

## 壳聚糖处理对采后脐橙活性氧代谢和细胞膜透性的影响

曾玲珍<sup>1,2,3</sup>, 邓礼艳<sup>1,2,3</sup>, 林育钊<sup>1,2,3</sup>, 林河通<sup>1,2,3</sup>, 林艺芬<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> 福建农林大学食品科学学院 福州 350002

<sup>2</sup> 福建农林大学农产品产后技术研究所 福州 350002

<sup>3</sup> 亚热带特色农产品采后生物学(福建农林大学)福建省高校重点实验室 福州 350002

**摘要** 为了开发一种提高采后脐橙果实耐贮性的安全、简便、低成本保鲜技术,阐明其可能的作用机理,将采后“纽荷尔”脐橙果实用壳聚糖(稀释 800 倍的卡多赞)浸泡 5 min(以清水浸泡 5 min 为对照)并在相对湿度 85%和温度(18±1)℃下贮藏,研究壳聚糖处理对脐橙果实贮藏期间活性氧代谢和细胞膜透性的影响。结果显示:与对照果实比较,壳聚糖处理能较好地保持“纽荷尔”脐橙果实的外观品质,有效减少果实腐烂,抑制脐橙细胞膜透性、超氧阴离子自由基、过氧化氢和丙二醛含量的上升,保持较高的超氧化物歧化酶、抗坏血酸过氧化物酶和过氧化氢酶活性,较高的还原型谷胱甘肽和还原型抗坏血酸含量及较高的还原能力和 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基清除能力。结论:壳聚糖(稀释 800 倍的卡多赞)处理增强了采后“纽荷尔”脐橙果实耐贮性,与壳聚糖处理增强脐橙果实的活性氧清除能力,降低活性氧和丙二醛的产生与积累,减轻膜脂过氧化作用及较好地保持其细胞膜结构有关。

**关键词** “纽荷尔”脐橙; 壳聚糖; 活性氧代谢; 细胞膜透性; 耐贮性

文章编号 1009-7848(2023)05-0291-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.05.029

脐橙 [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck. var. *brasiliensis* Tanaka] 属芸香科(Rutaceae Juss.) 柑橘属(*Citrus* L.), 是中国南方的特色水果, 主要种植于重庆、湖北、江西、福建等地<sup>[1-2]</sup>。脐橙果实肉质脆嫩多汁, 酸甜适口, 风味浓郁, 且富含多种维生素, 具有较高的经济和食用价值, 是品质最佳、销售最广的鲜食柑桔品类<sup>[2]</sup>。脐橙是非呼吸跃变型水果, 主要成熟于 11~12 月, 果实易发生衰老、脱水、失重、果皮损伤和收缩、果肉质地变化以及风味下降等症状, 这是采后脐橙果实经济损失的主要原因<sup>[3-4]</sup>。目前, 国内外脐橙贮藏保鲜技术主要为化学试剂保鲜和冷藏保鲜<sup>[1-3]</sup>, 然而, 化学保鲜剂的使用可能造成脐橙果实表面化学残留, 而冷藏保鲜会大大增加脐橙果实保鲜成本。因此, 亟需发展一种高效、方便、低成本和绿色环保的保鲜技术, 以提高采后脐橙果实耐贮性。

研究发现, 果实采后耐贮性与活性氧(ROS) 代谢密切相关<sup>[5-7]</sup>, 果实耐贮性下降的同时伴随着细胞膜透性的增加。病原菌侵染<sup>[6]</sup>、能量亏缺<sup>[8]</sup>等会

使采后果实活性氧清除能力下降, 导致超氧阴离子自由基(O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)等 ROS 和膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)在细胞内过量积累, 最终使采后果实活性氧代谢失调。同时, 活性氧代谢失调又会导致其细胞内的 ROS 大量产生, 造成细胞膜的结构和功能受损, 脂质过氧化, 细胞膜完整性被破坏, 细胞膜透性增加, 最终使采后果实的衰老进程加快, 果实耐贮性降低<sup>[5-7]</sup>。然而, 水杨酸、核黄素、1-甲基环丙烯等<sup>[9-11]</sup>处理可保持采后果实较高的清除 ROS 能力, 降低 ROS 和 MDA 的产生与积累, 这些有利于减缓采后果实细胞膜脂质过氧化, 保持细胞膜的完整性, 进而提高采后果实耐贮性<sup>[5-7]</sup>。果实采后耐贮性与 ROS 代谢水平密切相关。

壳聚糖具有抗菌、生物可降解和安全的特点<sup>[12-14]</sup>。前人研究发现, 壳聚糖可调节 ROS 代谢, 增强 ROS 清除酶活性, 减少 ROS 的积累及其对细胞膜的破坏, 进而减缓果实衰老, 提高采后果实的耐贮性<sup>[5-7]</sup>。目前, 广泛应用于采后果蔬处理的壳聚糖是粉末状的。这种类型的壳聚糖在处理采后果蔬时需预先溶解在酸性溶液中, 用碱将溶液 pH 值调节到合适的范围, 这需要花费较长的时间, 不利于采后果蔬的快速处理<sup>[5-7]</sup>。卡多赞是一种新型的

收稿日期: 2022-05-24

基金项目: 福建省高校产学研合作项目(2019N5005)

第一作者: 曾玲珍, 女, 博士生

通信作者: 林艺芬 E-mail: yifenlin@126.com

水溶性壳聚糖,无需调节 pH 值且用水稀释即可得到所需不同浓度的溶液,使用非常方便。本课题组近年研究发现,卡多赞能有效减缓龙眼<sup>[5]</sup>、荔枝<sup>[6]</sup>和西番莲<sup>[7]</sup>等果实的成熟和衰老,并能有效提高果实耐贮性。这与水溶性壳聚糖能有效维持 ROS 代谢平衡而提高龙眼、荔枝和西番莲等果实的 ROS 清除能力,从而减少 ROS 积累有关。然而,目前尚未有关卡多赞(水溶性壳聚糖)对脐橙果实耐贮性影响的研究报道。本研究以“纽荷尔”脐橙为试验材料,研究卡多赞(水溶性壳聚糖)对采后脐橙果实活性氧代谢和细胞膜透性的影响,旨在提高脐橙果实采后耐贮性,延长保鲜期。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

水溶性壳聚糖(卡多赞),上海利统公司;乙二氨四乙酸二钠、抗坏血酸、十二水磷酸氢二钠、盐酸羟胺、对氨基苯磺酸、冰醋酸、三氯乙酸、氮蓝四唑、甲硫氨酸、二硫代硝基苯甲酸、考马斯亮蓝 G-250、氯化铁、1-氨基萘、二硫代硝基苯甲酸,上海颀心实验设备有限公司。

供试材料为福建省三明市尤溪县久泰现代农业公司果园种植的“纽荷尔”脐橙(*Citrus sinensis* (L.) Osbeck. cv. Newhall navel orange),在果实九成熟(外果皮  $L^*$  值为  $74 \pm 0.18$ ,  $a^*$  值为  $19.17 \pm 0.53$ ,  $b^*$  值为  $69.76 \pm 0.14$ ,  $h$  值为  $74.63 \pm 0.39$ , 颜色指数为  $3.71 \pm 0.11$ )时采摘,果实采摘后、常温运输到福建农林大学农产品产后技术研究所,挑选形状、大小、成熟度一致的健康果实进行试验。

### 1.2 设备与仪器

电热恒温水浴锅,北京市永光明医疗仪器厂;3173 型电导率仪,上海电子有限公司;多功能酶标仪,美国 Thermo 公司;BSA224S 电子天平,赛多利斯(上海)贸易有限公司;DRX-260 人工气候箱、LFP-800T 型多功能粉碎机,宁波江南仪器厂;GL-20G-II 高速冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂。

### 1.3 方法

1.3.1 “纽荷尔”脐橙预处理 本课题组在预试验中采用不同浓度壳聚糖(卡多赞稀释 200,400,600,800 倍及 1 000 倍)和蒸馏水(对照)浸泡处理

“纽荷尔”脐橙果实 5 min,晾干后进行包装(每袋 6 个果实,每组共 60 袋),之后将果实置于相对湿度 85%、 $(18 \pm 1)^\circ\text{C}$ (因甜橙集中采收于 11~12 月,所以将贮藏甜橙的贮藏温度模拟室温,设定为  $18^\circ\text{C}$ )下贮藏 180 d。在贮藏期的第 180 天时,计算脐橙果实商品率分别为 25.6%(稀释 200 倍),38.9%(稀释 400 倍),30%(稀释 600 倍),50%(稀释 800 倍),22.2%(稀释 1 000 倍),13.3%(对照组)。可以看出,稀释 800 倍卡多赞溶液处理的“纽荷尔”脐橙果实商品率最高。因此,将卡多赞稀释 800 倍作为接下来正式试验处理“纽荷尔”脐橙果实时所使用的浓度。

在正式试验中,挑选 720 个“纽荷尔”脐橙果实,随机分成两组并进行以下处理:1)浸泡在稀释 800 倍的卡多赞溶液中 5 min;2)浸泡在蒸馏水(对照组)中 5 min。晾干后,用聚乙烯薄膜袋(厚度:0.015 mm)对脐橙果实进行包装(每袋 6 个果实,每组共 60 袋)。果实包装之后放置在与预试验相同条件下贮藏 180 d。贮藏期间,每隔 30 d 取 10 袋(60 个果实)“纽荷尔”脐橙果实,用于测定“纽荷尔”脐橙细胞膜透性和 ROS 代谢相关指标。

### 1.3.2 测定指标和方法

1.3.2.1 细胞膜透性测定 参照 Jiang 等<sup>[6]</sup>的方法,从 6 个“纽荷尔”脐橙果实赤道面取 30 个直径为 5 mm 的脐橙果实圆片、用于测定“纽荷尔”脐橙的细胞膜透性,单位为%。

1.3.2.2  $\text{O}_2^{\cdot-}$  产生速率测定 参照 Lin 等<sup>[15]</sup>的方法,从 6 个“纽荷尔”脐橙果实中取样 1 g、用于测定“纽荷尔”脐橙的  $\text{O}_2^{\cdot-}$  产生速率,单位为  $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{kg})$ 。

1.3.2.3  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量测定 参照曹建康等<sup>[6]</sup>和陈莲等<sup>[7]</sup>的方法,从 6 个“纽荷尔”脐橙果实中取样 1 g、用于测定“纽荷尔”脐橙的  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量,单位为  $\text{mol}/\text{kg}$ 。

1.3.2.4 MDA 含量测定 参照 Lin 等<sup>[15]</sup>的方法,从 6 个“纽荷尔”脐橙果实中取样 1 g、用于测定“纽荷尔”脐橙的 MDA 含量,单位为  $\text{mol}/\text{kg}$ 。

1.3.2.5 ROS 清除酶活性测定 参照 Lin 等<sup>[15]</sup>的方法,从 6 个果实中取样 1 g,用于测定超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和过氧化氢酶(CAT)活性。参照 Bradford<sup>[18]</sup>的方法,测

定酶提取液的可溶性蛋白质含量。以上酶活性单位以 U/mg 蛋白表示。

1.3.2.6 内源抗氧化物质含量测定 参照 Lin 等<sup>[15]</sup>的方法,从6个“纽荷尔”脐橙果实中取样1g,用于测定“纽荷尔”脐橙的还原型谷胱甘肽(GSH)和还原型抗坏血酸(AsA)含量,单位为g/kg。

1.3.2.7 还原力和1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除能力的测定 参照 Lin 等<sup>[15]</sup>的方法,从6个“纽荷尔”脐橙果实中取样1g,用于测定“纽荷尔”脐橙的还原力和DPPH自由基清除能力,单位分别为g/kg和%。

1.3.3 数据处理 上述指标都测定3次,取其平

均值。利用21.0版IBM SPSS Statistics对数据进行统计分析、显著性差异分析以及相关性分析。

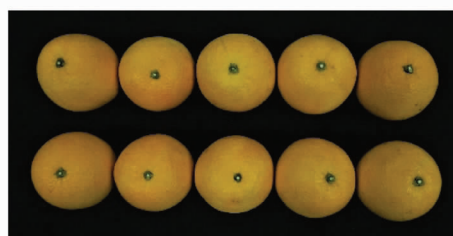
## 2 结果与分析

### 2.1 果实外观品质和细胞膜透性

如图1所示,“纽荷尔”脐橙果实的外观颜色随着贮藏时间的延长由黄绿色变成橙红色,同时,腐烂的果实数量也不断增加。经过壳聚糖处理的“纽荷尔”脐橙果实外观颜色变化速度较对照组果实慢,且腐烂的果实数量也低于对照组。如在贮藏期第180天时,对照组有79%的果实发生腐烂,而壳聚糖处理组只有37%的果实发生腐烂,对照组的果实腐烂率是壳聚糖处理组的2.1倍。



(a)对照,0 d



(b)壳聚糖处理,0 d



(c)对照,30 d



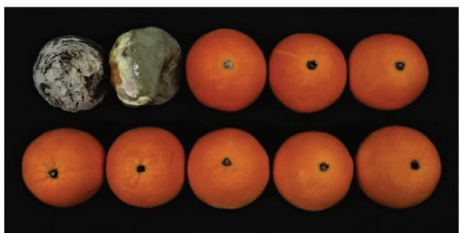
(d)壳聚糖处理,30 d



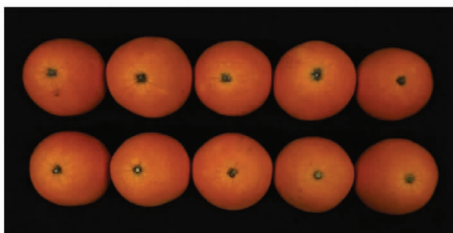
(e)对照,60 d



(f)壳聚糖处理,60 d



(g)对照,90 d



(h)壳聚糖处理,90 d



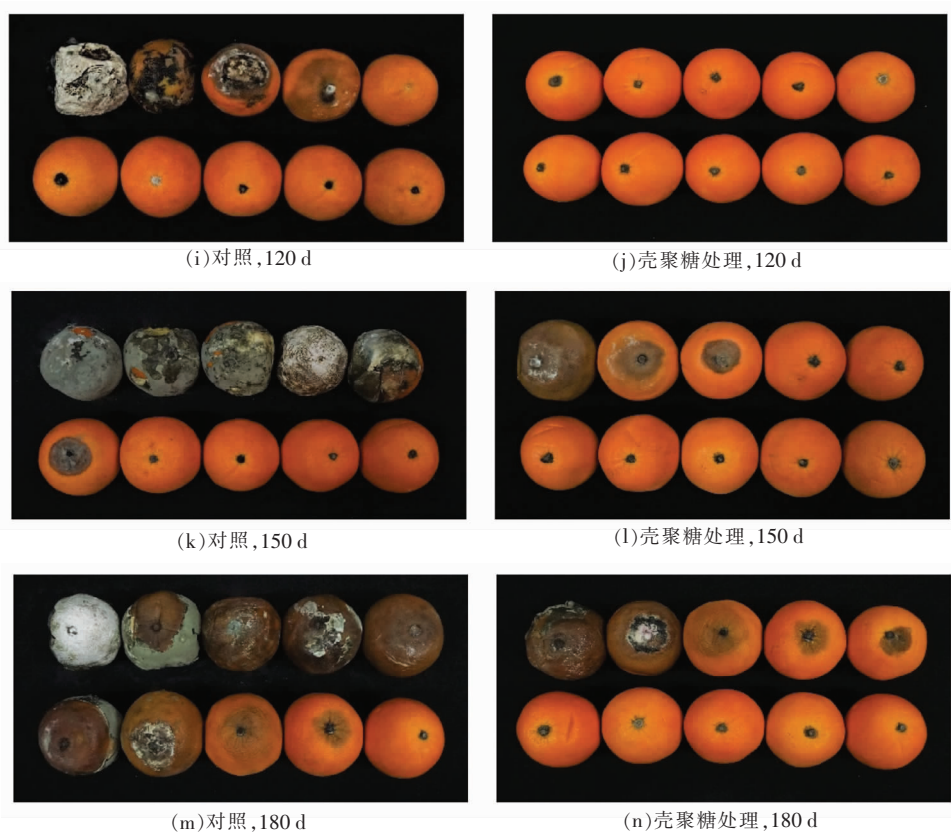


图1 壳聚糖处理对“纽荷尔”脐橙果实贮藏期间外观品质的影响

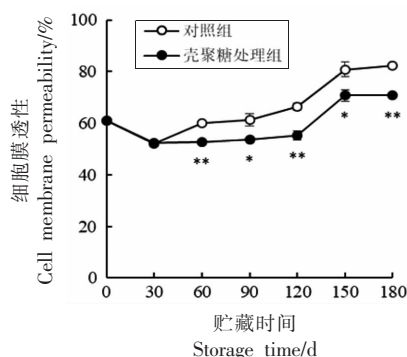
Fig.1 Effects of chitosan treatment on the fruit appearance quality of 'Newhall' navel oranges during storage

如图2所示,对照组和壳聚糖处理组的“纽荷尔”脐橙细胞膜透性在采后贮藏30~180 d内都呈现为上升的趋势。统计分析结果显示,在贮藏60~180 d内,壳聚糖处理的“纽荷尔”脐橙细胞膜透性都显著( $P < 0.05$ )低于对照组果实。

上述结果表明,壳聚糖处理能有效延缓“纽荷尔”脐橙果实贮藏期间细胞膜透性的增加,同时减缓“纽荷尔”脐橙果实外观颜色变化和降低果实腐烂率。

## 2.2 果实 $O_2^-$ 产生速率、 $H_2O_2$ 和 MDA 含量

“纽荷尔”脐橙果实采后贮藏期间,其  $O_2^-$  产生速率、 $H_2O_2$  和 MDA 含量随贮藏时间的增加而上升(图3)。与对照组果实相比,壳聚糖处理能有效减缓“纽荷尔”脐橙  $O_2^-$  产生速率、 $H_2O_2$  和 MDA 含量的上升,并维持在较低水平。其中,壳聚糖处理的“纽荷尔”脐橙  $O_2^-$  产生速率在贮藏60~180 d内显著( $P < 0.05$ )低于对照组果实(图3a);  $H_2O_2$  含量在贮藏90~180 d内显著( $P < 0.05$ )低于对照组



注: \*、\*\* 分别表示在相同贮藏时间,壳聚糖处理与对照组处理组的差异显著( $P < 0.05$ )或极显著( $P < 0.01$ )。下同。

图2 壳聚糖处理对“纽荷尔”脐橙果实贮藏期间细胞膜透性的影响

Fig.2 Effects of chitosan treatment on the cell membrane permeability in 'Newhall' navel oranges during storage

果实(图3b); MDA 含量在贮藏160~180 d内显著( $P < 0.05$ )低于对照组果实(图3c)。

上述结果表明,壳聚糖处理能有效减缓“纽荷

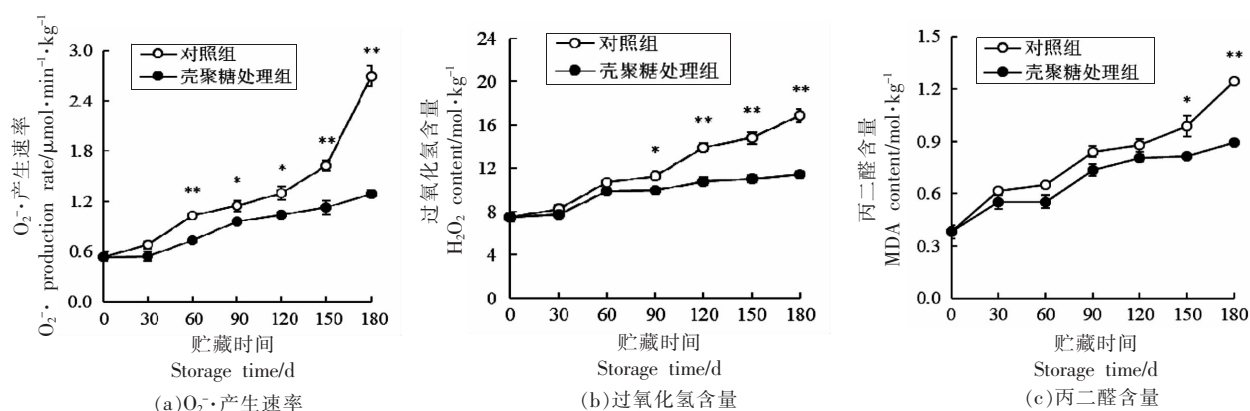


图 3 壳聚糖处理对“纽荷尔”脐橙果实贮藏期间  $O_2^-$  产生速率(a)、过氧化氢含量(b)和丙二醛含量(c)的影响

Fig.3 Effects of chitosan treatment on the  $O_2^-$  production rate (a) and contents of  $H_2O_2$  (b) and MDA (c) in 'Newhall' navel oranges during storage

尔”脐橙果实贮藏期间  $O_2^-$  产生速率, 减少  $H_2O_2$  和 MDA 含量的增加。

### 2.3 果实 SOD、CAT 和 APX 活性

如图 4a 所示, 对照组和壳聚糖处理组的“纽荷尔”脐橙 SOD 活性都在贮藏 0~30 d 内增加, 在 30~180 d 内快速下降。与对照组果实相比, 壳聚糖处理的“纽荷尔”脐橙 SOD 活性在 0~180 d 内都保持较高水平。其中, 壳聚糖处理的“纽荷尔”脐橙 SOD 活性在贮藏第 60 天及贮藏 120~180 d 内都显著 ( $P < 0.05$ ) 高于对照组果实。

如图 4b 所示, 对照组和壳聚糖处理组的“纽荷尔”脐橙 CAT 活性在贮藏 0~120 d 内逐渐上升, 而在 120~180 d 内快速下降。与对照组果实相比,

壳聚糖处理的“纽荷尔”脐橙 CAT 活性在贮藏 30~180 d 内都处于较高水平, 且在贮藏 30~90 d 内显著 ( $P < 0.05$ ) 高于对照组果实; 在贮藏 120~180 d 内极显著 ( $P < 0.01$ ) 高于对照组果实。

对照组的“纽荷尔”脐橙 APX 活性随贮藏天数的增加而下降(图 4c); 而壳聚糖处理的“纽荷尔”脐橙 APX 活性在贮藏 0~30 d 内快速上升, 在 30~180 d 内急剧下降。统计分析结果显示, 壳聚糖处理的“纽荷尔”脐橙 APX 活性在贮藏 30~180 d 内都显著 ( $P < 0.05$ ) 高于对照组果实。

上述结果表明, 壳聚糖处理能较好维持“纽荷尔”脐橙果实贮藏期间较高的 SOD、CAT、APX 等 ROS 清除酶活性。

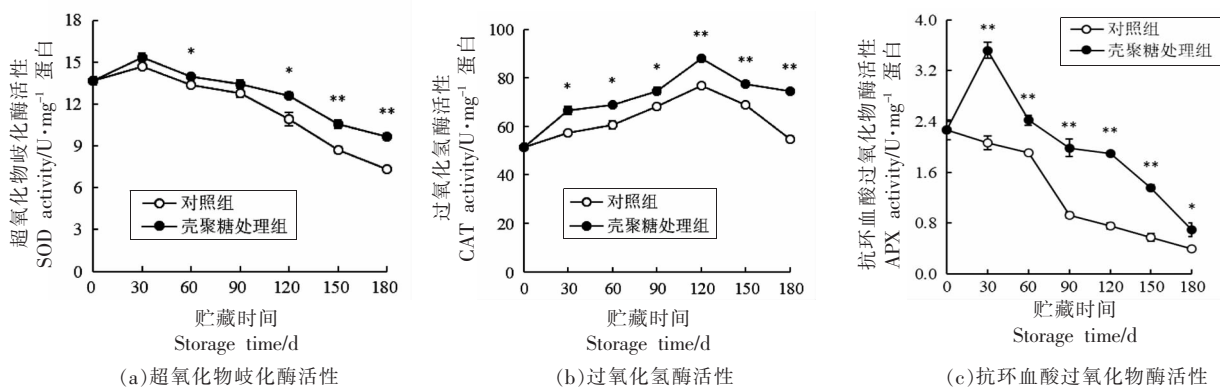


图 4 壳聚糖处理对“纽荷尔”脐橙果实贮藏期间超氧化物歧化酶活性(a)、过氧化氢酶活性(b)和抗坏血酸过氧化物酶活性(c)活性的影响

Fig.4 Effects of chitosan treatment on the activities of SOD (a), CAT (b) and APX (c) in 'Newhall' navel oranges during storage

## 2.4 果实 AsA 和 GSH 含量

“纽荷尔”脐橙果实采后贮藏期间,其 AsA 和 GSH 含量随贮藏时间的增加而下降(图 5)。与对照组相比,壳聚糖处理的“纽荷尔”脐橙 AsA 和 GSH 含量都保持在较高水平。统计分析结果显示,壳聚糖处理的“纽荷尔”脐橙 AsA 含量在贮藏第

30 天时、贮藏 90~180 d 内都显著( $P < 0.05$ )高于对照组果实(图 5a);壳聚糖处理的 GSH 含量在贮藏 120~180 d 内极显著( $P < 0.01$ )高于对照组果实(图 5b)。

上述结果表明,壳聚糖处理能有效延缓“纽荷尔”脐橙果实贮藏期间 AsA 和 GSH 含量的下降。

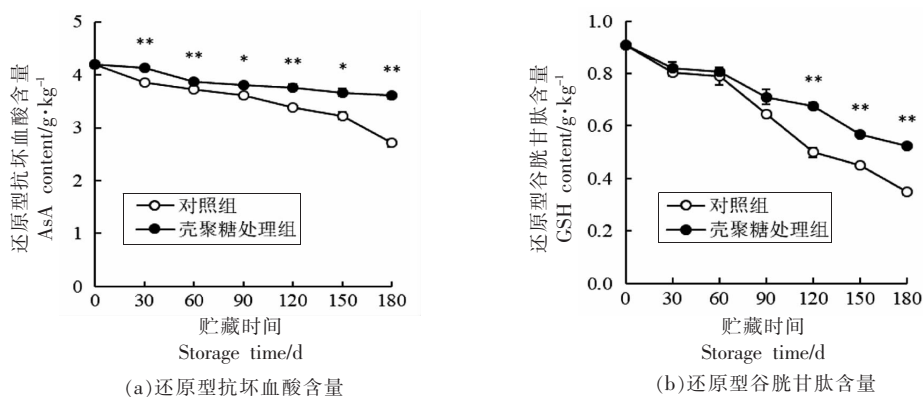


图 5 壳聚糖处理对“纽荷尔”脐橙果实贮藏期间还原型抗坏血酸含量(a)和还原型谷胱甘肽含量(b)的影响

Fig.5 Effects of chitosan treatment on the contents of AsA (a) and GSH (b) in 'Newhall' navel oranges during storage

## 2.5 果实 DPPH 自由基清除能力和还原能力

如图 6a 所示,对照组的“纽荷尔”脐橙 DPPH 自由基清除能力在贮藏 0~180 d 内呈现不断下降的趋势;而壳聚糖处理的“纽荷尔”脐橙 DPPH 自由基清除能力在贮藏 0~30 d 内略有上升,30~180 d 内呈现下降趋势。与对照组果实相比,壳聚糖处理的“纽荷尔”脐橙 DPPH 自由基清除能力在贮藏 30~180 d 内都保持在较高水平,其中在贮藏 90~180 d 内显著( $P < 0.05$ )高于对照组果实。

如图 6b 所示,对照组的“纽荷尔”脐橙还原力

在贮藏 0~150 d 内缓慢地下降,在 150~180 d 内快速下降;而壳聚糖处理的“纽荷尔”脐橙还原力在贮藏 0~30 d 内快速增加,在 30~180 d 内不断地减少。统计分析结果显示,壳聚糖处理的“纽荷尔”脐橙还原力在贮藏 30~180 d 内都显著 ( $P < 0.05$ )高于对照组果实。

上述结果表明,壳聚糖处理可有效减缓“纽荷尔”脐橙果实贮藏期间 DPPH 自由基清除能力和还原力的下降。

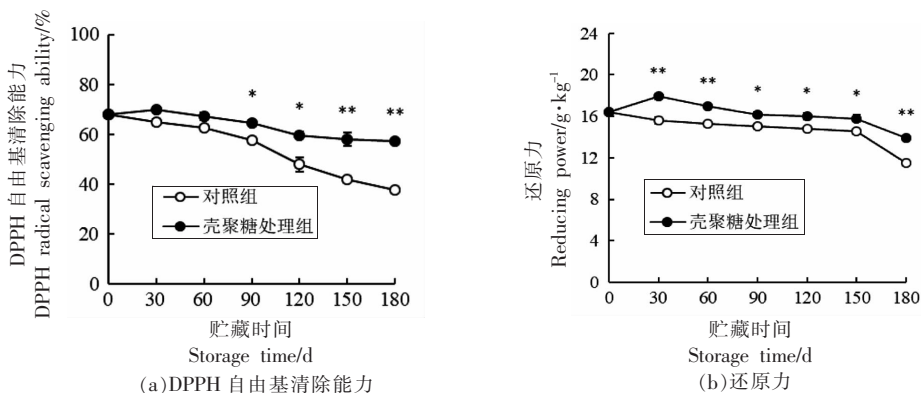


图 6 壳聚糖处理对“纽荷尔”脐橙果实贮藏期间 DPPH 自由基清除能力(a)和还原力(b)含量的影响

Fig.6 Effects of chitosan treatment on the DPPH radical scavenging ability (a) and reducing power (b) in 'Newhall' navel oranges during storage

### 3 讨论

#### 3.1 壳聚糖处理对“纽荷尔”脐橙果实细胞膜透性、ROS 和 MDA 含量的影响及其与耐贮性的影响

线粒体是果实中产生 ROS (如  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{O}_2^{\cdot-}$  等)和自由基的主要部位,ROS 过量积累可引起线粒体蛋白氧化损伤,导致线粒体功能障碍,最终加速果实衰老<sup>[19]</sup>。正常情况下,果蔬采后 ROS 的产生和清除处于平衡状态。采后果蔬成熟或衰老是一种氧化现象,会产生多余的  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{O}_2^{\cdot-}$  等 ROS,通常果蔬体内的 ROS 清除酶会清除  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,进而较好地保持细胞膜完整性,减缓 MDA 含量(膜脂过氧化程度的标志)的增加,延缓采后果蔬衰老<sup>[15,19]</sup>。然而,当采后果蔬体内 ROS 产生-清除系统失去平衡时,其细胞内的有害 ROS 大量积累,破坏细胞膜的结构和功能,导致 MDA 含量增加。反之,MDA 增加会进一步破坏膜的完整性,进而加快果蔬的衰老进程,影响果蔬的耐贮性<sup>[20-22]</sup>。因此,果蔬采后耐贮性与果蔬细胞内的 ROS 水平及 MDA 含量密切相关。

本研究发现,对照组“纽荷尔”脐橙 ROS( $\text{O}_2^{\cdot-}$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 和 MDA 含量都随着贮藏时间的延长而增加(图 3)。同时,对照组的“纽荷尔”脐橙细胞膜透性在贮藏 0~180 d 内也不断地增加(图 2),且果实外观品质(图 1)不断下降。相关性分析发现,对照组“纽荷尔”脐橙细胞膜透性(图 2)分别与  $\text{O}_2^{\cdot-}$  产生速率(图 3a)、 $\text{H}_2\text{O}_2$  含量(图 3b)、MDA 含量(图 3c)在贮藏 30~180 d 内都呈显著( $P < 0.05$ )正相关,其  $r$  值分别为 0.891,0.954 和 0.917。这些结果说明,ROS ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 和 MDA 含量的增加与“纽荷尔”脐橙细胞膜透性的增加密切相关,即采后“纽荷尔”脐橙中的 ROS 不断增加,促进 MDA 含量的累积,从而破坏“纽荷尔”脐橙的细胞膜结构,导致“纽荷尔”脐橙采后耐贮性下降。

此外,与对照组果实相比,壳聚糖处理能降低“纽荷尔”脐橙细胞膜透性(图 2)、 $\text{O}_2^{\cdot-}$  产生速率(图 3a)、 $\text{H}_2\text{O}_2$ (图 3b)和 MDA 含量(图 3c),较好保持“纽荷尔”脐橙果实的外观品质(图 1)。这些结果表明,壳聚糖处理能延缓 ROS( $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ )的产生,抑制 MDA 含量的积累,减轻细胞膜膜脂过氧化,保持细胞膜结构的完整性,减缓细胞膜透性的

增加,从而增强“纽荷尔”脐橙果实采后耐贮性。

#### 3.2 活性氧代谢在壳聚糖增强采后“纽荷尔”脐橙果实耐贮性中的作用

为了减缓 ROS 引起的氧化损伤,保持果实细胞内 ROS 的平衡,采后果实形成了复杂的 ROS 产生-清除系统,包括 ROS 清除酶系统和非酶抗氧化防御系统<sup>[23-26]</sup>。APX、CAT 和 SOD 是主要的 ROS 清除酶<sup>[23-26]</sup>。CAT、APX 参与催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  转换成  $\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{O}_2$ <sup>[19]</sup>;SOD 是清除  $\text{O}_2^{\cdot-}$  关键酶,能有效催化  $\text{O}_2^{\cdot-}$  转换成  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{O}_2$ <sup>[6,20,25]</sup>。AsA 和 GSH 是非酶清除系统内源抗氧化物质,在清除 ROS 反应过程中,AsA 被氧化为单脱氢抗坏血酸盐,再进一步脱氢抗坏血酸盐。脱氢抗坏血酸还原酶以 GSH 为底物,催化脱氢抗坏血酸还原为 AsA,通过维持适当水平的 AsA 保护细胞成分免受氧化应激<sup>[6,27-28]</sup>。此外,活性氧清除能力常采用还原能力和 DPPH 自由基清除能力进行评价<sup>[22,26]</sup>。前人研究指出,当采后果蔬保持较低的 ROS 清除能力时,采后果蔬细胞内的 ROS 和 MDA 含量大量积累,促进膜脂过氧化,进而加速采后果蔬衰老,降低果蔬耐贮性<sup>[23-24,29]</sup>。反之,果蔬采后贮藏期间,保持较高的 APX、CAT 和 SOD 活性、较高的 AsA 和 GSH 含量及较强的还原能力和 DPPH 自由基清除能力,能增强采后果蔬的 ROS 清除能力,降低果蔬细胞内 ROS 和 MDA 含量,有效延缓膜脂过氧化,更好地保持细胞膜的完整性,进而增强采后果蔬的耐贮性<sup>[16,20,22,26]</sup>。Ma 等<sup>[29]</sup>研究发现,褪黑素通过提高脐橙果实的 ROS 清除酶活性,促进非酶清除系统内源抗氧化物质含量的积累,增强了机体的 ROS 清除能力,降低了脐橙果实  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 MDA 含量,进而延缓脐橙果实的衰老。Zhu 等<sup>[30]</sup>研究发现,一氧化氮(NO)处理能增强脐橙果实的 ROS 清除酶活性,降低  $\text{O}_2^{\cdot-}$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量,从而提高果实耐贮性。因此,采后果蔬的耐贮性与 ROS 清除系统密切相关。

本研究发现,对照组的“纽荷尔”脐橙 SOD(图 4a)和 CAT(图 4b)分别在贮藏 0~30 d 内和 0~120 d 内呈现上升趋势,这可能是“纽荷尔”脐橙 ROS 清除酶对贮藏期间 ROS 不断生成而响应的应激反应。然而,随着采后“纽荷尔”脐橙果实衰老和品质劣变,其 SOD(图 4a)和 CAT(图 4b)活性下降,



导致 ROS 清除能力下降、ROS 进一步累积(图 3a、3b);认为在贮藏前期,SOD、CAT 是分别清除“纽荷尔”脐橙  $O_2^-$ 、 $H_2O_2$  的主要酶。另外,在贮藏期,“纽荷尔”脐橙 APX 活性(图 4c)、AsA(图 5a)和 GSH 含量(图 5b)不断下降。上述结果说明,采后“纽荷尔”脐橙的 ROS 清除能力下降,促进 ROS 的产生和 MDA 含量的累积,加快膜脂过氧化、破坏细胞膜结构,最终导致“纽荷尔”脐橙果实耐贮性下降。

与对照组对比可知,壳聚糖处理能提高贮藏前中期的“纽荷尔”脐橙 SOD(图 4a)、CAT(图 4b)和 APX(图 4c)活性,保持贮藏期间较高的 SOD(图 4a)、CAT(图 4b)和 APX(图 4c)活性、较高的 AsA(图 5a)和 GSH 含量(图 5b)、较高的 DPPH 自由基清除能力(图 6a)和还原力(图 6b)及较低的  $O_2^-$  产生速率(图 3a)、 $H_2O_2$ (图 3b)和 MDA 含量(图 3c)、较低的细胞膜透性(图 2)。据此认为,壳聚糖处理增强“纽荷尔”脐橙果实耐贮性,与壳聚糖处理维持较高的“纽荷尔”脐橙 ROS 清除酶(SOD、CAT 及 APX)活性、内源抗氧化物质(AsA 及 GSH)含量和 DPPH 自由基清除能力和还原力,从而有效提高“纽荷尔”脐橙 ROS 清除能力、减轻其 ROS 与 MDA 的累积、降低其膜脂过氧化和较好保持其细胞膜结构有关。

#### 4 结论

综上所述,壳聚糖(稀释 800 倍的卡多赞)处理能有效维持“纽荷尔”脐橙较高的 ROS 清除酶(SOD、CAT、APX)活性、较高的 AsA、GSH 含量,较高的还原力和 DPPH 自由基的清除能力,从而有效提高 ROS 清除能力、降低 ROS ( $O_2^-$ 、 $H_2O_2$ )和 MDA 的产生和积累,减缓膜脂过氧化和细胞膜透性的增加,较好维持其细胞膜结构,进而减缓“纽荷尔”脐橙果实外观品质劣变进程、增强其果实耐贮性和延长果实保鲜期。

#### 参 考 文 献

- [1] 陈婷,蔡艳,段凯文,等.脐橙贮藏保鲜研究进展[J].农产品加工,2019,490(20):83-85.  
CHEN T, CAI Y, DUAN K W, et al. Research on preservation of navel orange[J]. Farm Products Processing, 2019, 490(20): 83-85.
- [2] 王武,尹旭敏,李勋兰,等.脐橙品系(种)的起源与演化[J].中国南方果树,2021,50(3):194-200.  
WANG W, YIN X M, LI X L, et al. Origin and evolution of the strains and varieties of navel orange[J]. South China Fruits, 2021, 50(3): 194-200.
- [3] 吴平安,邓正春,孙元学,等.脐橙留树保鲜技术应用研究初报[J].湖南农业科学,2013,318(15):170-172.  
WU P A, DENG Z C, SUN Y X, et al. Preliminary report on application of navel orange preservation technology [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2013, 318(15): 170-172.
- [4] 李辉,林毅雄,林河通,等.1-甲基环丙烯延缓采后“油木奈”果实衰老及其与膜脂代谢关系[J].中国食品学报,2015,15(12):143-151.  
LI H, LIN Y X, LIN H T, et al. Delaying senescence of harvested 'younai' plum fruit by 1-methylcyclopropene and its relation to the metabolism of membrane lipids[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(12): 143-151.
- [5] LIN Y Z, CHEN G, LIN H T, et al. Chitosan postharvest treatment suppresses the pulp breakdown development of longan fruit through regulating ROS metabolism [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 165: 601-608.
- [6] JIANG X J, LIN H T, LIN M S, et al. A novel chitosan formulation treatment induces disease resistance of harvested litchi fruit to *Peronophythora litchii* in association with ROS metabolism[J]. Food Chemistry, 2018, 266: 299-308.
- [7] 郭欣,林育钊,邓礼艳,等.壳聚糖处理对采后西番莲果实贮藏期间果皮活性氧代谢的影响[J].热带作物学报,2020,41(12):2526-2533.  
GUO X, LIN Y Z, DENG L Y, et al. Effects of chitosan treatment on reactive oxygen species metabolism in pericarp of harvested passion fruit during storage[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(12): 2526-2533.
- [8] LIN Y F, CHEN M Y, LIN H T, et al. DNP and ATP induced alteration in disease development of phomopsis longanae chi-inoculated longan fruit by acting on energy status and reactive oxygen species production-scavenging system [J]. Food Chemistry,



- 2017, 228: 497–505.
- [9] 杜林笑, 赵晓敏, 谢季云, 等. 1-MCP 处理对库尔勒香梨低温贮藏期间活性氧代谢及品质的影响[J]. 保鲜与加工, 2020, 117(2): 36–42.  
DU L X, ZHAO X M, XIE J Y, et al. Effects of 1-MCP treatment on active oxygen metabolism and quality of korla fragrant pear during cold storage[J]. Storage and Process, 2020, 117(2): 36–42.
- [10] 蒋超男, 李灿婴, 李伊涵, 等. 采后核黄素处理对苹果青霉病及活性氧和苯丙烷代谢的影响[J]. 保鲜与加工, 2021, 21(3): 1–7.  
JIANG C N, LI C Y, LI Y H, et al. Effects of riboflavin treatment on blue mould and reactive oxygen species and phenylpropanoid metabolisms in postharvest apples[J]. Storage and Process, 2021, 21(3): 1–7.
- [11] 董柏余, 汤洪敏, 姚秋萍, 等. 采后水杨酸处理对金刺梨果实活性氧和苯丙烷代谢的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(17): 308–315.  
DONG B Y, TANG H M, YAO Q P, et al. Effects of salicylic acid treatment on reactive oxygen species metabolism and phenylpropanoid pathway in *Rosa sterilis*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(17): 308–315.
- [12] WANG S Y, GAO Y H. Effect of chitosan-based edible coating on antioxidants, antioxidant enzyme system, and postharvest fruit quality of strawberries (*Fragaria x aranassa* Duch.)[J]. LWT – Food Science and Technology, 2013, 52(2): 71–79.
- [13] JONGSRI P, WANGSOMBOONDEE T, ROJSIT-THISAK P, et al. Effect of molecular weights of chitosan coating on postharvest quality and physicochemical characteristics of mango fruit[J]. LWT – Food Science and Technology, 2016, 73: 28–36.
- [14] LIU K D, YUAN C C, CHEN Y, et al. Combined effects of ascorbic acid and chitosan on the quality maintenance and shelf life of plums[J]. Scientia Horticulturae, 2014, 176: 45–53.
- [15] LIN Y X, LIN H T, FAN Z Q, et al. Inhibitory effect of propyl gallate on pulp breakdown of longan fruit and its relationship with ROS metabolism[J]. Postharvest Biology and Technology, 2020, 168: 111272.
- [16] 曹建康, 姜微波, 赵玉梅. 果蔬采后生理生化实验指导[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007: 1–176.  
CAO J K, JIANG W B, ZHAO Y M. Experiment guidance of postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2007: 1–176.
- [17] 陈莲, 陈梦茵, 林河通, 等. 解偶联剂 DNP 处理对采后龙眼果实果皮褐变和活性氧代谢的影响[J]. 中国农业科学, 2009, 41(11): 4019–4026.  
CHEN L, CHEN M Y, LIN H T, et al. Effects of uncouple agent DNP treatment on browning and active oxygen metabolism in pericarp of harvested longan fruit[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 41(11): 4019–4026.
- [18] 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: 248–254.
- [19] TIAN S P, QIN G Z, LI B Q. Reactive oxygen species involved in regulating fruit senescence and fungal pathogenicity[J]. Plant Molecular Biology, 2013, 82(6): 593–602.
- [20] 林毅雄, 林河通, 陈艺晖, 等. 采前喷施胺鲜酯对采后龙眼果实贮藏期间果皮活性氧代谢的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(19): 242–248.  
LIN Y X, LIN H T, CHEN Y H, et al. Effect of preharvest spraying of diethyl aminoethyl hexanoate on metabolism of reactive oxygen species in longan fruit pericarp during postharvest storage[J]. Food Science, 2019, 40(19): 242–248.
- [21] LIU J, ZHANG X F, KENNEDY J F, et al. Chitosan induces resistance to tuber rot in stored potato caused by *Alternaria tenuissimab*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 140: 851–857.
- [22] CHEN Y H, HUNG Y C, CHEN M Y, et al. Enhanced storability of blueberries by acidic electrolyzed oxidizing water application may be mediated by regulating ROS metabolism[J]. Food Chemistry, 2019, 270: 229–235.
- [23] SUN J Z, LIN H T, ZHANG S, et al. The roles of ROS production-scavenging system in *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl.-induced pericarp browning and disease development of harvested longan fruit[J]. Food Chemistry, 2018, 247: 16–22.
- [24] LIN Y F, LIN H T, ZHANG S, et al. The role of active oxygen metabolism in hydrogen peroxide-induced pericarp browning of harvested longan fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2014, 96(1):

- 42–48.
- [25] DUAN X W, LIU T, ZHANG D D, et al. Effect of pure oxygen atmosphere on antioxidant enzyme and antioxidant activity of harvested litchi fruit during storage[J]. *Food Research International*, 2011, 44(7): 1905–1911.
- [26] TANG J Y, CHEN H B, LIN H T, et al. Acidic electrolyzed water treatment delayed fruit disease development of harvested longans through inducing the disease resistance and maintaining the ROS metabolism systems[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2021, 171: 111349.
- [27] WANG L, ZHANG H, JIN P, et al. Enhancement of storage quality and antioxidant capacity of harvested sweet cherry fruit by immersion with  $\beta$ -aminobutyric acid[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2016, 118: 71–78.
- [28] 陈艺晖, 林河通, 林艺芬, 等. 拟茎点霉侵染对龙眼果实采后果皮褐变和活性氧代谢的影响[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(23): 4858–4866.
- CHEN Y H, LIN H T, LIN Y F, et al. Effects of *Phomopsis longanae* chi infection on browning and active oxygen metabolism in pericarp of harvested longan fruits[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(23): 4858–4866.
- [29] MA Q L, LIN X, WEI Q J, et al. Melatonin treatment delays postharvest senescence and maintains the organoleptic quality of ‘Newhall’ navel orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by inhibiting respiration and enhancing antioxidant capacity [J]. *Scientia Horticulturae*, 2021, 286: 110236.
- [30] ZHU L Q, YANG R, SUN Y, et al. Nitric oxide maintains postharvest quality of navel orange fruit by reducing postharvest rotting during cold storage by enhancing antioxidant activity [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2020, 113(4): 101589.

### Effects of Chitosan Treatment on Reactive Oxygen Species Metabolism and Cell Membrane Permeability in Postharvest Navel Orange Fruit

Zeng Lingzhen<sup>1,2,3</sup>, Deng Liyan<sup>1,2,3</sup>, Lin Yuzhao<sup>1,2,3</sup>, Lin Hetong<sup>1,2,3</sup>, Lin Yifen<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002

<sup>2</sup>Institute of Postharvest Technology of Agricultural Products, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002

<sup>3</sup>Key Laboratory of Postharvest Biology of Subtropical Special Agricultural Products, Fujian Province University, Fuzhou 350002

**Abstract** In order to develop safe, convenient and low-cost storage technology to improve the storability of postharvest navel orange fruit, and elucidate its possible mechanism, the harvested ‘Newhall’ navel oranges were treated with the chitosan, that is Kadozan with dilution of 1:800 ( $V_{\text{Kadozan}}:V_{\text{Kadozan}+\text{water}}$ ), for 5 min, and the ‘Newhall’ navel oranges soaked in water for 5 min as the control, then the fruit were stored at 80% relative humidity and  $(18 \pm 1)^\circ\text{C}$ . This work was studied the effects of chitosan treatment on the reactive oxygen species (ROS) metabolism and membrane permeability in harvested ‘Newhall’ navel orange fruit. The results exhibited that, compared to control ‘Newhall’ navel oranges, chitosan treatment could better maintain fruit appearance quality and effectively reduce fruit decay of ‘Newhall’ navel oranges during postharvest storage. Additionally, chitosan treatment could effectively suppress the increased cell membrane permeability, the increased contents of superoxide free radical, hydrogen peroxide and malondialdehyde, retain higher activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and catalase, higher contents of glutathione and ascorbic acid, and higher levels of reducing power and 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine free radical scavenging ability in ‘Newhall’ navel oranges during storage. Therefore, the treatment of chitosan, Kadozan with dilution of 1:800 ( $V_{\text{Kadozan}}:V_{\text{Kadozan}+\text{water}}$ ), could effectively enhance the storability of harvested ‘Newhall’ navel orange fruit, which was associated with chitosan treatment enhancing ROS-scavenging ability to reduce the production and accumulation of ROS and malondialdehyde, and then alleviate membrane lipids peroxidation and maintain the better cell membrane structure integrity in postharvest ‘Newhall’ navel orange fruit.

**Keywords** ‘Newhall’ navel orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck. cv. Newhall navel orange); chitosan; active oxygen metabolism; cell membrane permeability; storability