

壳聚糖涂膜对苹果虎皮病防治效果与机理研究*

吕新刚 刘兴华 蔡露阳

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

【摘要】以红富士苹果为试材,研究了壳聚糖涂膜处理对苹果虎皮病的防治效果,并从α-法尼烯的生成及氧化、膜结构和功能及褐变相关酶活性变化3个方面探讨壳聚糖涂膜对贮藏过程中苹果生理变化的影响,以揭示其对虎皮病的作用机理。结果表明:壳聚糖涂膜可以抑制果实呼吸作用和乙烯的生成,降低α-法尼烯生成及氧化产物共轭三烯的积累,降低膜脂过氧化作用,较好地保持细胞膜的完整性,抑制PPO活性的升高;壳聚糖涂膜处理对虎皮病有明显的防治作用。

关键词: 苹果 虎皮病 壳聚糖涂膜 试验

中图分类号: TS255.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2011)03-0131-05

Effects and Mechanism of Chitosan Coatings in the Control of Superficial Scald in Apples

Lü Xin'gang Liu Xinghua Cai Luyang

(College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract

The effects of chitosan coatings on the control of superficial scald in “Fuji” apples were investigated, and the dynamic changes in α-farnesene production and oxidation, the texture and function of cell membrane and the activity of enzyme related with browning were also measured to reveal the mechanism of chitosan coatings in the superficial scald control. The results indicated that by chitosan coatings, the respiration rate and the ethylene production were inhibited, the production of α-farnesene and the accumulation of conjugated trienes were reduced, membrane lipid peroxidation was weakened and the integrity of cell membrane was kept, and the increase of polyphenoloxidase (PPO) activities was inhibited, the chitosan coating could effectively control the superficial scald in apples.

Key words Apples, Superficial scald, Chitosan coating, Experiment

引言

苹果虎皮病是贮藏中后期发生的一种严重生理病害,可在果实表皮形成褐色病斑,导致果实商品质量下降。虎皮病的防治可概括为非化学防治和化学防治两个方面。非化学防治主要有热处理和气调贮藏两种方式,但热处理仅适用于短期贮藏,而气调贮藏成本高,应用尚有较多困难;化学防治主要有DPA(二苯胺)、1-MCP(1-甲基环丙烯)、醇类等,

DPA防治效果最好,但因其安全性问题而逐步被许多国家禁用^[1]。因此,寻找非化学防治方法以及用天然的抑制物代替目前应用的化学制剂是今后的发展趋势。研究表明,虎皮病的发生与α-法尼烯的氧化代谢、内源抗氧化物含量、活性氧代谢、膜伤害以及酚的氧化褐变等因素有关^[2]。限制果皮内的氧化反应是控制虎皮病发生的关键^[3]。果实角质层对O₂的渗入有很强的阻碍作用,角质层的厚度可影响α-法尼烯的氧化及虎皮病的发生程度。因此,通

收稿日期: 2010-06-10 修回日期: 2010-06-27

*“十一五”国家科技支撑计划资助项目(2006BAK02A24)

作者简介: 吕新刚,博士生,主要从事农产品贮藏与加工研究, E-mail: lvxg@live.cn

通讯作者: 刘兴华,教授,博士生导师,主要从事果蔬的贮藏与加工研究, E-mail: liuxh2830@163.com

过科学改善果实表皮结构,提高其保护性能,则可以抑制虎皮病的发生。

壳聚糖涂膜是经一定浓度的壳聚糖浸渍或喷雾处理,在果实表面形成一层均匀、透明、致密的薄膜,相当于增加了果皮的厚度,一定程度上堵塞了果皮上的裂纹和皮孔,可以阻止水分蒸腾,减少病原菌感染,提高抗病性;能够抑制果实呼吸强度,调节防御酶活性,延缓衰老^[4]。壳聚糖涂膜技术已在油桃、芒果等水果贮藏保鲜中有应用,但国内外还未见壳聚糖涂膜用于虎皮病防治的报道。

因此,结合对虎皮病发病机理的认识及壳聚糖涂膜保鲜的可能作用机制,本文以红富士苹果为试材,研究壳聚糖涂膜对虎皮病的防治效果,从 α -法尼烯的生成及氧化、膜结构及其功能和褐变相关酶活性变化3个方面探讨壳聚糖涂膜对虎皮病的防治机理,以期壳聚糖涂膜在虎皮病防治中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和处理

供试品种为红富士,于2008年10月12日采自陕西省宝鸡市扶风县果园。果实采后当天运回实验室,预冷24 h后,选择大小均匀、无病虫害、无机械损伤,色泽、成熟度基本一致的果实进行处理。壳聚糖(脱乙酰度含量90%以上,分子量20万以上,黏度小于100 mPa·s)购于上海国药集团化学试剂有限公司。

果实分别在质量分数1.0%、1.5%、2.0%的壳聚糖溶液(以1.0%乙酸溶液为溶剂)中浸泡3 min,以清水浸泡为对照。处理果实自然晾干后装入纸箱,置于温度(0±1)℃、湿度85%~95%的冷库内贮藏。

1.2 测定指标及方法

1.2.1 α -法尼烯/共轭三烯含量

从每个苹果的赤道部位两面对称取果皮,每个处理共用10个果实,刮净内侧果肉,用打孔器制成直径1 cm圆片,共20片,放入10 mL正己烷中(用小的具塞试管盛放,提取过程注意密封),在22℃水浴中振荡提取10 min,滤纸过滤后重新定容至10 mL。滤液于232 nm下测定 α -法尼烯含量;于281 nm和290 nm处测定共轭三烯含量,结果均以nmol/cm²表示^[5]。重复测定3次,取平均值。

1.2.2 呼吸强度

用Telaire7001型红外线CO₂分析仪测定。

1.2.3 乙烯释放量

用岛津GC-9A型气相色谱仪测定。乙烯分析

条件:GDX-502型色谱柱,柱温90℃,氮气为载气,氢火焰离子化检测器检测,检测室温度140℃。

1.2.4 多酚氧化酶(PPO)活性

采用邻苯二酚法测定^[6]。

1.2.5 MDA含量和细胞膜透性

MDA含量用硫代巴比妥酸法测定^[7];细胞膜透性用DDS211A型电导率测定仪测定。

1.2.6 病情指数

按病变面积占果实表皮总面积的比例进行分级:正常果为0级,1%~10%为1级,11%~33%为2级,34%~66%为3级,67%~100%为4级。病情指数计算公式为

$$I = \frac{\sum (NS)}{TS_i} \times 100\%$$

式中 N ——病果数 S ——病果级数
 T ——检查果总数
 S_i ——检查果中病果最高级数

1.2.7 数据处理与分析

采用统计软件SAS 9.0进行数据分析,处理间显著性差异分析采用Duncan新复极差法。

2 结果与分析

2.1 虎皮病病情指数

试验用苹果在(0±1)℃冷库中贮藏一定时间后取出,在20℃恒温条件下放置7 d,观察虎皮病发生情况。贮藏120 d内未观察到病变发生,150 d和180 d的发病情况如表1所示。由表1可以看出,贮藏时间越长,发病越严重;壳聚糖涂膜处理可抑制虎皮病的发生,各处理组病情指数显著低于对照($P < 0.05$);随壳聚糖浓度增加,病情指数显著降低($P < 0.05$)。

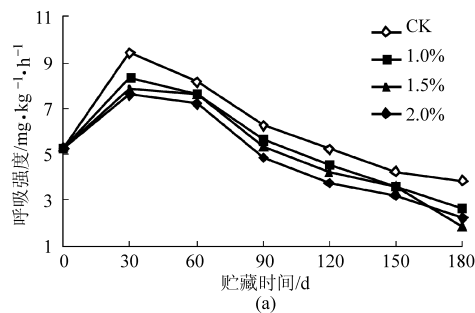
表1 虎皮病病情指数

Tab.1 Superficial scald intensity			%	
贮藏时间/d	壳聚糖质量分数/%			
	0	1.0	1.5	2.0
150	43.5	20.7	15.2	10.9
180	66.3	37.5	32.3	22.7

2.2 呼吸强度和乙烯释放量

由图1可以看出,处理组和对照组的呼吸强度和乙烯释放量均呈现先增大后减小的变化趋势,各组呼吸速率均在第30天达到高峰,乙烯释放量均在第60天达到高峰,壳聚糖涂膜处理没有改变果实的后熟衰老变化规律;但处理组呼吸速率和乙烯释放量在整个贮藏期内均显著低于对照组($P < 0.05$),说明壳聚糖涂膜处理显著降低了果实的呼吸速率和

乙烯生成量。随壳聚糖浓度增加,呼吸速率降低,但 3 个浓度间差异不显著($P > 0.05$)(图 1a);乙烯释放量随壳聚糖浓度的增加而下降,在整个贮藏期内,1.0% 壳聚糖处理组乙烯释放量显著高于其他两个处理组($P < 0.05$),但两个处理组间差异不显著($P > 0.05$)(图 1b)。



壳聚糖在果实表皮成膜后,由于对各种气体分子通透能力的不同而形成了微气调环境,阻止了外界空气中的 O_2 进入膜层内,同时限制了果实组织内 CO_2 的逸出而使其含量增加,从而抑制了果实呼吸代谢的强度; O_2 量的降低也限制了乙烯合成反应的进行,降低了乙烯的生物合成量^[8]。

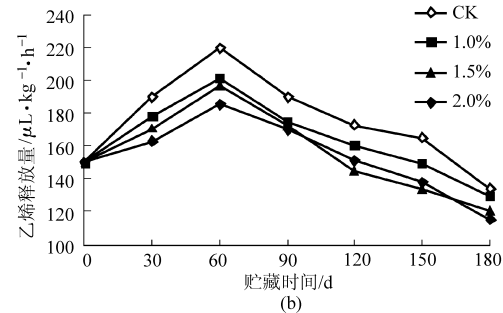
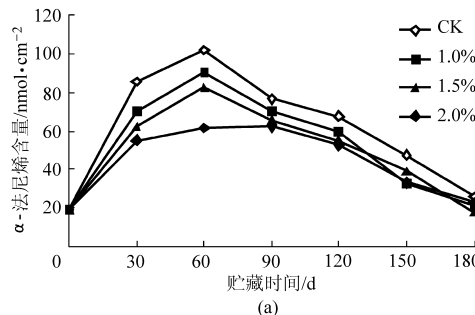


图 1 壳聚糖涂膜处理对贮藏苹果呼吸强度和乙烯释放量的影响

Fig.1 Effects of chitosan coating on respiration and ethylene production of apples during storage

2.3 α-法尼烯/共轭三烯含量

处理组与对照组的 α -法尼烯含量均呈先增大后减小的趋势,并在第 60 天达到高峰,对照组峰值显著高于各处理组,而随壳聚糖浓度增大,峰值显著降低($P < 0.05$);在整个贮藏期内,对照组 α -法尼烯含量显著高于各处理组,各处理组间差异不显著



($P > 0.05$)(图 2a)。处理组与对照组的共轭三烯含量均呈增大趋势,并在第 90 天后迅速增加,对照组显著高于各处理组($P < 0.05$),而随壳聚糖浓度增大,共轭三烯含量下降;在整个贮藏期内,1.0% 壳聚糖处理组共轭三烯含量显著高于其他两个处理组($P < 0.05$),但两个处理组间差异不显著($P > 0.05$)(图 2b)。

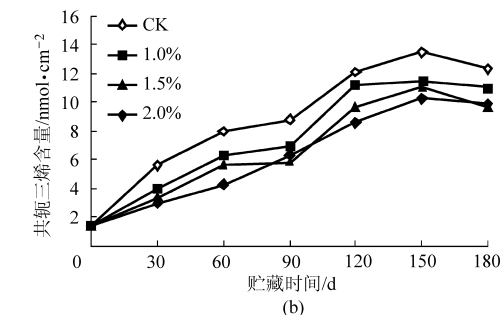


图 2 壳聚糖涂膜处理对贮藏苹果 α-法尼烯和共轭三烯含量的影响

Fig.2 Effects of chitosan coating on α-farnesene and conjugated trienols contents of apples during storage

有研究表明,乙烯可以通过调控 α -法尼烯合成基因的表达而影响 α -法尼烯的合成^[9]。本文中 α -法尼烯含量与乙烯释放量间存在显著正相关关系(图 3),说明壳聚糖涂膜处理通过限制乙烯的合成而降低了 α -法尼烯的生成量。无论 α -法尼烯和共轭三烯是否虎皮病发生的直接或间接因子,众多研究都表明,它们的含量和变化与虎皮病发生相关, α -法尼烯与共轭三烯含量的比值(RFC)可以作为虎皮病发生的预测指标^[10]。试验中处理组与对照组的 RFC 在 30 d 达到最大值后均一直降低,由此可以推断苹果果皮中 α -法尼烯生成量在减少或共轭三烯含量在增加;处理组间 RFC 无显著差异,但在第 30 ~ 90 天显著大于对照组,表明涂膜处理不仅可以抑制 α -法尼烯的生成,还可以抑制 α -法尼烯向共轭

三烯的氧化。 α -法尼烯主要存在于细胞膜的流动双分子层中,而表皮细胞中含有大量的线粒体,线粒体膜呼吸链电子传递过程中产生的活性氧可诱导 α -法尼烯的氧化。壳聚糖涂膜处理通过抑制果实呼吸代谢,降低了线粒体呼吸链电子传递效率,使自由基产生量减少而降低了对 α -法尼烯氧化的诱导作用。

2.4 MDA 含量和细胞膜透性

虎皮病症状的表现是果皮细胞中起“区域化”功能的膜系统遭破坏导致酚类物质与 PPO 接触而发生褐变反应的结果。MDA 含量和细胞膜透性是表示细胞膜完整性和功能的两个重要指标,它们随细胞膜的损伤而增加。由图 4 可以看出,随贮藏时间的延长,各组果实 MDA 含量和细胞膜透性均显著增大($P < 0.05$);在整个贮藏期内,处理组的

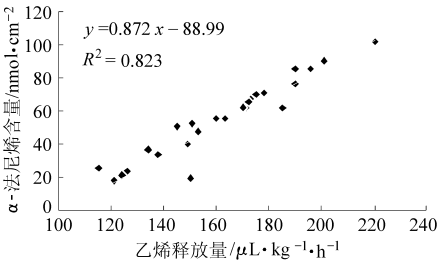


图 3 α-法尼烯含量与乙烯释放量间的关系
Fig. 3 Relationship between α-farnesene contents and ethylene production

MDA 含量和细胞膜透性均随壳聚糖浓度的增大而降低,且各处理组间差异显著,均显著低于对照组

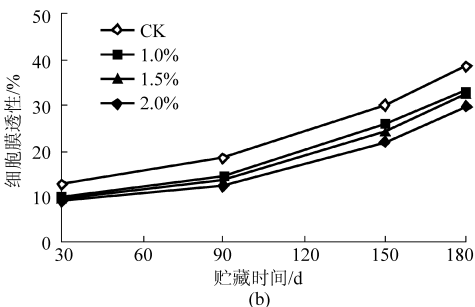
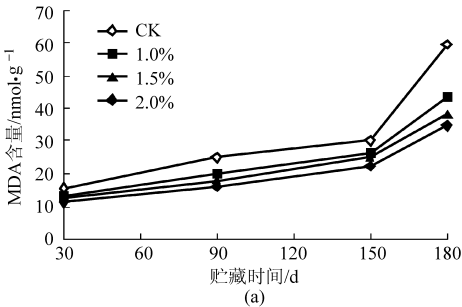


图 4 壳聚糖涂膜处理对贮藏苹果 MDA 含量和细胞膜透性的影响
Fig. 4 Effects of chitosan coating on MDA content and cell membrane permeability of apples during storage

2.5 PPO 活性

PPO 由一组铜蛋白复合酶组成,能在破坏或损坏的表面催化酚类化合物的氧化,产生褐色色素。由表 2 可以看出,处理组和对照组苹果在 0℃ 下贮藏 150 d 和 180 d 的 PPO 活性均处于较低水平,但在 20℃ 条件下放置 7 d 后,各组 PPO 活性都明显升高,对照组增幅最大,显著高于壳聚糖处理组 ($P < 0.05$);不同浓度壳聚糖处理组间差异显著 ($P < 0.05$),壳聚糖浓度越大,PPO 活性越低。

表 2 不同处理条件下的苹果 PPO 活性
Tab.2 PPO activities of apples under different treatments
U/(g·min)

贮藏时间/d	壳聚糖质量分数/%			
	0	1.0	1.5	2.0
150	7.06	6.89	5.23	5.69
150 + 7	14.23	10.29	9.88	8.99
180	6.03	5.72	5.16	5.01
180 + 7	15.73	12.65	11.23	10.58

膜结构的破坏除造成酚类物质的渗出外,还会使游离态 PPO 活性增强,二者的结合为酚类物质的酶促氧化创造了条件,从而引起组织褐变的发生;同时苹果从 0℃ 转移至 20℃ 环境后,适宜的酶促温度导致 PPO 活性的增加,加速了病变症状的出现。可

($P < 0.05$)。

壳聚糖涂膜处理在降低呼吸强度的同时改变了呼吸作用途径,使果实贮藏过程中糖酵解-三羧酸循环在总呼吸中所占的比例降低,磷酸戊糖途径所占比例升高,次生代谢产物积累。次生代谢产物以及渗入果实体内的壳聚糖分子上的氨基和羟基与细胞膜结合,既增加了膜结构的稳定性,同时又能去除果实衰老过程中产生的自由基和催熟的中间体对细胞膜的伤害^[11]。另外,低水平共轭三烯的积累也减弱了对细胞膜的伤害作用。因此,壳聚糖涂膜处理后的果实膜脂过氧化作用较弱,MDA 含量和细胞膜透性增加缓慢,病情指数较低。

以推测壳聚糖涂膜处理通过保护膜结构的完整性,在一定程度上抑制了 PPO 活性的增加,降低了病变程度。

3 讨论

不论 α-法尼烯及氧化产物共轭三烯对虎皮病的发生起直接或间接作用,共轭三烯的积累都是虎皮病发生的前提^[12];膜脂过氧化作用导致膜“区域化”功能丧失而使 PPO 和酚类物质结合发生氧化褐变反应,是虎皮病症状表现的必要条件^[13]。试验结果表明,壳聚糖涂膜处理后果实呼吸强度和乙烯的释放量下降,α-法尼烯生成量及氧化程度降低,膜脂的过氧化作用减弱,PPO 活性受到抑制,虎皮病病情指数低。胡小松^[1]利用“AU”涂被剂处理红星苹果,有效降低了 α-法尼烯生成及氧化;水茂兴^[11]用壳聚糖涂膜处理黄花梨,减弱了膜脂过氧化作用,延缓了果实衰老。由此说明,涂膜处理可以通过影响虎皮病发病相关生理因素而降低病变程度。

不同壳聚糖浓度处理间,除病情指数、MDA 含量、细胞膜透性和 PPO 活性有显著差异外,其他指标的差异性随壳聚糖浓度及贮藏时间的变化而不同。其原因可能是壳聚糖处理对各指标的影响有的表现为直接作用,有的表现为间接作用,同时这些作

用还会因为处理浓度及贮藏时间的变化而不同。研究表明,虎皮病的发生是受多因素影响、生理变化长期积累的过程^[2],虽然本文所研究各指标与虎皮病发生都有一定的相关性,但不同浓度壳聚糖处理对这些指标的作用规律以及是否还会影响与虎皮病发生相关的其他因素尚未明确,需要深入研究,以进一步确定壳聚糖涂膜处理防治虎皮病的作用机理,并确定最适宜的处理浓度。

4 结论

- (1)壳聚糖涂膜处理可以降低苹果虎皮病的发病程度。
- (2)壳聚糖涂膜处理通过抑制果实呼吸强度和乙烯释放,降低 α -法尼烯生成及氧化,减弱膜脂过氧化作用,抑制 PPO 活性而对虎皮病的发生起到防治作用。

参 考 文 献

- 1 胡小松,闫师杰,肖华志,等.“AU”涂被处理对红星苹果果皮 α -法尼烯和共轭三烯含量的影响[J]. 食品与发酵工业, 2005,31(9):100 ~ 102.
Hu Xiaosong, Yan Shijie, Xiao Huazhi, et al. Study on the effect of “AU” edible coating on the contents of α -farnesene and conjugated trienes in “Red Delicious ” apple [J]. Food and Fermentation Industries, 2005, 31 (9): 100 ~ 102. (in Chinese)
- 2 苑克俊,孙玉刚,张大鹏,等. 苹果贮藏期间发生虎皮病的生理生化基础及其防治[J]. 植物生理学通讯,2002,38(5): 505 ~ 510.
Yuan Kejun, Sun Yugang, Zhang Dapeng, et al. Physiological and biochemical bases of superficial scald development and its control in apple during storage [J]. Plant Physiology and Agriculture, 2002, 38(5): 505 ~ 510. (in Chinese)
- 3 Ju Zhiguo. Roles of phenolics, ethylene and fruit cuticle in scald development of apples (*Malus domestica* Borkh) [D]. Massachusetts: University of Massachusetts Amherst, 1997.
- 4 刘峥颖,吴广臣,王庭欣. 壳聚糖保鲜食品的机理及其应用的研究[J]. 食品科学,2005,26(8):533 ~ 537.
Liu Zhenghao, Wu Guangchen, Wang Tingxin. Mechanism and the application of chitosan preserving food [J]. Food Science, 2005, 26(8): 533 ~ 537. (in Chinese)
- 5 Anet E F L J. Superficial scald, a functional disorder of stored apples, IX. effect of maturity and ventilation[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1972, 23(6): 763 ~ 769.
- 6 熊庆娥. 植物生理学实验教程[M]. 成都:四川科学技术出版社,2003.
- 7 Jiang Yueming. Role of anthocyanins, polyphenol oxidase and phenols in lychee pericarp browning [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000, 80(3): 305 ~ 310.
- 8 辛颖,陈复生,杨宏顺. 壳聚糖涂膜对果蔬质地影响的研究进展[J]. 食品科技,2009,34(12):283 ~ 286.
Xin Ying, Chen Fusheng, Yang Hongshun. Research and advances on the effect of chitosan coating on texture of post-harvest fruits and vegetables [J]. Food Science and Technology, 2009, 34(12): 283 ~ 286. (in Chinese)
- 9 Ju Zhiguo, Eric A C. Evidence that α -farnesene biosynthesis during fruit ripening is mediated by ethylene regulated gene expression in apples [J]. Postharvest Biology and Technology, 2000, 19(1): 9 ~ 16.
- 10 张元湖. 苹果虎皮病的致病机理及预测研究[D]. 泰安:山东农业大学,1996.
- 11 水茂兴,马国瑞,陈美慈,等. 壳聚糖对采后黄花梨果实膜脂过氧化和乙烯生成的影响[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2001,27(5):541 ~ 545.
Shui Maoxing, Ma Guorui, Chen Meici, et al. Effects of chitosan coating on cell membrane oxidation and ethylene production in Huanghua pear fruit (*Pyrus pyrifolia* var.) [J]. Journal of Zhejiang University: Agric. & Life Sci. , 2001, 27(5): 541 ~ 545. (in Chinese)
- 12 Isidoro N, Almeida D P F. α -Farnesene, conjugated trienols, and superficial scald in ‘Rocha’ pear as affected by 1-methylcyclopropene and diphenylamine [J]. Postharvest Biology and Technology, 2006, 42(1): 49 ~ 56.
- 13 赵晨霞,胡小松. 膜伤害与红星苹果虎皮病的相关性[J]. 中国农业大学学报,1998,3(5):35 ~ 38.
Zhao Chenxia, Hu Xiaosong. Relations of the damage of membrane with superficial scald of apple [J]. Journal of China Agricultural University, 1998, 3(5): 35 ~ 38. (in Chinese)