

# 冷激预处理减轻鲜切火龙果褐变的作用及机理

李冰茹, 李美琪, 李皎琪, 王济瀚, 李晓安\*, 李富军, 张新华\*  
(山东理工大学农业工程与食品科学学院, 山东 淄博 255049)

**摘要:** 为研究冷激预处理减轻鲜切火龙果果肉褐变的作用及其机理, 分析冷激条件(-2℃冷空气处理3 h)对鲜切火龙果果肉在贮藏期间苯丙烷代谢和抗氧化系统的影响。结果表明, 冷激预处理能抑制电导率、丙二醛含量的增加, 提高苯丙烷代谢关键酶(苯丙氨酸解氨酶、肉桂酸-4-羟化酶、4-香豆酸辅酶A连接酶)活性及相关基因表达, 促进鲜切火龙果总酚、总黄酮及大部分酚类化合物的积累, 增强其抗氧化能力。此外, 冷激可提高超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、抗坏血酸过氧化物酶活性, 加速火龙果贮藏初期超氧阴离子自由基、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>高峰的出现, 但对峰值没有显著影响, 同时促进其在贮藏中后期水平的下降, 从而有效减轻鲜切火龙果果肉的褐变。综上, 冷激预处理可通过调控苯丙烷途径和活性氧代谢, 有效缓解胁迫引起的氧化过程, 抑制鲜切火龙果果肉的褐变。

**关键词:** 鲜切火龙果; 褐变; 冷激; 苯丙烷途径; 活性氧代谢

## Alleviating Effect and Mechanism of Cold Shock Pretreatment on Browning of Fresh-Cut Pitaya Fruit

LI Bingru, LI Meiqi, LI Jiaoqi, WANG Jihan, LI Xiao'an\*, LI Fujun, ZHANG Xinhua\*  
(College of Agricultural Engineering and Food Science, Shandong University of Technology, Zibo 255049, China)

**Abstract:** The alleviating effect and mechanism of cold shock pretreatment (-2℃ cold air for 3 h) on flesh browning in fresh-cut pitaya fruit was explored by evaluating its effect on the phenylpropanoid pathway and antioxidant system during storage. Results revealed that cold shock pretreatment efficiently inhibited the increase in electrical conductivity and malondialdehyde (MDA) content compared with the control. Cold shock pretreatment promoted the gene expression and activities of key enzymes (phenylalanine ammonia lyase, cinnamic acid 4-hydroxylase, and 4-coumarate-CoA ligase) related to phenylpropane biosynthesis, and improved the accumulation of total phenolics and flavonoids, as well as most individual phenolic compounds, which led to enhanced antioxidant capacity. The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) were increased by cold shock pretreatment. In addition, cold shock pretreatment accelerated the production of superoxide anion and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at the early stage of storage, but had no effect on their peaks and led to lower levels of superoxide anion and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> afterwards, alleviating flesh browning in fresh-cut pitaya fruit. These results indicated that cold shock pretreatment can effectively alleviate wound-induced oxidative stress by modulating the phenylpropanoid pathway and reactive oxygen species (ROS) metabolism, thus inhibiting flesh browning in fresh-cut pitaya fruit.

**Keywords:** fresh-cut pitaya fruit; browning; cold shock pretreatment; phenylpropane pathway; reactive oxygen species metabolism

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220909-082

中图分类号: TS255.36

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)13-0097-08

引文格式:

李冰茹, 李美琪, 李皎琪, 等. 冷激预处理减轻鲜切火龙果褐变的作用及机理[J]. 食品科学, 2023, 44(13): 97-104.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220909-082. <http://www.spkx.net.cn>

LI Bingru, LI Meiqi, LI Jiaoqi, et al. Alleviating effect and mechanism of cold shock pretreatment on browning of fresh-cut pitaya fruit[J]. Food Science, 2023, 44(13): 97-104. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220909-082. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-09-09

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31901747)

第一作者简介: 李冰茹(1998—)(ORCID: 0000-0002-1277-8827), 女, 硕士研究生, 研究方向为果蔬采后生理与贮藏保鲜。

E-mail: libingru1021@163.com

\*通信作者简介: 李晓安(1990—)(ORCID: 0000-0003-1916-311X), 女, 博士, 研究方向为果蔬采后生理与贮藏保鲜。

E-mail: lixa@sdut.edu.cn

张新华(1976—)(ORCID: 0000-0003-4963-7443), 女, 教授, 博士, 研究方向为果蔬采后生理与贮藏保鲜。

E-mail: zxh@sdut.edu.cn

火龙果 (*Hylocereus undatus*) 因其外观奇特、口感清甜、富含膳食纤维、酚类物质和甜菜苷等营养物质, 且具有抗氧化、抗糖尿病、预防心脑血管疾病或癌症等功效而广受欢迎<sup>[1-2]</sup>。前期研究发现, 切割处理可诱导鲜切火龙果中酚类物质的积累, 提高其在一定贮藏期内的抗氧化能力, 而鲜切处理可激活果蔬自身的防御反应, 通过调节其应答机制生成酚类物质等次生代谢产物, 防御和修复机械伤害<sup>[3-4]</sup>。但由于果蔬鲜切处理会引发汁液流出、呼吸增强、组织褐变、微生物生长等现象, 加速品质下降。因此, 开发减轻鲜切产品品质劣变的方法是一个迫切需要解决的问题。目前, 鲜切果蔬的保鲜主要有化学法(保鲜剂、可食性涂膜、植物内源活性物质等)、物理法(低温、气调、热处理、非热杀菌等)及生物法(拮抗菌)等<sup>[5-6]</sup>。

冷激是指将果蔬置于不会造成冷害的低温条件下进行短时间处理的一种物理方法, 常用的有空气冷激和冰水混合物冷激<sup>[7]</sup>。有研究表明, 冷激处理可以减缓黄瓜的黄变, 降低黄瓜腐烂率<sup>[8]</sup>、保持甜樱桃的花青素含量<sup>[9]</sup>、抑制西葫芦叶绿素含量降低和红度( $a^*$ 值)、黄度( $b^*$ 值)的升高<sup>[10]</sup>。冷激处理可通过降低膜脂过氧化程度和细胞膜通透性、提高抗氧化能力提高木瓜<sup>[11]</sup>、桃<sup>[12]</sup>和茄子<sup>[13]</sup>果实的抗冷性, 减轻果实在低温贮藏期间的品质劣变。刘洪竹等<sup>[14]</sup>使用0℃冰水处理鲜切甘蓝、洋葱和胡萝卜以增加它们的抗氧化酶活性, 保持鲜切果蔬的品质。唐文等<sup>[15]</sup>发现用-18℃冷空气处理鲜切青椒可保持其品质和抗坏血酸含量, 延长鲜切青椒的贮藏期。本实验主要从研究冷激预处理对鲜切果蔬品质影响的机理入手, 旨在为鲜切火龙果的品质保持提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

供试白肉火龙果‘莞华白’(*Hylocereus undatus* cv. Guanhuabai) 购自山东博发农副产品综合批发市场, 选择大小和颜色均匀、无机械伤的果实备用。

福林-酚 上海源叶生物科技有限公司; 甲醇 烟台市远东精细化工有限公司; 磷酸二氢钾、磷酸氢二钾 天津市双船化学试剂厂; 1,1-二苯基苦基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、抗坏血酸 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; Tris 生工生物工程(上海)股份有限公司; 反转录试剂盒RR036A PrimeScript™ RT Master Mix、实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 试剂盒RR420B TB Green® Premix Ex Taq™ 日本Takara公司。

### 1.2 仪器与设备

CR400色差仪 日本柯尼卡-美能达公司; DDS-307A电导率仪 上海光学仪器厂; Sorvall ST 16R高速冷冻离心机 美国赛默飞世尔科技有限公司; UV-2102PCS紫外分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; 1260高效液相色谱仪 美国安捷伦公司; FQD-96A实时荧光定量PCR检测系统 杭州博日科技有限责任公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 原料处理

将挑选好的白肉火龙果随机分为两组, 每组90个果实, 分别在相对湿度90%的恒温箱中使用(-2.0±0.5)℃冷空气(冷激组)、(20.0±0.5)℃空气(对照组)处理3h后, 将两组果实置于20℃条件下贮存3h, 再用质量分数0.02%次氯酸钠溶液浸泡2min, 无菌水冲洗后晾干表面水分。根据Li Xiao'an等<sup>[4]</sup>的方法去除果皮, 将其切成厚度为1cm的1/4片状, 分别放置于无菌聚丙烯保鲜盒(16cm×11cm×5cm)内, 每盒10片, 质量约200g, 于(20±1)℃、相对湿度85%~90%条件下贮藏, 并分别于0、6、12、24、36、48h取样测定, 每次取样6盒, 其中3盒用于拍照、测定果肉颜色, 其余样品液氮速冻后于-80℃保存用于其他指标测定。每组处理取3次数据的平均值。

#### 1.3.2 果肉颜色测定

鲜切火龙果的果肉颜色使用色差仪进行测定, 记录亮度( $L^*$ )、红绿度( $a^*$ )、黄蓝度( $b^*$ )值, 参照Coklar等<sup>[16]</sup>的方法, 按式(1)、(2)计算褐变指数(browning index, BI)。

$$BI = \frac{100 \times (x - 0.31)}{0.17} \quad (1)$$

$$x = \frac{a^* + 1.75 \times L^*}{5.645 \times L^* + a^* - 3.012 \times b^*} \quad (2)$$

#### 1.3.3 电导率及丙二醛含量测定

电导率(electrical conductivity, EC)的测定参照Luo Zisheng等<sup>[17]</sup>的方法。使用打孔器从火龙果切片上获取圆片(厚度1mm、直径10mm)10片, 置于25mL蒸馏水中浸泡60min, 使用电导率仪测定初始EC并记为 $C_1$ /(S/cm), 沸水浴5min并冷却至室温后, 再次测定EC并记为 $C_2$ /(S/cm)。相对电导率结果表示为 $C_1/C_2 \times 100\%$ 。

丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的测定参照Min Dedong等<sup>[18]</sup>的方法。称取2g冻样用5mL 10g/100mL三氯乙酸溶液研磨后离心。取相同体积的上清液与0.6g/100mL硫代巴比妥酸溶液混匀, 沸水浴15min后立即置于冰上冷却。用紫外分光光度计测定反应体系在600、532nm和450nm波长处吸光度。MDA含量单位为mmol/kg。

#### 1.3.4 总酚及总黄酮含量的测定

称取2g冻样充分研磨后用5mL甲醇在4℃下避光

抽提24 h, 离心后取上清液用于测定总酚和总黄酮含量。总酚含量的测定参照Swain等<sup>[19]</sup>的方法, 记录765 nm波长处吸光度的变化, 以没食子酸为标准品绘制标准曲线, 根据标准曲线方程计算总酚含量, 单位为g/kg。总黄酮含量的测定参照Chang等<sup>[20]</sup>的方法, 测定430 nm波长处吸光度的变化, 以芦丁为标准品绘制标准曲线, 根据标准曲线方程计算总黄酮含量, 单位为g/kg。

### 1.3.5 抗氧化能力的测定

通过DPPH自由基和羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )清除能力反映抗氧化能力。DPPH自由基清除能力的测定参照Brand-Williams等<sup>[21]</sup>的方法, 样品的提取方法与总酚相同。上清液(0.15 mL)与120  $\mu\text{mol/L}$  DPPH溶液(1.85 mL)混匀后于25  $^{\circ}\text{C}$ 避光反应15 min, 以甲醇代替上清液的反应体系作为对照, 记录515 nm波长处吸光度的变化, 按式(3)计算DPPH自由基清除能力。

$$\text{DPPH自由基清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100 \quad (3)$$

式中:  $A_1$ 为0.15 mL上清液与1.85 mL DPPH反应后吸光度;  $A_2$ 为0.15 mL上清液与1.85 mL甲醇反应后吸光度;  $A_3$ 为0.15 mL甲醇与1.85 mL DPPH溶液反应后吸光度。

$\cdot\text{OH}$ 清除能力的测定参照Richmond等<sup>[22]</sup>的方法, 称取2 g冻样加入5 mL体积分数70%乙醇溶液研磨, 离心后取1.0 mL上清液与2.0 mL 18 mmol/L硫酸亚铁溶液、0.2 mL 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、1.3 mL 18 mmol/L水杨酸溶液混合均匀后, 于37  $^{\circ}\text{C}$ 反应25 min, 测定510 nm波长处吸光度的变化, 以70%乙醇溶液代替上清液的反应体系作为对照。按式(4)计算 $\cdot\text{OH}$ 清除能力。

$$\cdot\text{OH清除率}/\% = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \quad (4)$$

式中:  $A_1$ 为对照组吸光度;  $A_2$ 为实验组吸光度。

### 1.3.6 主要酚类化合物含量的测定

参照Surjadinata等<sup>[23]</sup>的方法。称取5 g冻样, 使用20 mL甲醇研磨, 离心后取上清液利用旋转蒸发仪在35  $^{\circ}\text{C}$ 条件下浓缩至5 mL, 利用活化的Waters  $\text{C}_{18}$  Sep-pak萃取小柱将浓缩后的上清液进行固相萃取。萃取纯化后的样品经过0.45  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤后使用高效液相色谱仪进行分析。色谱柱为反向 $\text{C}_{18}$ 柱(6 mm $\times$ 150 mm), 柱温38  $^{\circ}\text{C}$ ; 流动相A为盐酸(pH 2.3), 流动相B为乙腈; 梯度洗脱程序: 0 min 10% B, 25 min 15% B, 40 min 20% B, 45 min 25% B, 50 min 85% B, 55 min 10% B; 流速0.6 mL/min; 进样量20  $\mu\text{L}$ ; 检测波长280 nm。根据各标准品的保留时间和标准曲线方程进行定性和定量分析, 酚类化合物含量单位为mg/kg。

### 1.3.7 苯丙烷代谢关键酶活力测定及基因表达水平分析

参考Li Xiao'an等<sup>[24]</sup>的方法测定苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL)、肉桂酸-4-羟化酶

(cinnamate-4-hydroxylase, C4H)、4-香豆酸辅酶A连接酶(4-coumarate coenzyme A ligase, 4CL)活力。称取2 g冻样分别用5 mL不同缓冲液进行研磨提取。PAL活力测定所用提取液为含2 mmol/L乙二胺四乙酸、5 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇、40 g/L聚乙烯吡咯烷酮的硼酸缓冲液(0.1 mol/L、pH 8.7)。C4H所用提取液为含15 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇、5 mmol/L抗坏血酸、4 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ 、1 mmol/L苯甲基磺酰氟、10  $\mu\text{mol/L}$ 亮异酶肽的Tris-HCl缓冲液(50 mmol/L、pH 8.9)。4CL所用提取液为含5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ 、5 mmol/L ATP、0.6 mmol/L *p*-香豆酸、0.4 mmol/L辅酶A的Tris-HCl缓冲液(50 mmol/L、pH 8.0)。可溶性蛋白质含量的测定参照Bradford等<sup>[25]</sup>的方法, 以牛血清白蛋白为标准品, 根据标准曲线方程计算结果。PAL、C4H、4CL活力均以蛋白质量计, 单位为U/mg。

根据前期研究<sup>[26]</sup>, 选取火龙果中胁迫反应较强的3个苯丙烷代谢关键基因*HuPAL* (HU06G02082.1)、*HuC4H* (HU02G01415.1)、*Hu4CL* (HU04G01601.1)进行qPCR分析。根据火龙果基因组数据库(<http://www.pitayagenomic.com/>)中的基因序列设计引物(表1)。参考Chang Shujun等<sup>[27]</sup>的方法提取鲜切火龙果总RNA, 使用反转录试剂盒PrimeScript<sup>TM</sup> RT Master Mix合成cDNA。使用qPCR试剂盒TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup>并按照其说明书操作, 利用qPCR仪进行检测, 以*HuUBQ* (HU04G01722.1)为内参基因, 按照 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算基因的相对表达量。

表1 qPCR引物序列

Table 1 Primer sequences used for qPCR analysis			
基因名称	基因号	上游引物序列(5'-3')	下游引物序列(5'-3')
<i>HuPAL</i>	HU06G02082.1	AAGGAACCTCGGCTATCCCG	ACTCCTCCCCAGGAGACTTC
<i>HuC4H</i>	HU02G01415.1	AAGTTGAAGCTCCCACCAGG	CTGGCCATCCTAAGCAACA
<i>Hu4CL</i>	HU04G01601.1	TCTTCAAATCACGCCTCCCG	GTTGGAGATGAGACAGGGGC
<i>HuUBQ</i>	HU04G01722.1	TGAATCATCCGACACCAAT	TCTTCTTAGCACCACC

### 1.3.8 超氧阴离子自由基产生速率及 $\text{H}_2\text{O}_2$ 含量的测定

称取2 g冻样加入5 mL 0.1 mol/L pH 7.8磷酸缓冲液研磨, 离心后取上清液, 参照Elstner等<sup>[28]</sup>的方法测定超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )产生速率, 记录530 nm波长处吸光度的变化, 以亚硝酸钾为标准品, 根据标准曲线方程计算 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率, 单位为 $\mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{s})$ 。

称取冻样2 g加入5 mL冷丙酮研磨, 离心后取上清液, 参照Patterson等<sup>[29]</sup>的方法测定 $\text{H}_2\text{O}_2$ 含量。单位为mmol/kg。

### 1.3.9 抗氧化酶活力的测定

称取2 g冻样加入5 mL 50 mmol/L pH 7.0磷酸缓冲液研磨, 离心后取上清液, 参照Zeng Kaifang等<sup>[30]</sup>的方法测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、抗坏血酸过氧化物酶

(ascorbate peroxidase, APX) 活力。SOD以抑制50%的氮蓝四唑光还原反应时所需的酶量作为一个酶活力单位。CAT以每分钟还原1  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 所需的酶量作为一个酶活力单位。APX以每分钟氧化1  $\mu\text{mol}$  抗坏血酸所需的酶量作为一个酶活力单位。结果均以蛋白质质量计, 单位为U/mg。

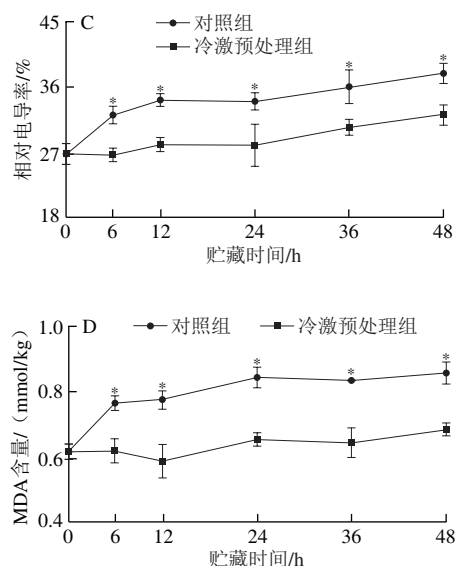
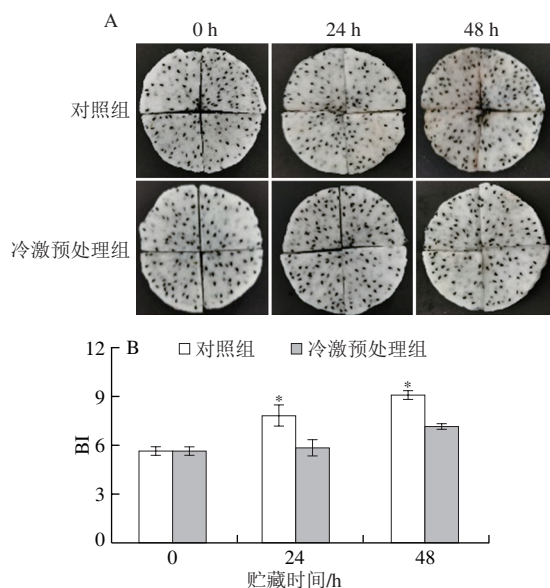
#### 1.4 数据处理与分析

实验采用完全随机设计, 每个处理重复3次, 结果表示为平均值 $\pm$ 标准差。使用SPSS 19.0软件采用邓肯多重检验的单因素方差分析检验结果的差异显著性,  $P < 0.05$ 时认为有显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 冷激预处理对鲜切火龙果表面颜色、褐变程度、电导率及丙二醛含量的影响

图1A为鲜切火龙果在20  $^{\circ}\text{C}$ 贮藏48 h期间表面颜色外观图像, 对照组鲜切火龙果的褐变程度随着贮藏时间的延长而增加, 冷激预处理显著抑制了褐变程度的增加, 贮藏48 h时这种抑制效果更为显著。如图1B所示, 对照组和冷激预处理组的鲜切火龙果BI均逐渐上升, 冷激预处理组BI在贮藏过程中均显著低于对照组, 说明冷激预处理能够有效抑制鲜切火龙果的褐变。EC与果蔬细胞膜通透性的变化密切相关, 反映了细胞膜损伤的程度。MDA是膜脂过氧化作用的主要产物之一, 其含量反映了细胞膜脂过氧化的程度。由图1C、D可知, 对照组鲜切火龙果的相对电导率和MDA含量在贮藏期间均呈现逐渐增长趋势, 冷激预处理显著抑制了胁迫诱导的相对电导率和MDA含量的增加。贮藏48 h后, 冷激预处理组鲜切火龙果的相对电导率比对照组低16.45%, MDA含量比对照组低20.11%。表明冷激预处理能够抑制细胞膜脂过氧化作用, 减轻鲜切火龙果细胞膜的损伤程度。



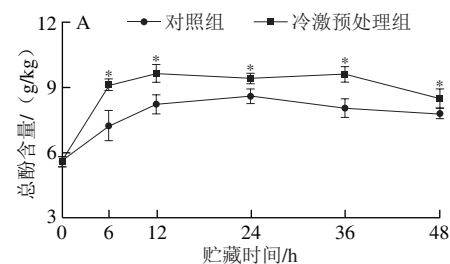
\*.相同时间组间差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。

图1 冷激预处理对鲜切火龙果20  $^{\circ}\text{C}$ 贮藏48 h期间表面颜色 (A)、BI (B)、EC (C)、MDA含量 (D) 的影响

Fig. 1 Effect of cold shock pretreatment on surface color (A), BI (B), EC (C) and MDA content (D) of fresh-cut pitaya fruit stored at 20  $^{\circ}\text{C}$  for up to 48 h

### 2.2 冷激预处理对鲜切火龙果总酚、总黄酮含量及抗氧化能力的影响

酚类物质作为果蔬中重要的次生代谢产物, 在防御和修复机械伤害、清除活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、增强抗氧化能力方面发挥重要作用, 酚类物质的合成是果蔬胁迫应答反应的普遍现象<sup>[4]</sup>。如图2A、B所示, 鲜切火龙果中总酚和总黄酮含量均呈先上升后下降的趋势, 冷激预处理显著提高了总酚和总黄酮含量。贮藏48 h时冷激预处理组的总酚含量比对照组高9.04%, 总黄酮含量比对照组高10.02%。DPPH自由基清除能力和 $\cdot\text{OH}$ 清除能力是表征果蔬抗氧化能力的重要指标。如图2C、D所示, 对照组鲜切火龙果DPPH自由基和 $\cdot\text{OH}$ 清除能力先随贮藏时间的延长而逐渐升高, 在24 h达到峰值后缓慢下降。冷激预处理显著提高了DPPH自由基和 $\cdot\text{OH}$ 清除能力, 在48 h时冷激预处理组的DPPH自由基清除能力比对照组高11.05%,  $\cdot\text{OH}$ 清除能力比对照组高14.48%。综上, 冷激预处理有效促进了鲜切火龙果酚类物质的积累, 增强了鲜切火龙果的抗氧化能力。



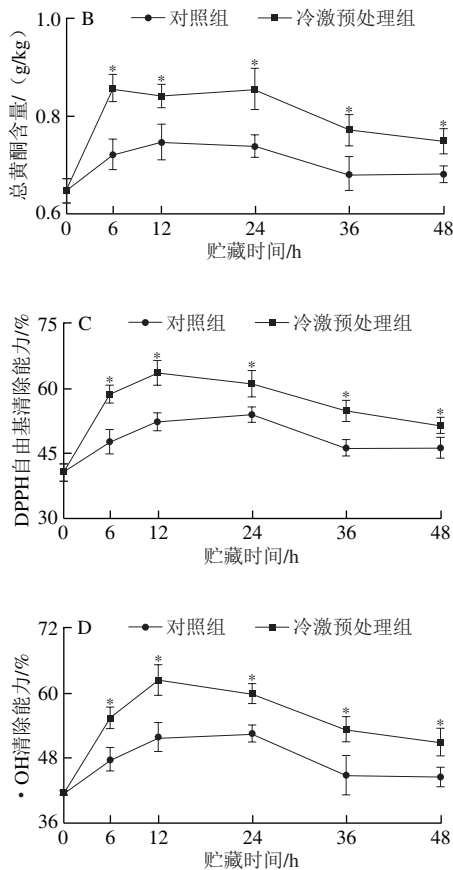
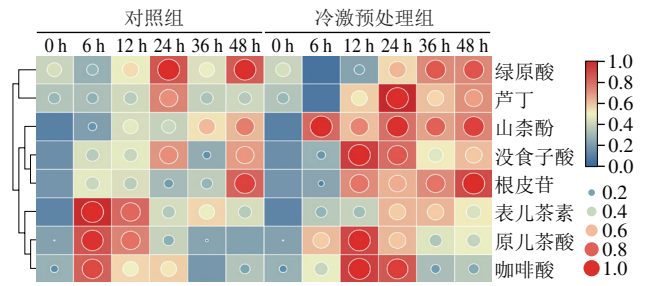


图2 冷激预处理对鲜切火龙果20℃贮藏48 h期间总酚含量(A)、总黄酮含量(B)、DPPH自由基清除能力(C)、·OH清除能力(D)的影响  
Fig. 2 Effect of cold shock pretreatment on the contents of total phenolics (A) and total flavonoids (B), and DPPH (C) and hydroxyl (D) radical scavenging capacity in fresh-cut pitaya fruit stored at 20 °C for up to 48 h

### 2.3 冷激预处理对鲜切火龙果主要酚类化合物的影响

酚类物质是含有苯酚基本结构的一类化合物,含有多个酚羟基,其中酚酸类、黄酮类及花色苷类等是果蔬中常见的酚类物质,与果蔬的营养价值、抗氧化活性等密切相关。如图3所示,鲜切火龙果中共检测到4种酚酸(没食子酸、原儿茶酸、咖啡酸、绿原酸)和4种黄酮类化合物(根皮苷、芦丁、山柰酚、表儿茶素)。火龙果中主要酚类物质种类和含量会因品种、生长环境等的不同而存在差异,本研究中测得的主要酚类化合物种类与前人的研究结果<sup>[31-32]</sup>类似,而含量略有不同。对照组中原儿茶酸、咖啡酸含量在贮藏前期逐渐上升,在不同贮藏时间达到最大值后呈下降趋势,没食子酸、绿原酸含量随贮藏时间的延长呈波动增长的趋势。冷激预处理促进了没食子酸、原儿茶酸和咖啡酸含量的积累,提高了其在贮藏期间的水平,延缓了绿原酸含量的增加。对照组中根皮苷和山柰酚含量整体呈上升趋势,芦丁和表儿茶素含量随贮藏时间的延长先增加后下降。冷激预处理促进了根皮苷、山柰酚、芦丁含量在贮藏期间的积累,延缓了表儿茶素含量的增加。



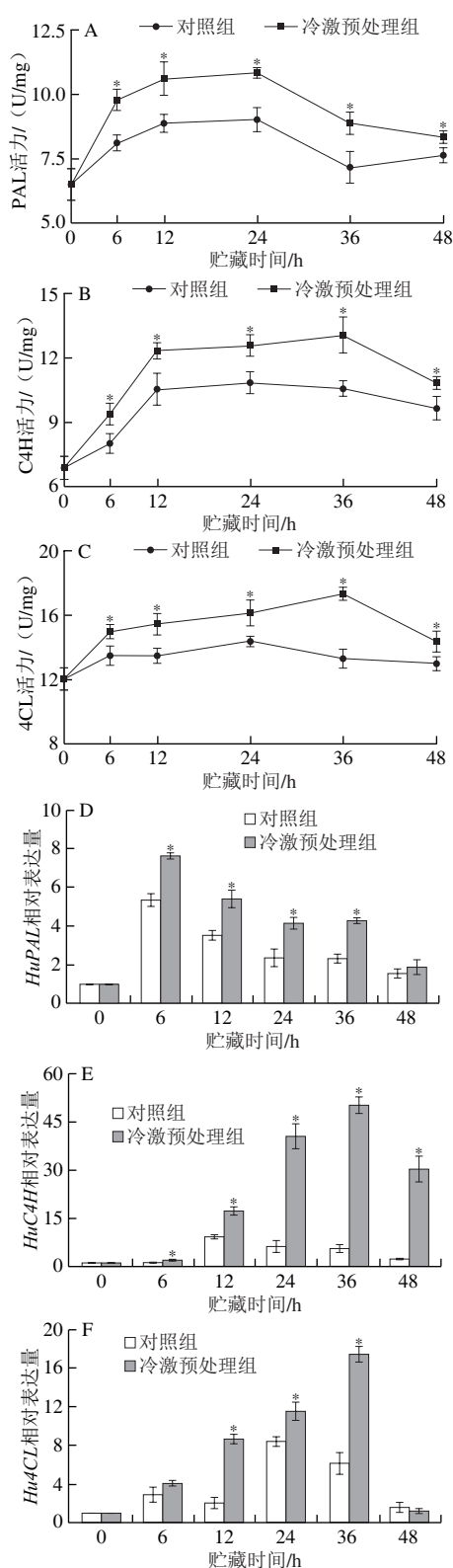
标准化值以与检测到的酚类化合物含量成比例的色标表示;每一个带有圆圈的正方形表示酚类化合物的相对含量。

图3 冷激预处理对鲜切火龙果20℃贮藏48 h期间主要酚类化合物含量的影响

Fig. 3 Effect of cold shock pretreatment on phenolic compound contents in fresh-cut pitaya fruit stored at 20 °C for up to 48 h

### 2.4 冷激预处理对鲜切火龙果苯丙烷代谢关键酶活性及其基因相对表达量的影响

苯丙烷代谢途径是酚类物质合成的重要途径, PAL、C4H、4CL作为苯丙烷代谢途径的关键酶直接参与酚类物质的合成,在果蔬逆境胁迫防御反应中发挥重要作用。在L-苯丙氨酸进入苯丙烷代谢后,经PAL催化转化为反式肉桂酸, C4H催化反式肉桂酸对位点发生位置特异性的羟基化反应,生成p-香豆酸, 4CL将p-香豆酸转化为p-香豆酰辅酶A,进而转化为其他下游酚类物质<sup>[33]</sup>。如图4A~C所示,随贮藏时间的延长,各组鲜切火龙果中的PAL、C4H、4CL活力均先上升后下降。冷激预处理显著提高了这3种酶活力,48 h时冷激预处理组的PAL、C4H、4CL活力分别比对照组高9.16%、12.34%和10.63%。基因表达结果显示,两组鲜切火龙果HuPAL表达量均被胁迫显著诱导,并于6 h时达到峰值,之后随着贮藏时间的延长逐渐降低。冷激预处理进一步提高了HuPAL的表达量,并在整个贮藏过程中保持较高水平(图4D)。两组鲜切火龙果HuC4H表达量均随贮藏时间的延长呈先增加后下降的趋势,对照组HuC4H表达量在12 h时达到最大值,冷激组HuC4H表达量在36 h时达到最大值,且冷激预处理显著促进了HuC4H表达量的上升并抑制其下降,极大提高了HuC4H的表达水平(图4E)。两组鲜切火龙果的Hu4CL表达量在贮藏期间也呈先上升后下降的趋势,对照组在24 h时达到峰值,冷激组在36 h时达到峰值,与对照组相比,冷激预处理显著提高了鲜切火龙果前36 h Hu4CL的表达量,然后其表达量迅速下降,在48 h时与对照组无显著差异(图4F)。综上,冷激预处理可以诱导提高苯丙烷代谢途径关键酶的活力和关键基因表达,从而促进鲜切火龙果中酚类物质的合成。



A~C. 分别为PAL、C4H、4CL活力；D~F. 分别为HuPAL、HuC4H、Hu4CL相对表达量。

图4 冷激预处理对鲜切火龙果20 °C贮藏48 h期间苯丙烷代谢途径关键酶活力及其基因相对表达量的影响

Fig. 4 Effect of cold shock pretreatment on the activities and relative gene expression of key enzymes in the phenylpropanoid pathway in fresh-cut pitaya fruit stored 20 °C for up to 48 h

## 2.5 冷激预处理对鲜切火龙果 $O_2^- \cdot$ 产生速率及 $H_2O_2$ 含量的影响

ROS积累是果蔬受到胁迫后最显著的反应之一，研究发现，ROS可作为信号分子在胁迫诱导的胡萝卜和火龙果酚类物质合成积累中发挥重要作用<sup>[34-35]</sup>。但过量的ROS积累会导致膜脂过氧化，造成果蔬氧化损伤。如图5所示，对照组鲜切火龙果 $O_2^- \cdot$ 产生速率在贮藏前期增长较快并在12 h达到峰值，随后缓慢下降。冷激预处理加速了 $O_2^- \cdot$ 产生高峰的出现（6 h达到峰值），但对峰值影响不大，随后加速了 $O_2^- \cdot$ 产生速率的下降，12 h后冷激预处理组 $O_2^- \cdot$ 产生速率均显著低于对照组。贮藏期间两组鲜切火龙果 $H_2O_2$ 含量均呈先上升后下降的趋势，对照组在24 h达到峰值，冷激预处理加速了 $H_2O_2$ 含量高峰的出现（6 h达到峰值），但对峰值影响不大，随后促进了 $H_2O_2$ 含量的下降，24 h后下降至低于对照组水平。48 h时冷激预处理组 $O_2^- \cdot$ 产生速率和 $H_2O_2$ 含量分别比对照组低11.94%和17.20%。这些结果表明，冷激预处理加速了鲜切火龙果贮藏初期ROS的积累，也促进了贮藏中后期ROS水平的下降。

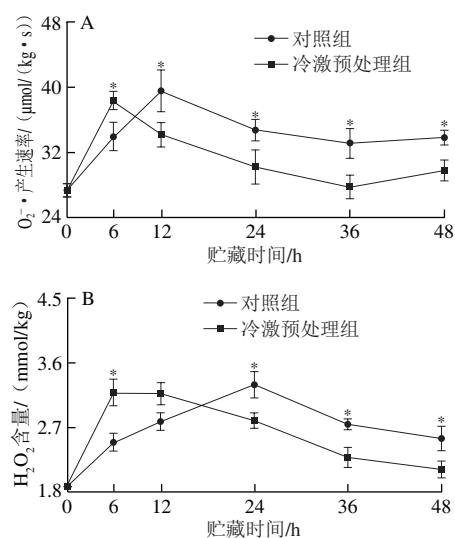


图5 冷激预处理对鲜切火龙果20 °C贮藏48 h期间 $O_2^- \cdot$ 产生速率(A)、 $H_2O_2$ 含量(B)的影响

Fig. 5 Effect of cold shock pretreatment on superoxide anion production rate (A) and  $H_2O_2$  content (B) in fresh-cut pitaya fruit stored 20 °C for up to 48 h

## 2.6 冷激预处理对鲜切火龙果抗氧化酶活力的影响

SOD、CAT、APX是果蔬体内ROS清除酶促防御系统中的重要酶，SOD能通过歧化反应将 $O_2^- \cdot$ 转化为 $H_2O_2$ 和 $O_2$ ，从而清除 $O_2^- \cdot$ ， $H_2O_2$ 可被CAT催化分解为 $H_2O$ 和 $O_2$ ，降低 $H_2O_2$ 对果蔬造成的氧化损伤。 $H_2O_2$ 还可通过APX的催化被抗坏血酸还原清除<sup>[13]</sup>。如图6所示，鲜切处理提高了两组鲜切火龙果SOD、CAT、APX活力，冷激预处理组3种酶活力在贮藏期间始终高于对照组。

在48 h时冷激预处理组SOD、CAT、APX活力分别比对照组高14.87%、11.85%和14.88%。这些结果表明冷激预处理能够通过提高鲜切火龙果SOD、CAT、APX活力促进 $O_2 \cdot$ 和 $H_2O_2$ 的清除,减轻ROS对鲜切火龙果造成的氧化损伤和组织褐变。

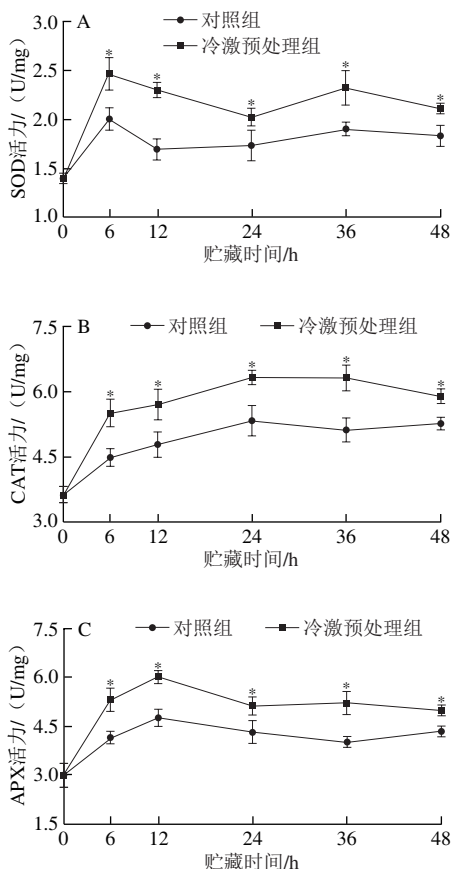


图6 冷激预处理对鲜切火龙果20℃贮藏48h期间SOD (A)、CAT (B)、APX (C) 活力的影响

Fig. 6 Effect of cold shock pretreatment on the activities of SOD (A), CAT (B) and APX (C) in fresh-cut pitaya fruit stored 20 °C for up to 48 h

### 3 结论

冷激(-2℃冷空气、3h)预处理通过上调苯丙烷代谢关键酶PAL、C4H、4CL活力及其相关基因的表达,促进鲜切火龙果酚类物质的合成积累并抑制贮藏后期酚类物质含量的下降,增强其抗氧化能力;此外,冷激预处理可以诱导提高SOD、CAT、APX抗氧化酶活力,有效清除过多的ROS。综上,冷激预处理通过调控苯丙烷途径和ROS代谢,提高抗氧化能力,缓解鲜切火龙果氧化过程,从而有效抑制其果肉褐变。冷激预处理安全高效、操作简单,在鲜切火龙果品质保持方面具有较好的应用前景。

### 参考文献:

- TRIVELLINI A, LUCCHESINI M, FERRANTE A, et al. Pitaya, an attractive alternative crop for mediterranean region[J]. *Agronomy*, 2020, 10(8): 1065. DOI:10.3390/agronomy10081065.
- JIANGH T, ZHANGW L, LIX X, et al. Nutrition, phytochemical profile, bioactivities and applications in food industry of pitaya (*Hylocereus* spp.) peels: a comprehensive review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 116: 199-217. DOI:10.1016/j.tifs.2021.06.040.
- CISNEROS-ZEVALLOS L, JACOBO-VELÁZQUEZ D A. Controlled abiotic stresses revisited: from homeostasis through hormesis to extreme stresses and the impact on nutraceuticals and quality during pre- and postharvest applications in horticultural crops[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(43): 11877-11879. DOI:10.1021/acs.jafc.0c06029.
- LI Xiao'an, LONG Qinghong, GAO Fan, et al. Effect of cutting styles on quality and antioxidant activity in fresh-cut pitaya fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2017, 124: 1-7. DOI:10.1016/j.postharvbio.2016.09.009.
- SUCHETA, SINGLA G, CHATURVEDI K, et al. Status and recent trends in fresh-cut fruits and vegetables[M]// SIDDIQUI M W. *Fresh-cut fruits and vegetables*. New York: Academic Press, 2020: 17-49. DOI:10.1016/b978-0-12-816184-5.00002-1.
- 程丽林, 吴波, 袁海君, 等. 鲜切果蔬贮藏保鲜技术研究进展[J]. *保鲜与加工*, 2019, 19(1): 147-152. DOI:10.3969/j.issn.1009-6221.2019.01.025.
- 何萍. 两种冷激处理对不同成熟度壶瓶枣保鲜效果的影响[D]. 太谷: 山西农业大学, 2020: 4-8.
- ZHAO S S, YANG Z, ZHANG L, et al. The effect of treatment with the combined static magnetic field and cold water shock on the physicochemical properties of cucumbers[J]. *Journal of Food Engineering*, 2017, 217: 24-33. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2017.08.011.
- GU S T, XU D Y, ZHOU F H, et al. Cold shock treatment maintains quality and induces relative expression of cold shock domain protein (CSDPs) in postharvest sweet cherry[J]. *Scientia Horticulturae*, 2020, 262: 109058. DOI:10.1016/j.scienta.2019.109058.
- 张苗, 姜玉, 汤静, 等. 冷激结合甜菜碱处理对西葫芦冷害及能量代谢的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(7): 184-190. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190716-212.
- NIAN Y W, WANG N, LI R, et al. Cold shock treatment alleviates chilling injury in papaya fruit during storage by improving antioxidant capacity and related gene expression[J]. *Scientia Horticulturae*, 2022, 294: 110784. DOI:10.1016/j.scienta.2021.110784.
- MA Y Q, HU S Q, CHEN G F, et al. Cold shock treatment alleviates chilling injury in peach fruit by regulating antioxidant capacity and membrane lipid metabolism[J]. *Food Quality and Safety*, 2022, 6: 1-11. DOI:10.1093/fqsafe/fyab026.
- 张婷婷, 姚文思, 朱惠文, 等. 冷激处理减轻茄子冷害与活性氧代谢的关系[J]. *食品科学*, 2018, 39(23): 205-211. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201823031.
- 刘洪竹, 陈双颖, 李进才. 冷热激处理对不同鲜切蔬菜衰老生理机能的影响[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(12): 316-321. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2013.12.046.
- 唐文, 吴颖, 刘玉仙. 冷冲击处理对鲜切青椒贮藏品质的影响[J]. *长江蔬菜*, 2009(22): 37-40. DOI:10.3865/j.issn.1001-3547.2009.22.013.
- COKLAR H, AKBULUT M, KILINC S, et al. Effect of freeze, oven and microwave pretreated oven drying on color, browning index, phenolic compounds and antioxidant activity of hawthorn (*Crataegus*

- orientalis* fruit[J]. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2018, 46(2): 449-456. DOI:10.15835/nbha46211027.
- [17] LUO Zisheng, WU Xiang, XIE Yan, et al. Alleviation of chilling injury and browning of postharvest bamboo shoot by salicylic acid treatment[J]. *Food Chemistry*, 2012, 131(2): 456-461. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.09.007.
- [18] MIN Dedong, LI Fujun, ZHANG Xinhua, et al. Effect of methyl salicylate in combination with 1-methylcyclopropene on postharvest quality and decay caused by *Botrytis cinerea* in tomato fruit[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98(10): 3815-3822. DOI:10.1002/jsfa.8895.
- [19] SWAIN T, HILLIS W E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.: the quantitative analysis of phenolic constituents[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1959, 10(1): 63-68. DOI:10.1002/jsfa.2740100110.
- [20] CHANG C C, YANG M H, WEN H M, et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods[J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2002, 10(3): 178-182. DOI:10.38212/2224-6614.2748.
- [21] BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER M E, BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 1995, 28(1): 25-30. DOI:10.1016/s0023-6438(95)80008-5.
- [22] RICHMOND R, HALLIWELL B, CHAUHAN J, et al. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals: detection of hydroxyl radicals by the hydroxylation of aromatic compounds[J]. *Analytical Biochemistry*, 1981, 118(2): 328-335. DOI:10.1016/0003-2697(81)90590-x.
- [23] SURJADINATA B B, CISNEROS-ZEVALLOS L. Biosynthesis of phenolic antioxidants in carrot tissue increases with wounding intensity[J]. *Food Chemistry*, 2012, 134(2): 615-624. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.01.097.
- [24] LI Xiao'an, LI Meilin, JIN Nana, et al. Cold plasma treatment induces phenolic accumulation and enhances antioxidant activity in fresh-cut pitaya (*Hylocereus undatus*) fruit[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2019, 115: 108447. DOI:10.1016/j.lwt.2019.108447.
- [25] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248-254. DOI:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [26] LI X A, LI B R, MIN D D, et al. Transcriptomic analysis reveals key genes associated with the biosynthesis regulation of phenolics in fresh-cut pitaya fruit (*Hylocereus undatus*)[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2021, 181: 11684. DOI:10.1016/j.postharvbio.2021.11116.
- [27] CHANG Shujun, PURYEAR J, CAIRNEY J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1993, 11(2): 113-116. DOI:10.1007/bf02670468.
- [28] ELSTNER E F, HEUPEL A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: a simple assay for superoxide dismutase[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 70(2): 616-620. DOI:10.1016/0003-2697(76)90488-7.
- [29] PATTERSON B D, MACRASE E A, FERGUSON I B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV)[J]. *Analytical Biochemistry*, 1984, 139(2): 487-492. DOI:10.1016/0003-2697(84)90039-3.
- [30] ZENG Kaifang, DENG Yuyan, MING Jian, et al. Induction of disease resistance and ROS metabolism in navel oranges by chitosan[J]. *Scientia Horticulturae*, 2010, 126(2): 223-228. DOI:10.1016/j.scienta.2010.07.017.
- [31] ANGONESE M, MOTTA G E, SILVA DE FARIAS N, et al. Organic dragon fruits (*Hylocereus undatus* and *Hylocereus polyrhizus*) grown at the same edaphoclimatic conditions: comparison of phenolic and organic acids profiles and antioxidant activities[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 149: 111924. DOI:10.1016/j.lwt.2021.111924.
- [32] CHEN Z C, ZHONG B M, BARROW C J, et al. Identification of phenolic compounds in Australian grown dragon fruits by LC-ESI-QTOF-MS/MS and determination of their antioxidant potential[J]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2021, 14(6): 103151. DOI:10.1016/j.arabjc.2021.103151.
- [33] FERRER J L, AUSTIN M B, STEWART C, et al. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008, 46(3): 356-370. DOI:10.1016/j.plaphy.2007.12.009.
- [34] JACOBO-VELÁZQUEZ D A, MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ G B, RODRÍGUEZ S D C, et al. Plants as biofactories: physiological role of reactive oxygen species on the accumulation of phenolic antioxidants in carrot tissue under wounding and hyperoxia stress[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(12): 6583-6593. DOI:10.1021/jf2006529.
- [35] LI X A, LI M L, WANG L, et al. Methyl jasmonate primes defense responses against wounding stress and enhances phenolic accumulation in fresh-cut pitaya fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2018, 145: 101-107. DOI:10.1016/j.postharvbio.2018.07.001.