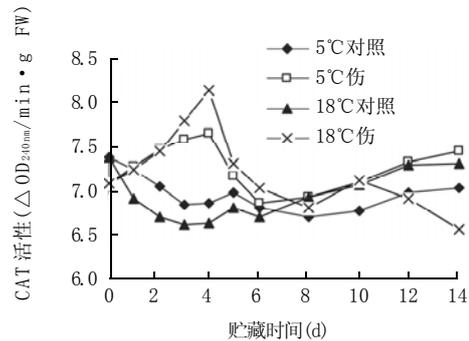


图7 机械损伤对富士苹果 CAT 活性的影响

Fig.7 Effects of mechanical damage on CAT activity of Fuji apples

间的平衡被破坏导致活性氧的积累，使果实衰老加剧。CAT 能分解代谢产生的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 而有效地清除自由基<sup>[17]</sup>。如图 7 所示。对照果的 CAT 活性呈现前期下降后期上升的趋势。而受到机械损伤后的苹果 CAT 活性在贮藏当天明显低于对照，以后逐渐上升，而且在第 4d 上升到最大值，5℃和 18℃贮藏的 CAT 活性分别比对照高 11.4% 和 23.1%，然后两者又快速下降，温度越高，下降幅度越大，贮藏期末 5℃贮藏的 CAT 活性是 18℃贮藏的 1.13 倍。说明机械损伤能直接诱导 CAT 活性的增强，而且在低温下较稳定且作用时间较长，能有效地延缓受伤果实的快速衰老。

2.8 机械损伤对富士苹果果肉 L\* 值的影响

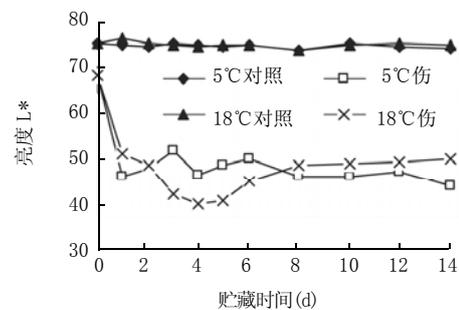


图8 机械损伤对富士苹果果肉 L\* 的影响

Fig.8 Effects of mechanical damage on flesh L\* of Fuji apples

果肉褐变最显著的特征就是果肉颜色的变化。如图8所示,对照果在贮藏过程中果肉L\*值基本不变,保持了很好的贮藏品质。而机械伤害导致果肉L\*值迅速下降,贮藏1d时,5℃和18℃贮藏的果肉L\*值分别下降至46和51。而且18℃贮藏前期L\*值降幅较大,贮藏至第4d时,L\*值下降到最低点40,以后逐渐回升。5℃贮藏的L\*值在贮藏过程中显示了较明显的上升、下降的反复趋势,但幅度较小。说明苹果受到机械损伤后果肉发生了酶促褐变,导致了L\*值迅速降低。而果实体内存在的非酶抗氧化剂VC能将酶促褐变的产物醌还原为无色的酚类物质<sup>[18]</sup>,使L\*值有小幅度的回升,而且低温贮藏时L\*值下降缓慢,减缓了受伤果实酶促褐变的趋势。

### 3 讨论

3.1 褐变是植物组织普遍存在的一种生理现象,通常认为是酚类物质的酶促氧化所致。酚类物质是植物组织代谢过程中产生的一类正常产物。它的合成是从苯丙氨酸解氨酶催化苯丙氨酸脱氨形成肉桂酸开始的,肉桂酸进一步羟化形成各种酚类化合物。在氧的作用下,PP0将酚氧化成醌,醌进一步聚合形成褐色素,导致组织褐变<sup>[19]</sup>。但是,在正常发育的果实中,酚类物质、氧和PP0同时存在却不发生果实褐变,这可能是在正常的组织细胞内由于物质通过一系列膜系统实现区域性分布,以致酚类物质不与PP0接触的缘故。本实验结果表明,苹果受到机械损伤后,相对电导率急剧增大、L\*值快速下降,多酚含量逐渐下降、PP0的活性呈先升后降趋势(图3),酚类物质的减少和褐变的出现同时发生,因此认为机械损伤破坏了细胞膜的结构,酚类物质不断渗出,同时与PP0迅速接触氧化而导致果肉组织发生褐变。

3.2 SOD、POD和CAT是植物体内存在的清除自由基的保护酶系统。SOD主要催化 $O_2^- \cdot$ 的歧化反应,使 $O_2^- \cdot$ 转变成 $O_2$ 和 $H_2O_2$ ,后者再被CAT或POD分解为 $O_2$ 和 $H_2O$ <sup>[20]</sup>。正常情况下植物体内的 $O_2^- \cdot$ 处于产生与清除的动态平衡中。逆境条件破坏了自由基代谢的平衡,引起膜脂过氧化,MDA是膜脂氧化的产物,它是衡量膜脂过氧化程度的指标。本实验结果表明,苹果受机械损伤后,SOD活性受到抑制,导致 $O_2^- \cdot$ 大量积累,虽然POD和CAT活性逐渐增强,但仍不能清除过剩的自由基,从而促使膜脂过氧化加剧,表现为MDA含量逐渐上升。随着贮藏时间的延长,除了PP0

外,各项指标都呈现了上升、下降的反复过程,而且在低温条件下,各种生理反应进行得比较缓慢,说明受伤组织的保护酶系统在抵抗逆境胁迫方面具有一定的调节作用,而且在低温下酶活性较强,能延缓果实的快速衰老。

### 参考文献:

- [1] 牛锐敏,饶景萍,韩新花,等.不同采收期对红富士苹果贮藏品质的影响[J].西北农业学报,2006,15(3):171-174.
- [2] KEVIN R, PAUL D P, PUCKER G, et al. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits[J]. Food Chemistry, 1999, 66: 401-436.
- [3] MAYER A M, HAREL E. Polyphenol oxidases in plants[J]. Phytochemistry, 1979, 18: 193-215.
- [4] 王森,谢碧霞.梨果肉褐变机理和防褐变技术的研究[J].北方果树,2004(5):4-7.
- [5] LEEA J Y, PARKA H J, LEE Z Y, et al. Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents[J]. Lebensmittel-Wiss U-Technol, 2003, 36: 323-329.
- [6] 胡新宇,宁正祥,向波,等.水果贮藏保鲜技术的进展[J].沈阳农业大学学报,2000,31(6):590-594.
- [7] 席均芳,郑永华,应铁进.杨梅果实采后的衰老机理[J].园艺学报,1994,21(3):213-216.
- [8] PIRIE A, MULLINS M G. Changes in anthocyanin and phenolic content of grapevine leaf and fruit tissue treated with sucrose, nitrate and abscisic acid[J]. Plant Physiol, 1976, 58: 486-472.
- [9] GALEAZZI M A M, SGARBIERI N, COSTANTINIDES S M. Isolation, purification and physicochemical characterization of phenol oxidase from dwarf variety of banana (*Musa cavendishi*) [J]. Food Sci, 1981, 46: 150-155.
- [10] PUTTER J. In methods of enzymatic analysis[M]. New York: Academy Press, 1974: 685-689.
- [11] HEATH R T, PACONTROLLER L. Photoperoxidation in isolated Chloroplasts. I. Kinetics and Stoichiometry of fatty acid peroxidation[J]. Archives of biochemistry and biophysics, 1968, 125: 189-198.
- [12] CONSTANTINE N G, STANLEY K R. Superoxide dismutases[J]. Plant Physiol, 1977, 59: 309-314.
- [13] ACBI H. Catalase *in vitro*[J]. Methods Enzymol, 1984, 105: 121-126.
- [14] GECHEV T, WILLEKENS H, MONTAGU M V, et al. Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress[J]. Journal of Plant Physiology, 2003, 160: 509-515.
- [15] MILLER A R, KELLEY T T. Mechanical stress stimulates peroxidase activity in cucumber fruit[J]. Hort Sci, 1989, 24(4): 650-652.
- [16] SALA J M. Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold stored mandarin fruit[J]. Postharv Biol Technol, 1998, 13: 255-261.
- [17] 阚娟,金昌海,汪志君,等.梨果实后熟衰老过程中温度对活性氧清除的影响[J].广州食品工业科技,2004,20(3):41-44.
- [18] NICOLAS J J, RICHARD-FORGET F C, GOUPY P M, et al. Enzymatic browning reactions in apple and apple products[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 1994, 34: 109-157.
- [19] 张维一.果蔬采后生理学[M].北京:中国农业出版社,1993.
- [20] FRY S C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms[J]. Annu Rev Plant Physiol, 1986, 37: 165-186.