

闵婷,郑梦林,李阳,等.高体积分数 CO_2 处理对柿果实褐变的影响[J].江苏农业科学,2016,44(3):288-290.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.082

高体积分数 CO_2 处理对柿果实褐变的影响

闵婷¹,郑梦林¹,李阳¹,殷学仁²,陈昆松²,易阳^{1,3},王宏勋^{1,3}

(1.武汉轻工大学食品科学与工程学院,湖北武汉 430023;2.浙江大学果树科学研究所,浙江杭州 310058;

3.湖北省生鲜食品工程技术研究中心,湖北武汉 430023)

摘要:涩柿果实采收后须经人工脱涩才能用于鲜食,其中高体积分数 CO_2 脱涩处理应用最广泛。经高体积分数 CO_2 处理后,柿果实贮藏过程中也会发生褐变。多酚氧化酶PPO作为酶促褐变最关键的基因,在各种果蔬中的研究较多,而关于PPO基因是否参与涩柿果实脱涩后褐变的研究尚未见报道。以“恭城水柿”为材料,经95% CO_2 处理2 d后切片,通过可溶性单宁含量测定、褐变程度观察、PPO基因克隆与表达分析研究 CO_2 处理对“恭城水柿”褐变的影响。结果表明,经95% CO_2 处理后,柿果实的可溶性单宁含量明显下降,柿果实完成脱涩。脱涩后的柿鲜切片于20℃下放置12 h后发生明显褐变。本研究克隆获得PPO基因部分片段序列,聚类分析表明,该PPO基因与苹果PPO基因较同源;基因表达分析显示,该PPO基因在 CO_2 处理后的鲜切柿片中的表达量比对照低,表明该PPO基因可能与柿子脱涩后的褐变无相关性。

关键词:恭城水柿;脱涩;褐变;PPO

中图分类号: TS255.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0288-03

柿(*Diospyros kaki*)属于柿科(Ebenaceae)柿属(*Diospyros*),起源于东亚,主要分布于中国、日本、韩国等东亚国家^[1]。不同于其他水果,柿果实的独特之处在于其能累积大量单宁,其中可溶性单宁可导致涩味。柿果实根据其天然脱涩的能力分为甜柿和涩柿。甜柿能在树上自然完成脱涩,采收后可直接食用;涩柿果实成熟时可溶性单宁含量仍较高,采收后须经人工脱涩方能鲜食^[2]。我国栽培的品种多为涩柿,涩柿的脱涩技术较为成熟,包括乙烯处理、 CO_2 处理^[3]、温水浸泡、交替冻融^[4]等,其中高体积分数 CO_2 处理应用最为广

泛。然而,高体积分数 CO_2 处理柿果实后,果实在贮藏过程中也会发生褐变,且处理时间越长则褐变程度越深^[5],使柿果实贮藏和货架期的果实品质下降。

褐变是果实品质劣变最明显的特征之一,不仅影响果实的营养、外观、风味,并已成为果蔬贮藏加工的主要障碍^[6]。果蔬褐变多以酶促褐变为主,与酶促褐变密切相关的酶类主要为多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO),多酚类物质在PPO的作用下氧化成醌,醌再聚合生成黑色或褐色的色素沉淀,组织表现为褐变。随着分子生物学的发展,马铃薯^[7]、梨^[8]、甘薯^[9]、蘑菇^[10]、莲藕^[11]等植物的PPO基因相继被克隆,而关于柿果实中PPO酶活性及其特性的报道较少。

以“恭城水柿”为材料,经95% CO_2 处理2 d后切片,通过可溶性单宁含量分析、褐变程度观察、PPO基因克隆与表达分析研究 CO_2 处理对“恭城水柿”褐变的影响,并进行PPO基因的克隆、进化树分析、基因表达分析,以期阐明柿果实脱涩后褐变的生物学机制。

收稿日期:2015-09-21

基金项目:湖北省教育厅科学研究计划(编号:B2015007)。

作者简介:闵婷(1987—),女,博士,讲师,主要从事果蔬精深加工研究。E-mail: minting1323@163.com。

通信作者:王宏勋,博士,教授,主要从事生鲜食品加工与安全研究。E-mail: 119075816@qq.com。

[3] Yuan J F, Zhang Z Q, Fan Z C, et al. Antioxidant effects and cytotoxicity of three purified polysaccharides from *Ligusticum chuanxiong* Hort. [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74(4): 822-827.

[4] Zhao Y X, Ding M Y, Liu D L. Phenolic acids analysis in *Ligusticum chuanxiong* using HPLC [J]. Journal of Chromatographic Science, 2005, 43(8): 389-393.

[5] Borges A, Ferreira C, Saavedra M J, et al. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria [J]. Microbial Drug Resistance, 2013, 19(4): 256-265.

[6] Chen J L, Lin D, Zhang C, et al. Antidepressant-like effects of ferulic acid: involvement of serotonergic and norepinephrine systems [J]. Metabolic Brain Disease, 2014, 30(1): 129-136.

[7] Alam M A, Sernia C, Brown L. Ferulic acid improves cardiovascular

and kidney structure and function in hypertensive rats [J]. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2013, 61(3): 240-249.

[8] 范宋玲, 张建军, 熊带水, 等. 川芎微波提取工艺优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 46-48.

[9] 白海波, 王剑飞, 宋子荣. 川芎提取工艺的优化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(4): 8-10.

[10] 侯丽丽, 陈洪海, 张守勤. 川芎中阿魏酸超高压提取工艺的优化 [J]. 湖北农业科学, 2014, 53(9): 2133-2135, 2139.

[11] 王赛君, 伍振峰, 杨明, 等. 中药提取新技术及其在国内的转化应用研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(8): 1360-1367.

[12] 宋成英. 酶解技术在中药提取中的应用研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(8): 1934-1935.

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

供试“恭城水柿”购自广西壮族自治区恭城县商业果园。甲醇、没食子酸、福林酚、 NaCO_3 、 NaCl 、 HCl 、十六烷基三甲基溴化铵、三羟甲基氨基甲烷、乙二醇四乙酸、聚乙烯吡咯烷酮、 LiCl 、十二烷基硫酸钠、氯仿、异戊醇、无水乙醇均购自国药集团化学试剂有限公司。DEPC 水、亚精胺、巯基乙醇均购自上海生工试剂公司。液氮购自湖北省武汉市明辉气体有限公司。双蒸水。

1.2 主要仪器

V-110D 型紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),HH-S4 型数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂),GL-20G-2 型飞鸽牌离心机(上海安亭科学仪器厂),00101D 型立式压力蒸汽灭菌锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),S2-93 型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂),DHG-9140A 型电热鼓风干燥器(上海一恒科学仪器有限公司),HYC-326A 型医用冷藏箱(青岛海尔特种电器有限公司),DYCP-31DN 型电泳仪(北京市六一仪器厂),CP214(C)型电子天平(上海奥豪斯仪器有限公司),PTT-A500 型电子天平(福州华志科学仪器有限公司),IMS-20 型雪科制冰机(常熟市雪科电器有限公司),凝胶成像仪(美国

伯乐公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 脱涩处理 成熟“恭城水柿”果实自商业果园采收后,于 2 d 内运至实验室。选择成熟度相对一致、果形匀称、大小中等、无机械损伤的果实进行相关采后试验。将果实平均分为 2 组,每组约 50 个,一组经 95% CO_2 处理 2 d 后转货架^[12];另一组作为对照,置于 20 ℃ 下直至试验结束。

1.3.2 切片处理 将脱涩试验完成后的处理组和对照组果实去皮,并切片为 3.0 cm × 3.0 cm × 0.3 cm 大小,2 组各切 30 片,置于 20 ℃ 下 12 h 后拍照,液氮取样用于后期试验。

1.3.3 可溶性单宁含量测定 采用福林酚方法^[12]进行可溶性单宁含量测定。没食子酸用于标准曲线的制作,每次测量重复 3 次,每个点进行 3 次生物学重复。可溶性单宁的质量分数用果实质量的百分含量表示。

1.3.4 *PPO* 基因的克隆与表达 进行 *PPO* 基因的克隆^[11],根据前期 RNA-seq 获得 *PPO* 基因序列,利用 Primer 3 在线软件(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>)设计引物(表 1)。按照试剂盒 PCR 扩增所得的目标片段连接,转化到大肠杆菌 DH5 α (TaKaRa 公司),挑选阳性克隆并进行测序验证。

进行 *PPO* 基因表达试验^[12],包括模板合成、引物特异性检测、实时定量 PCR (QPCR) 分析。

表 1 *PPO* 基因克隆引物

类别	基因名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
编码区克隆引物	<i>DkPPO1</i>	ATGGTGAAGAGGCCGAAGAA	GCGAATCCCTTCACGTGTA
QPCR 引物	<i>DkPPO1</i>	CATTGGAGGTGTGAAGATCGAG	GTCCGCATTATTTATTCTTGGG

2 结果与分析

2.1 95% CO_2 处理对柿果实可溶性单宁含量的影响

可溶性单宁是柿果实涩味的主要呈现者,可溶性单宁含量越高则涩味越严重。试验测定了对照组及 95% CO_2 处理 2 d 后的柿果实可溶性单宁含量。结果表明,经 95% CO_2 处理后,可溶性单宁含量仅为 0.19%,明显低于对照组的 1.40% (图 1),这与已有研究的结论^[12]相一致。可见,95% CO_2 处理能明显降低“恭城水柿”的可溶性单宁含量,实现柿果实的脱涩。

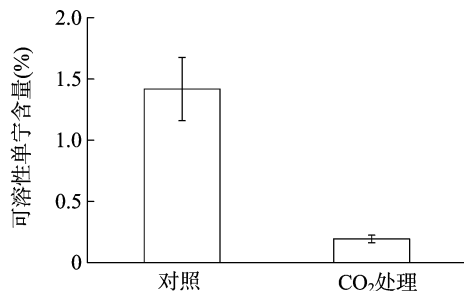


图 1 脱涩处理对柿果实可溶性单宁含量的影响

2.2 95% CO_2 处理对柿果实褐变的影响

将 95% CO_2 处理后的柿果实切片为 3.0 cm × 3.0 cm × 0.3 cm,于室温放置 12 h 后观察拍照(图 2)。结果表明,对照果实无明显变化;经 95% CO_2 处理后的果实切片褐变现象明

显,这与已有研究的结论^[5]相一致。可见,95% CO_2 处理能使“恭城水柿”在贮藏后期发生褐变。

2.3 柿果实 *PPO* 基因的克隆与表达

根据前期 RNA-seq 结果设计 *PPO* 基因克隆引物、荧光定量 PCR 引物(表 1),并克隆获得 *PPO* 基因部分片段序列,命名为 *DkPPO*。与马铃薯、苹果、番茄的 *PPO* 基因进行聚类分析显示,*DkPPO* 与苹果 *PPO* 基因同源关系较近(图 3)。进一步基因表达分析表明,该 *PPO* 基因在 CO_2 处理后的鲜切柿片中的表达量比对照低(图 4),表明该 *PPO* 基因可能未参与柿果实脱涩处理后的褐变。

3 结论

本研究探讨了 CO_2 处理对“恭城水柿”褐变的影响。结果表明,柿果实经 95% CO_2 处理后,其可溶性单宁含量明显下降,柿果实完成脱涩。脱涩后的柿鲜切片于 20 ℃ 下放置 12 h 后发生明显褐变。克隆获得 *PPO* 基因部分片段序列,基因表达结果显示,*DkPPO* 基因在 CO_2 处理后的鲜切柿片中的表达量比对照低,表明该 *PPO* 基因可能未参与柿果实脱涩处理后的褐变。 CO_2 处理导致“恭城水柿”褐变的原因有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Wang R Z, Yang Y, Li G C. Chinese persimmon germplasm resources [J]. Acta Horticulturae, 1997, 436: 43-50.

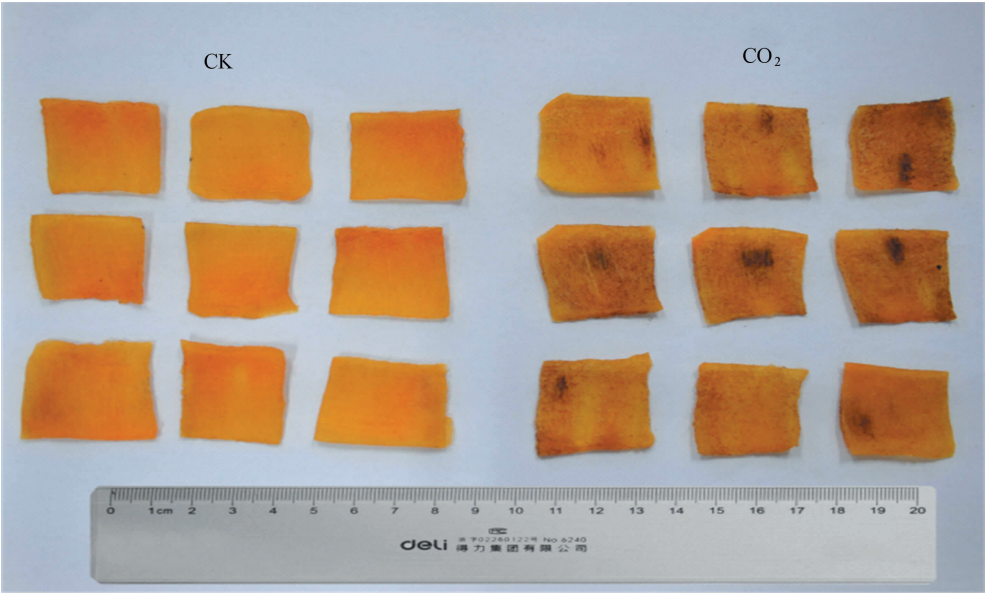


图2 脱涩处理对柿果实褐变的影响

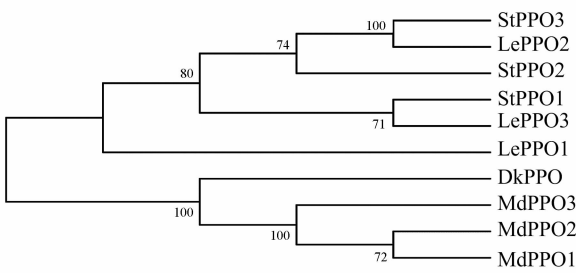


图3 *DkPPO* 基因进化树分析

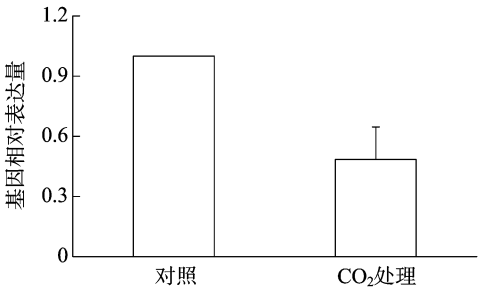


图4 脱涩处理对 *DkPPO* 基因表达的影响

[2] Min T, Yin X R, Shi Y N, et al. Ethylene - responsive transcription factors interact with promoters of ADH and PDC involved in persimmon (*Diospyros kaki*) fruit de - astringency [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63 (18) : 6393 - 6405.

[3] Taira S, Ono M, Otsuki M. Effects of freezing rate on astringency reduction in persimmon during and after thawing [J]. Postharvest Biology and Technology, 1998, 14 (3) : 317 - 324.

[4] Akagi T, Ikegami A, Tsujimoto T, et al. DkMyb4 is a Myb transcription factor involved in proanthocyanidin biosynthesis in persimmon fruit [J]. Plant Physiology, 2009, 151 (4) : 2028 - 2045.

[5] Novillo P, Salvador A, Llorca E, et al. Effect of CO₂ deastringency treatment on flesh disorders induced by mechanical damage in persimmon: Biochemical and microstructural studies [J]. Food Chemistry, 2014, 145 : 454 - 463.

[6] 宋晓雪, 胡文忠, 毕 阳, 等. 鲜切果疏酶促褐变关键酶的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2013, 34 (15) : 390 - 393.

[7] Hunt M D, Eannetta N T, Yu H F, et al. cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase [J]. Plant Molecular Biology, 1993, 21 (1) : 59 - 68.

[8] Nishimura M F C, Some Properties of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) polyphenol oxidase and changes in browning potential during fruit maturation [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2003, 83 : 1156 - 1162.

[9] Liao Z, Chen R M. Molecular cloning and characterization polyphenol oxidase gene from sweet potato [J]. Molecular Biology, 2006, 40 (6) : 907 - 913.

[10] Li N Y, Wm C, Jin Q L, et al. Molecular cloning and expression of polyphenol oxidase gene from the mushroom, *Agaricus bisporus* [J]. Agricultural Science in China, 2011, 10 (2) : 185 - 194.

[11] 张跃进, 郝晓燕, 梁宗锁, 等. 莲藕多酚氧化酶基因 (PPO) 的克隆与表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 2011, 19 (4) : 634 - 641.

[12] Min T, Fang F, Ge H, et al. Two novel anoxia - induced ethylene response factors that interact with promoters of deastringency - related genes from persimmon [J]. PLoS One, 2014 (9) : e97043.