

# 二氧化硫对采后葡萄果皮酚类物质合成及其抗氧化能力的调控作用

姜丽巍<sup>1</sup>, 吴斌<sup>2</sup>, 魏佳<sup>2</sup>, 单晴<sup>1</sup>, 张洁仙<sup>1</sup>, 刘雪艳<sup>1</sup>, 张平<sup>2\*</sup>

(1. 新疆农业大学食品科学与药学学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

(2. 新疆农业科学院农产品贮藏加工研究所, 新疆农产品加工与保鲜重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830091)

**摘要:** 为探究二氧化硫(Sulfur Dioxide, SO<sub>2</sub>)对葡萄果皮酚类物质合成及其抗氧化能力的影响, 该试验以木纳格葡萄为试材, 采用500 μL/L SO<sub>2</sub>熏蒸处理2 h, 以空气熏蒸为对照, 放置于(0±1) °C贮藏44 d。定期测定各酚类物质含量变化, 采用高效液相色谱法测定黄酮醇单体含量。结果表明: 贮藏结束时, SO<sub>2</sub>处理组总酚、总黄酮醇、总黄酮、总花青素、(+)-儿茶素、(-)-表儿茶素、(-)-表没食子儿茶素和(-)-表儿茶素没食子酸酯含量分别是CK组的0.74、1.26、1.33、1.33、1.47、1.79、1.59和1.49倍; 1,1-二苯基-2,2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)自由基清除活性以及铁离子还原能力(FRAP)分别比CK组高13.76%、20.44%和4.98%。SO<sub>2</sub>处理在一定程度上诱导了苯丙氨酸解氨酶基因(*L-Phenylalanine Ammonia-Lyase, PAL*)、肉桂酸-4-羟化酶基因(*Cinnamate 4-Hydroxylase, C4H*)、4-香豆酸-辅酶连接酶基因(*4-Coumarate:CoA Ligase, 4CL*)、查尔酮合酶基因(*Chalcone Synthase, CHS*)、查尔酮异构酶基因(*Chalcone Isomerase, CHI*)、二氢黄酮醇-4-还原酶基因(*Dihydroflavonol 4-Reductase, DFR*)、无色花色素还原酶基因(*Leucoanthocyanin Reductase, LAR*)和花青素还原酶基因(*Anthocyanidin Reductase, ANR*)的表达。可见SO<sub>2</sub>处理可上调相关酚类合成基因的表达量, 延缓酚类化合物含量的下降, 并提高葡萄果皮的抗氧化活性。该试验为研究SO<sub>2</sub>对葡萄采后酚类物质合成的调控提供了理论依据。

**关键词:** 二氧化硫; 葡萄; 果皮; 酚类; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2023)12-169-177

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.12.0010

## Regulatory Effect of Sulfur Dioxide on the Synthesis of Phenolic Substances and Antioxidant Capacity of Postharvest Grape Peel

JIANG Liwei<sup>1</sup>, WU Bin<sup>2</sup>, WEI Jia<sup>2</sup>, SHAN Qing<sup>1</sup>, ZHANG Jiexian<sup>1</sup>, LIU Xueyan<sup>1</sup>, ZHANG Ping<sup>2\*</sup>

(1.School of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

(2.Xinjiang Academy of Agricultural Sciences Agricultural Products Storage and Processing Research Institute, Xinjiang Key Laboratory of Agricultural Products Processing and Preservation, Urumqi 830091, China)

**Abstract:** In order to explore the effect of sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) on the synthesis of phenolic compounds and antioxidant capacity of grape peel, this research used Munage grape as the test material, which was fumigated with 500 μL/L SO<sub>2</sub> for 2 h then stored at (0±1) °C for 44 d. The grape subjected to air fumigation was used as the control. The changes in the contents of phenolic substances were determined regularly, and the content of flavanol monomers was determined by HPLC. The results show that at the end of storage, the contents of total phenols, total flavanols, total flavones, total anthocyanins, (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epicatechin and (-)-epicatechin gallate in the SO<sub>2</sub>-treated group were 0.74, 1.26, 1.33, 1.33, 1.47, 1.79, 1.59 and 1.49 times those of the CK group, respectively. The DPPH· radical scavenging activity, ABTS<sup>+</sup> radical

引文格式:

姜丽巍,吴斌,魏佳,等.二氧化硫对采后葡萄果皮酚类物质合成及其抗氧化能力的调控作用[J].现代食品科技,2023,39(12):169-177

JIANG Liwei, WU Bin, WEI Jia, et al. Regulatory effect of sulfur dioxide on the synthesis of phenolic substances and antioxidant capacity of postharvest grape peel [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(12): 169-177

收稿日期: 2023-01-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(U2003213; 31860460); 新疆维吾尔自治区区域协同创新专项(2021E01005)

作者简介: 姜丽巍(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬贮藏及物流工程, E-mail: 3127818586@qq.com

通讯作者: 张平(1964-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 农产品贮藏与加工, E-mail: zhangpingyys@163.com

scavenging activity and FRAP were higher than the CK group by 13.76%, 20.44% and 4.98% respectively. The SO<sub>2</sub> treatment induced to certain extents the expression of *L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL)*, *Cinnamate 4-hydroxylase (C4H)*, *4-coumarate: CoA ligase (4CL)*, *Chalconesynthase (CHS)*, *Chalcone isomerase (CHI)*, *Dihydroflavonol 4-reductase (DFR)*, *Leucoanthocyanidin reductase (LAR)*, *Anthocyanidin reductase (ANR)* genes. It was found that the SO<sub>2</sub> treatment could up-regulate the expression of phenolic synthesis-related genes, delay the decline in the contents of phenolic compounds, and improve the antioxidant activity of grape peel. This study provided a theoretical basis for studying the regulatory effect of SO<sub>2</sub> on the synthesis of phenolic substances in postharvest grape.

**Key words:** sulfur dioxide; grapes; peel; phenols; antioxidation

木纳格葡萄 (*Vitis vinifera* L.) 因其味美、多汁和富含天然抗氧化剂而深受消费者欢迎<sup>[1]</sup>。鲜食葡萄中的酚类化合物, 如黄烷醇、花青素和类黄酮, 在抗炎、缓解阿尔茨海默症和预防心血管疾病中具有重要作用<sup>[2]</sup>。果皮不仅是葡萄果实抵御外界压力的物理屏障, 且富含丰富的酚类化合物。目前, 关于果皮中酚类含量的研究多集中在葡萄浆果成熟过程中<sup>[3]</sup>, 对采后贮藏中果皮酚类物质含量的变化知之甚少。

黄烷醇是葡萄果皮中丰富的酚类化合物之一, (+)-儿茶素、(-)-表儿茶素、(-)-表没食子儿茶素和(-)-表儿茶素没食子酸酯是黄烷醇的主要组成成分<sup>[4]</sup>。黄烷醇对采后果实品质具有重要作用, 可减少葡萄果实贮藏期间霉菌和酵母菌菌落的生长<sup>[5]</sup>。此外, 黄烷醇含量与抗氧化能力高度相关, 如: 蓝莓果实中黄烷醇含量与 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl, DPPH)、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐[2,2'-Azino-Bis(3-Ethylbenzothiazoline-6)-Sulphonic acid diammonium Salt, ABTS] 自由基清除活性以及铁离子还原能力 (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power, FRAP) 呈显著正相关<sup>[6]</sup>。此外, 高含量的(+)-儿茶素、(-)-表儿茶素和(-)-表没食子儿茶素提高了鲜食葡萄 ABTS<sup>+</sup> 和 DPPH 的清除能力<sup>[7]</sup>。在 1-甲基环丙烯和丙烯处理的李子中, 观察到果皮中(+)-儿茶素和(-)-表儿茶素含量的增加和果肉中(+)-儿茶素和(-)-表儿茶素含量的减少<sup>[8]</sup>。黄烷醇不仅受外源物质的影响, 还受内源基因的调控, 黄烷醇的生物合成是通过苯丙烷途径来完成的。无色花色素还原酶基因 (Leucoanthocyanidin Reductase, LAR) 和花青素还原酶基因 (Anthocyanidin Reductase, ANR) 是黄烷醇合成的关键基因, 受病毒诱导的基因沉默抑制了 TRV-*VvANR* 感染葡萄叶片中 *VvANR* 表达, 降低了(-)-表儿茶素和(-)-表没食子儿茶素的含量<sup>[9]</sup>。UV-B 和 UV-C 辐照诱导了苯丙氨酸解氨酶基因 (L-Phenylalanine Ammonia-Lyase, PAL)、查尔酮合酶基因 (Chalcone Synthase, CHS)、*VvANR* 和 *VvLAR* 的表达, 促进了果皮中(+)-儿茶素、(-)-表儿茶素和(-)-表没食子儿茶素的合成<sup>[10]</sup>。

SO<sub>2</sub> 在葡萄保鲜行业的商业化应用已有近一个世纪<sup>[11]</sup>。SO<sub>2</sub> 对致病菌的抑制作用一直被认为是维持鲜食葡萄采后品质的关键因素<sup>[12]</sup>。前人研究表明 SO<sub>2</sub> 可上调亚硫酸还原酶基因 (*Sulfite Reductase, SiR*)、丝氨酸乙酰转移酶 1 基因 (*Serine Acetyltransferase1, SAT1*)、丝氨酸乙酰转移酶 2 基因 (*Serine Acetyltransferase2, SAT2*) 和 O-乙酰丝氨酸硫醇-裂解酶基因 (*O-Acetylserine Thiol-Lyase, OASTL*) 的表达, 诱导亚硫酸盐还原来维持过氧化氢稳态, 以减少鲜食葡萄中的氧化损伤<sup>[13]</sup>。此外, SO<sub>2</sub> 可增加苯丙氨酸解氨酶 (L-Phenylalanine Ammonia-Lyase, PAL) 酶活性, 上调 *VvCHI* 的表达, 促进鲜食葡萄中总酚和类黄酮的积累<sup>[14]</sup>。然而, SO<sub>2</sub> 是否调节酚类物质合成相关基因的表达以及如何调控的尚不明确。

本研究旨在评价 SO<sub>2</sub> 对木纳格葡萄果皮酚类化合物含量、黄烷醇单体含量及抗氧化活性的影响。通过测定低温贮藏期间酚类化合物生物合成相关基因的表达, 了解采后 SO<sub>2</sub> 对葡萄果皮酚类物质合成的分子调控机制, 可为鲜食葡萄采后保鲜技术的发展提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

商业成熟 (可溶性固形物 TSS ≥ 19%; 可滴定酸 TA ≥ 0.42%) 的木纳格葡萄 (*Vitis vinifera* L. cv 'Munage') 于 2021 年 10 月从新疆阿图什市头塔格提云村的商业葡萄园中采摘, 立即用冷藏车运回实验室。在 (0±1) °C 预冷 12 h。选取大小均匀、无褐变、裂果及病害等损伤的葡萄串, 将大约 3.5 kg 鲜食葡萄有序摆放在内衬无纺布和吸水纸的周转筐 (尺寸 43 cm×30 cm×13 cm) 中, 置于 (0±1) °C 贮藏用于后续试验。

SO<sub>2</sub> 气体 (纯度 ≥ 99.9%), 成都恒源气体有限公司; 没食子酸、芦丁、福林酚, 北京索莱宝科技有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐、2,4,6-三吡啶基三嗪、(+)-

儿茶素、(-)-表儿茶素、(-)-表没食子儿茶素和(-)-表儿茶素没食子酸酯,上海源叶生物科技有限公司;氯化铁、香草醛、亚硝酸钠、三氯化铝、过氧化氢,天津市致远化学试剂有限公司,以上试剂均为分析纯。

RNAprep Pure Plant Plus 试剂盒、Fast Start Essential DNA Green Master Mix 试剂盒,天根生物技术有限公司。

## 1.2 仪器设备

T6-新世纪紫外分光光度计,北京普析通用仪器有限公司; Altus-10 高效液相色谱仪,美国 PerkinElmer 公司; CB4 IQB 凝胶图像分析系统,英国 UVItec 公司; PCV-6000 微型离心机,英国 GRANT 公司; DYY-6 电泳仪,北京六一生物科技有限公司; LightCycler<sup>®</sup>96 实时荧光定量 PCR 仪,瑞士罗氏公司; Eppendorf 高速冷冻离心机,德国 Hettich 科学仪器公司; ML204/02 分析天平,梅特勒托力多国际贸易有限公司; MDF-682 低温冰箱,松下冷链(大连)有限公司。

## 1.3 试验处理方法

样品随机分为两组,每组各 27 筐,每筐约装 3.5 kg 葡萄。在(0±1)℃条件下用 500 μL/L SO<sub>2</sub> 熏蒸箱(体积 80 cm×70 cm×70 cm)熏蒸 2 h,以空气熏蒸为对照。熏蒸后,将所有样品密封在聚乙烯袋中,熏蒸结束后 48 h 取样,之后每隔 7 d 取样一次,直至保存结束。在(0±1)℃、90%~95%相对湿度下保存 44 d。从 3 个筐子中随机选取约 100 粒完整葡萄果实,手工剥取葡萄皮立即放入液氮中,之后用研磨机研磨成粉末于 -80℃保存。共计 15 组样品,用于后续试验。

## 1.4 各指标测定方法

### 1.4.1 总酚、总黄烷醇、总黄酮和总花青素含量的测定

葡萄果皮酚类化合物含量的测定参照 Sheng 等<sup>[7]</sup>的方法,略有改动。称取果皮 1.5 g,加入 5.0 mL 预冷的 φ=80%甲醇(含 2%盐酸),4℃过夜浸提。4℃条件下 10 000 r/min 离心 15 min,上清液用于测定总酚、总黄烷醇、总黄酮和总花青素含量。

#### 1.4.1.1 总酚含量的测定

将 200 μL 提取物混合到 1.0 mL 福林酚试剂中,静置 3 min 后,向混合物中加入 0.8 mL *m*=7.5%无水碳酸钠,加入 9.8 mL 去离子水,暗处放置 1 h 后,于 765 nm 处测定吸光值,每个样品测定三次,以没食子酸(Galic Acid, GAE)为标准,结果以 g/kg GAE 表示。

#### 1.4.1.2 总黄烷醇含量的测定

吸取提取物 100 μL,加入 6.0 mL 40 g/L 的香草醛

-甲醇溶液,缓慢加入 3.0 mL 浓盐酸,30℃避光水浴 30 min,于 500 nm 处测定吸光值,每个样品平行测定三次,以儿茶素(Catechins, CAT)为标准,结果以 g/kg CAT 表示。

#### 1.4.1.3 总黄酮含量的测定

吸取葡萄果皮提取液 100 μL,加入 900 μL 去离子水,加入 150 μL 50 mg/mL 亚硝酸钠溶液,静置 3 min 后,加入 300 μL 100 mg/mL 三氯化铝溶液和 1.0 mL 40 mg/mL 氢氧化钠溶液,于 510 nm 处测定吸光值,每个样品平行测定三次,以芦丁(Rutin, RE)为标准,结果以 g/kg RE 表示。

#### 1.4.1.4 总花青素含量的测定

吸取提取物 500 μL 和 2.0 mL 两种不同的缓冲液(pH 值 1.0, 0.025 mol/L 氯化钾和 pH 值 4.5, 0.4 mol/L 醋酸钠)分别混合均匀,在暗处放置 15 min 后,在 510 nm 和 700 nm 处测定吸光值,结果以每千克样品的矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(Cyanidin-3-O-Glucoside, C3G)的克数表示,即 g/kg C3G,每个样品平行测定三次。

## 1.4.2 黄烷醇单体含量的测定

(+)-儿茶素、(-)-表儿茶素、(-)-表没食子儿茶素和(-)-表儿茶素没食子酸酯的测定参照 Liang 等<sup>[15]</sup>方法,略有修改。取 0.5 g 样品加入 5.0 mL φ=70%甲醇(含 2%甲酸)中,混合后超声提取 30 min。4℃浸渍 12 h 后,在 12 000 r/min 下 4℃离心 20 min。上清液经 0.45 μm 有机微孔过滤膜过滤,采用高效液相色谱法, C18 柱(250 mm×4.6 mm×5 μm)分析。以 φ=0.2%甲酸水溶液为溶剂 A,甲醇为溶剂 B,梯度曲线: 92.5% A 持续 5 min, 75% A 到 55% A 持续 5~10 min, 55% A 到 35% A 持续 10 min。设置进样量 10 μL,柱温 30℃。流速为 1.0 mL/min,洗脱峰在 280 nm 处。按标准曲线计算(+)-儿茶素、(-)-表儿茶素、(-)-表没食子儿茶素和(-)-表儿茶素没食子酸酯的含量,各样品均平行测定三次,结果用 g/kg 表示。

## 1.4.3 DPPH 自由基清除活性的测定

葡萄果皮 DPPH·清除率的测定参照 Shen 等<sup>[16]</sup>的方法,略修改。吸取上述 1.4.1 中的提取物 100 μL 加入到含有 2.9 mL 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液(甲醇制备)中,30℃黑暗环境下孵育 30 min,于 517 nm 处测定吸光值 *A*<sub>1</sub>,以 100 μL φ=80%甲醇和 2.9 mL DPPH 甲醇溶液作为空白对照测定吸光值 *A*<sub>0</sub>,平行测定三次,计算公式如下。

$$C = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

$A_0$ —空白对照组测定的吸光值;

$A_1$ —实验组测定的吸光值;

$C$ —DPPH 自由基清除率, %。

#### 1.4.4 ABTS<sup>+</sup>自由基清除活性的测定

ABTS<sup>+</sup>清除率的测定参照 Re 等<sup>[17]</sup>的方法测定。将 7.5 μmol/L ABTS<sup>+</sup>溶液和 2.5 μmol/L 的过硫酸钾按体积 1:1 混合均匀, 暗处反应 16 h, 用无水乙醇稀释混合液在 734 nm 处的吸光值为 0.7, 作为测试液。吸取上述 1.4.1 中的提取物 100 μL 加入到 3.2 mL ABTS<sup>+</sup>测试液中, 暗处放置 6 min 后, 于 734 nm 处测定吸光度, 平行测定三次。

#### 1.4.5 FRAP 还原能力的测定

FRAP 的测定参考 Benzie 等<sup>[18]</sup>的方法, 略改动。0.1 mol/L 乙酸盐缓冲液 (pH 值 3.6)、10 mmol/L 2,4,6-三(2-吡啶基)-1,3,5-三嗪和 20 mmol/L 氯化铁按 10:1:1

(V/V/V) 比例混合来制备 FRAP 试剂, 吸取上述 1.4.1 中的提取物 100 μL 加入到 4.9 mL FRAP 试剂中, 在 37 °C 孵育 10 min, 于 593 nm 处测定吸光值, 平行测定三次, 以硫酸亚铁为标准计算 FRAP 值。

#### 1.4.6 酚类合成基因表达量的测定

按照 RNAprep Pure Plant Plus 试剂盒说明书中的方法从葡萄果皮中提取总 RNA。使用微量核酸分光光度计评估提取 RNA 的质量, 随后, 用 TIANScript II RT 试剂盒进行 cDNA 合成。从国家生物技术信息中心 (NCBI) 鉴定酚类生物合成相关基因的核苷酸序列, 设计特异性引物, 并由生物有限公司合成。使用实时荧光定量 PCR 仪, 参照 Fast Start Essential DNA Green Master Mix 说明书进行 RT-qPCR。*VvActin* 作为参考基因, 基因的相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法计算<sup>[19]</sup>, 本研究使用的引物序列及登录号见表 1。

表 1 酚类合成相关基因引物序列

Table 1 Sequence of primers related to phenolic synthesis

| 基因             | 登录号            | 正向引物(5'-3')            | 反向引物(5'-3')            |
|----------------|----------------|------------------------|------------------------|
| <i>VvPAL</i>   | NM_001397918.1 | CATCGAACGGGAGATCAACT   | TGATGGCAGTCCATTGTTGT   |
| <i>VvCH</i>    | XM_002266202.3 | AAAGGGTGGGCAGTTGAGTT   | GGGGGGTGAAAGGAAGATAT   |
| <i>Vv4CL</i>   | XM_002274958.4 | ACCACCTCCCTCTCCACAC    | GCTCCGAGAAAGGAGAACG    |
| <i>VvCHS</i>   | NM_001280950.1 | CAGGCAGACTACCCGGATT    | ACAGACGTTGGGGTTCTCC    |
| <i>VvCHI</i>   | NM_001281104.1 | GTGTCAGACAATTGTGTGTCCT | ATCACTGCATTCCCAACTTCTG |
| <i>VvDFR</i>   | NM_001281215.2 | ATTGAAGGGATGTTGGGCA    | GAGTCGGTATGATAGTGATG   |
| <i>VvLAR</i>   | NM_001281160.1 | ATTGGACCAGCTCACCTAG    | GCCTCCTCAATGAACCGTCT   |
| <i>VvANR</i>   | NM_001280956.1 | TTGATGGGACAGGCTCGGTTG  | AGTGTCTTGGAGGCAGGATAGC |
| <i>VvActin</i> | AB073011.1     | GATTCTGGTGATGGTGTGAGT  | GACAATTTCCTTCAGCAGT    |

## 1.5 数据分析

使用 GraphPad Prism 8.0 软件作图, SPSS 20.0 进行分析数据, 采用配对  $t$  检验进行显著性分析。其中  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 SO<sub>2</sub> 对葡萄果皮总酚、总黄烷醇、总黄酮和总花青素含量的影响

SO<sub>2</sub> 对葡萄果皮总酚含量有影响, 在贮藏前 16 d SO<sub>2</sub> 处理组和对照组无显著差异。总体呈下降-上升-下降趋势 (图 1a)。贮藏结束时, SO<sub>2</sub> 处理组总酚含量为 42.05 g/kg, 比对照组高 10.28%。这与 SO<sub>2</sub> 处理的玫瑰香葡萄结果是类似的<sup>[14]</sup>。SO<sub>2</sub> 处理对葡萄果皮总黄烷醇含量的影响如图 1b 所示, 葡萄果皮总黄烷醇含

量总体呈先上升后下降趋势, 在贮藏 2 d 后 SO<sub>2</sub> 处理组和对照组间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。贮藏至第 9 天时对照组总黄烷醇含量为 27.15 g/kg, SO<sub>2</sub> 处理组比对照组高 10.55%。吴敏等<sup>[20]</sup>基于代谢组学解析发现, SO<sub>2</sub> 可显著调控类黄酮的生物合成。在我们的研究中, 对照组葡萄果皮的总黄酮含量在贮藏期间呈下降趋势 (图 1c), 在贮藏 2 d 后 SO<sub>2</sub> 处理组均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。贮藏结束时, SO<sub>2</sub> 处理组葡萄果皮的总黄酮含量比初始值低 38.53%, 是对照组的 1.33 倍。贮藏期间总花青素含量的变化如图 1d 所示, 呈上升-下降-上升-下降趋势。除第 9 天外, SO<sub>2</sub> 处理组与对照组均存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。峰值出现在第 9 天和第 23 天, 其中, 第 23 天 SO<sub>2</sub> 处理组比对照组高 20.24%。贮藏至第 44 天, SO<sub>2</sub> 处理组比对照组高 33.12%。此外, SO<sub>2</sub> 也可调控红地球葡萄的总花青素含量<sup>[21]</sup>。综上所述, SO<sub>2</sub> 可在一定程度上延缓酚类化合物含量的下降。

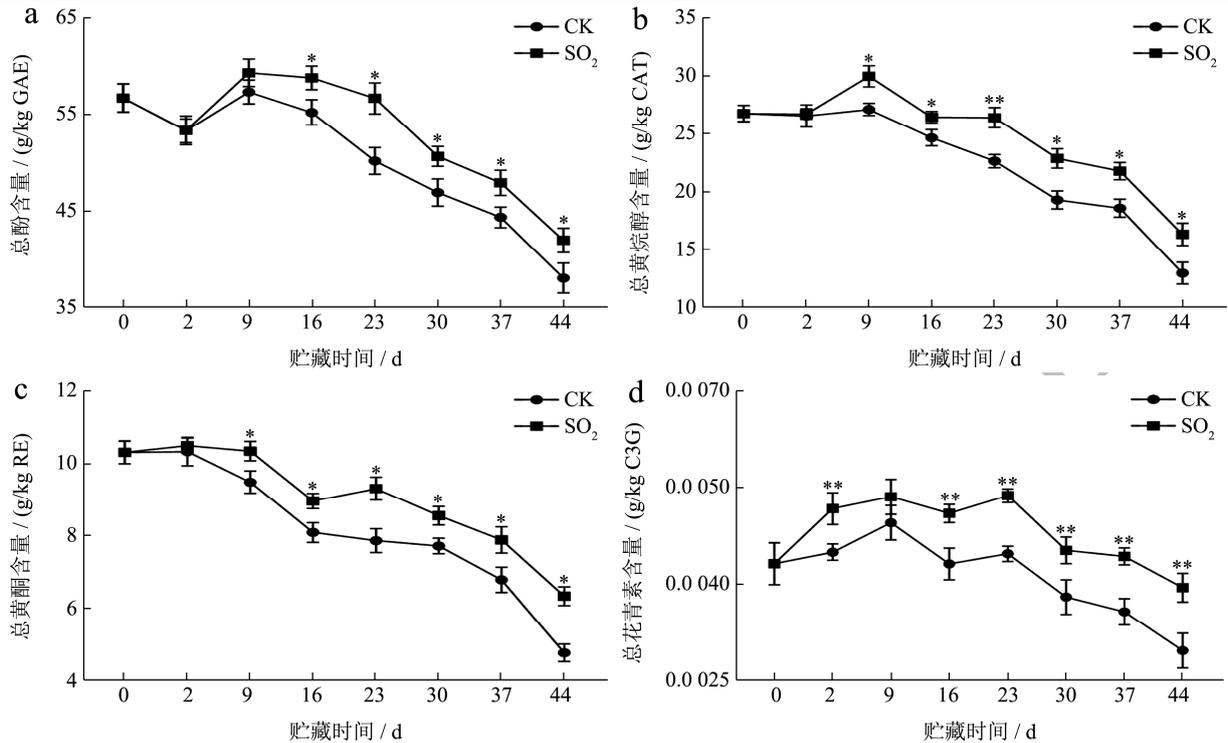


图1 SO<sub>2</sub>对葡萄果皮总酚(a)、总黄烷醇(b)、总黄酮(c)和总花青素(d)含量的影响

Fig.1 Effects of SO<sub>2</sub> on the contents of total phenols (a), total flavanols (b), total flavones (c) and total anthocyanins (d) in grape peel

注: \*\*表示 P<0.01, 差异极显著; \*表示 P<0.05, 差异显著。下同。

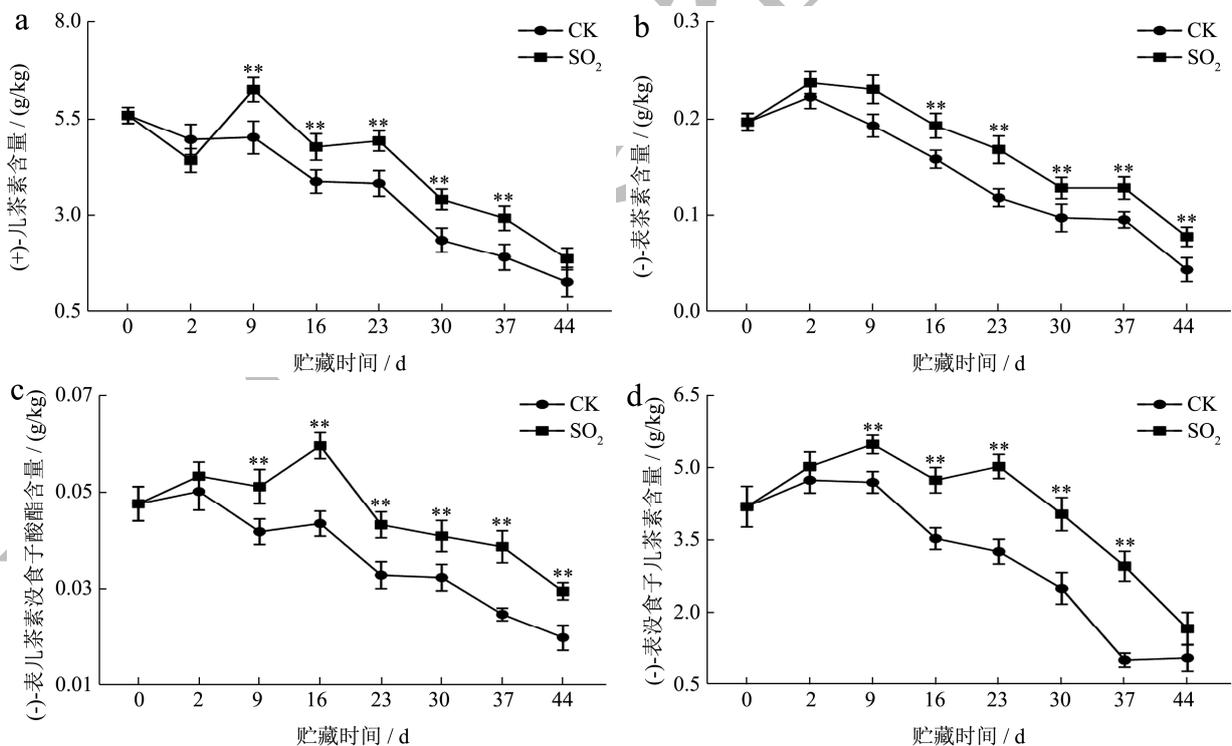


图2 SO<sub>2</sub>对葡萄果皮黄烷醇单体含量的影响

Fig.2 Effect of SO<sub>2</sub> on flavanol monomer content in grape peel

## 2.2 SO<sub>2</sub>对葡萄果皮黄烷醇单体含量的影响

黄烷醇是葡萄果皮中丰富的酚类化合物之一, Souquet 等<sup>[22]</sup>从葡萄果皮提取物中鉴定出四种主要的

黄烷醇单体, (+)-儿茶素、(-)-表儿茶素、(-)-表儿茶素没食子酸酯和(-)-表没食子儿茶素。因此, 本研究检测了葡萄果皮中这四种黄烷醇单体含量。实验发现, SO<sub>2</sub>对(+)-儿茶素、(-)-表儿茶素、(-)-表儿茶素没食子酸酯

和(-)-表没食子儿茶素均具有一定的调控作用。如图2a所示,SO<sub>2</sub>处理可显著提高9~37 d (+)-儿茶素的含量( $P<0.05$ ),第9天出现峰值,SO<sub>2</sub>处理组比对照组高24.55%。在贮藏期间(-)-表儿茶素含量呈先上升后下降趋势(图2b),贮藏结束时,SO<sub>2</sub>处理组是对照组的1.79倍,为初始值的39.54%。由图2c可以看出,(-)-表儿茶素没食子酸酯含量在贮藏期间呈先上升后下降趋势,峰值出现在第16天,SO<sub>2</sub>处理组是对照组的1.37倍。除第2天和第44天SO<sub>2</sub>处理均显著提高了(-)-表没食子儿茶素含量,第9天出现峰值(图2d),SO<sub>2</sub>处理组比对照组高16.92%。这与卫颖等<sup>[23]</sup>对极早蜜葡萄的研究结果一致。四种黄烷醇单体中(+)-儿茶素含量最高,初始值为5.60 g/kg,(-)-表儿茶素没食子酸酯含量最低,初始含量为0.05 g/kg。在‘夏黑’葡萄中(+)-儿茶素含量最高,但未检测到(-)-表没食子儿茶素<sup>[7]</sup>,这可能是由于葡萄品种差异造成的。

### 2.3 SO<sub>2</sub>对葡萄果皮抗氧化能力的影响

葡萄果皮的酚类物质含量和种类与其抗氧化活性密切相关<sup>[24]</sup>。为了评价木纳格葡萄果皮酚类物质的抗氧化效果,本试验采用DPPH·清除率、ABTS<sup>+</sup>清除率和FRAP来评价SO<sub>2</sub>处理后酚类提取物的抗氧化能力。除第2天外,SO<sub>2</sub>处理组DPPH·清除率均显著高于对照组( $P<0.05$ )。DPPH·清除率呈先上升后下降趋势(图3a),贮藏至第16天时DPPH·清除率出现峰值,SO<sub>2</sub>处理组DPPH·清除率为43.73%,比对照组高6.16%。贮藏期间对照组葡萄果皮ABTS<sup>+</sup>清除率呈不断下降趋势(图3b),与总黄烷醇、总黄酮和(-)-表儿茶素含量变化趋势相一致,说明ABTS<sup>+</sup>清除率与总黄烷醇、总黄酮和(-)-表儿茶素含量可能相关。这与Sheng等<sup>[7]</sup>对‘夏黑’葡萄的研究结果一致。除第2天外,ABTS<sup>+</sup>清除率处理组均显著高于对照组( $P<0.05$ )。第44天,对照组ABTS<sup>+</sup>清除率为10.87%,SO<sub>2</sub>处理组是对照组的1.20倍。在贮藏期间SO<sub>2</sub>处理组葡萄果皮FRAP均显著高于对照组(图3c)。FRAP变化趋势与总花青素含量变化相似,说明FRAP可能与花青素含量有关。贮藏结束时,SO<sub>2</sub>处理组FRAP比对照组高4.98%,是初始值的1.05倍。综上所述,与对照组相比,SO<sub>2</sub>处理组葡萄果皮在贮藏期间表现出更高水平的抗氧化能力,这可能是由于SO<sub>2</sub>处理提高了各酚类化合物含量。茉莉酸甲酯处理后龙眼果皮总酚和总黄酮含量的增加和DPPH·清除率的提高与本实验结果一致<sup>[25]</sup>。

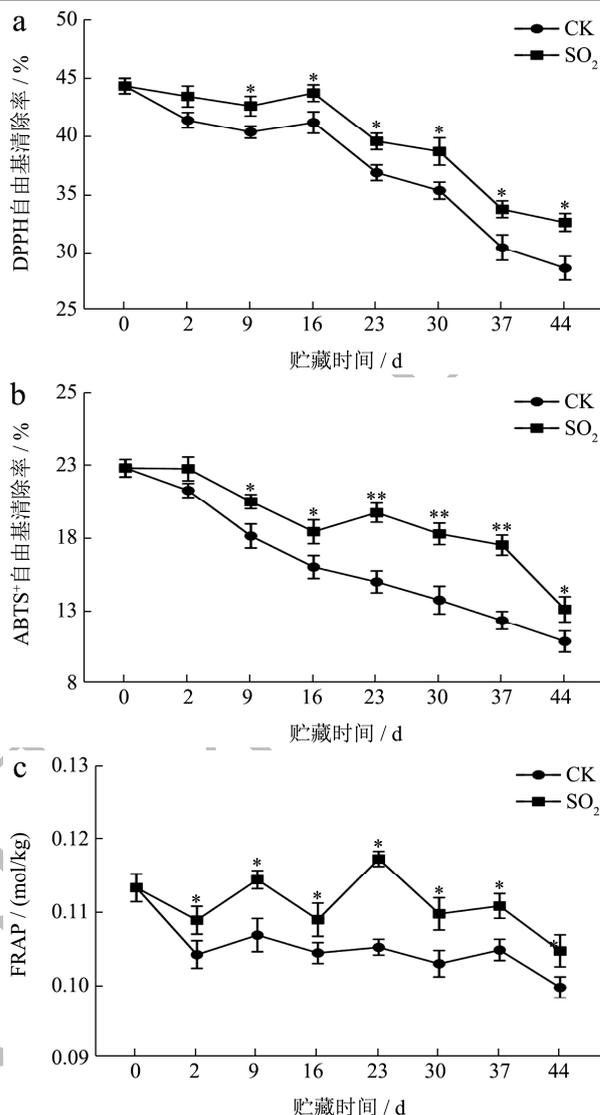


图3 SO<sub>2</sub>对葡萄果皮抗氧化能力的影响

Fig.3 Effect of SO<sub>2</sub> on antioxidant capacity of grape peel

### 2.4 SO<sub>2</sub>对葡萄果皮酚类合成基因表达量的影响

在SO<sub>2</sub>处理的葡萄果皮中检测到较高水平的酚类化合物,这取决于SO<sub>2</sub>诱导的苯丙烷途径<sup>[14]</sup>。PAL、肉桂酸-4-羟基化酶(Cinnamate 4-Hydroxylase, C4H)和4-香豆酸-辅酶连接酶(4-Coumarate: CoA Ligase, 4CL)是苯丙烷途径中三种重要的酶<sup>[26]</sup>。如图4a所示,葡萄果皮*VvPAL*表达量在2 d、23 d、30 d和37 d SO<sub>2</sub>处理组均显著高于对照组( $P<0.01$ )。处理组分别为对照组的1.82倍、1.36倍、1.33倍和1.36倍。SO<sub>2</sub>处理组肉桂酸-4-羟基化酶基因(Cinnamate 4-Hydroxylase, C4H)表达量在2 d、16 d、37 d和44 d与对照组有显著差异( $P<0.05$ ),SO<sub>2</sub>处理组第16天表达量最高为5.58,是对照组的15.5倍(图4b)。由图4c所知,SO<sub>2</sub>处理组4-香豆酸-辅酶连接酶基因

(4-Coumarate:CoA Ligase, 4CL) 表达量除第 2 天和第 30 天外均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 第 16 天表达量为 5.77, 比处理组高 387.08%, 这可能是第 16 天  $SO_2$  处理组总酚含量显著高于对照组的原因。在本研究中  $SO_2$  处理可能通过上调  $VvPAL$ 、 $VvC4H$  和  $Vv4CL$  在果皮中的表达, 而延缓总酚和总黄酮的下降。茉莉酸甲酯通过增强  $LbPAL$ 、 $LbC4H$  和  $Lb4CL$  的表达, 提高了百合总酚和总黄酮含量与本研究结果一致<sup>[27]</sup>。

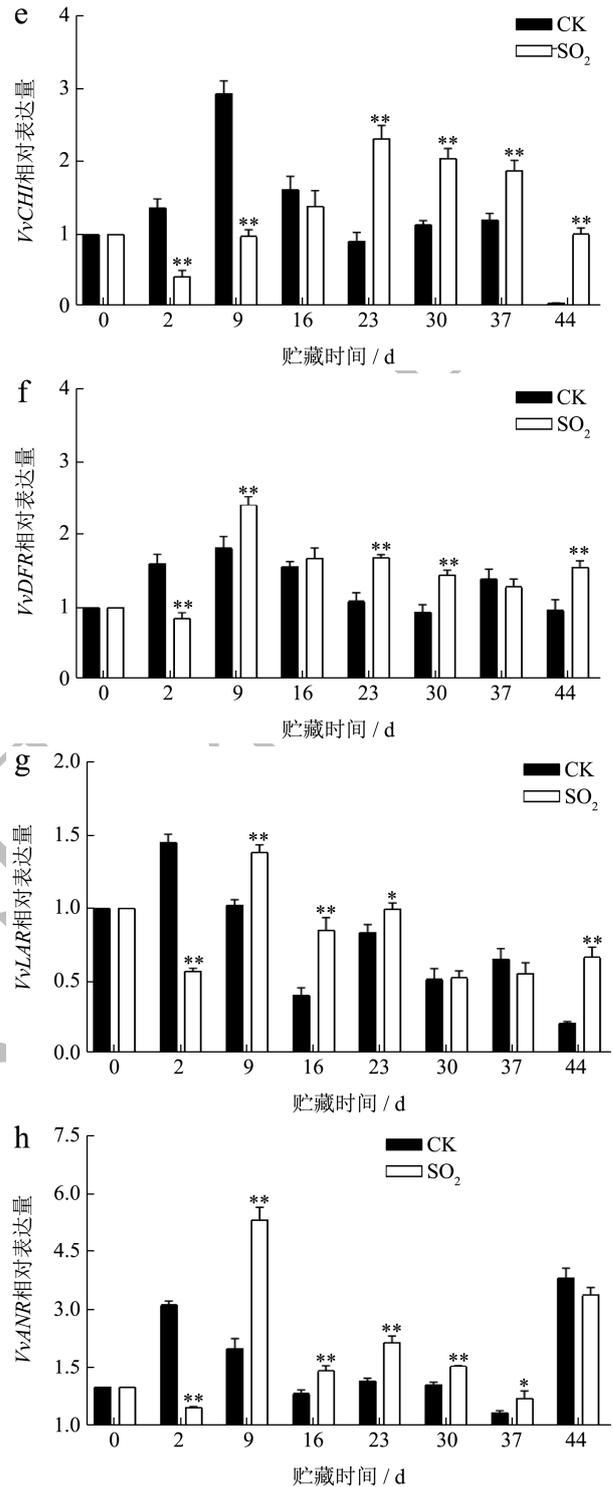
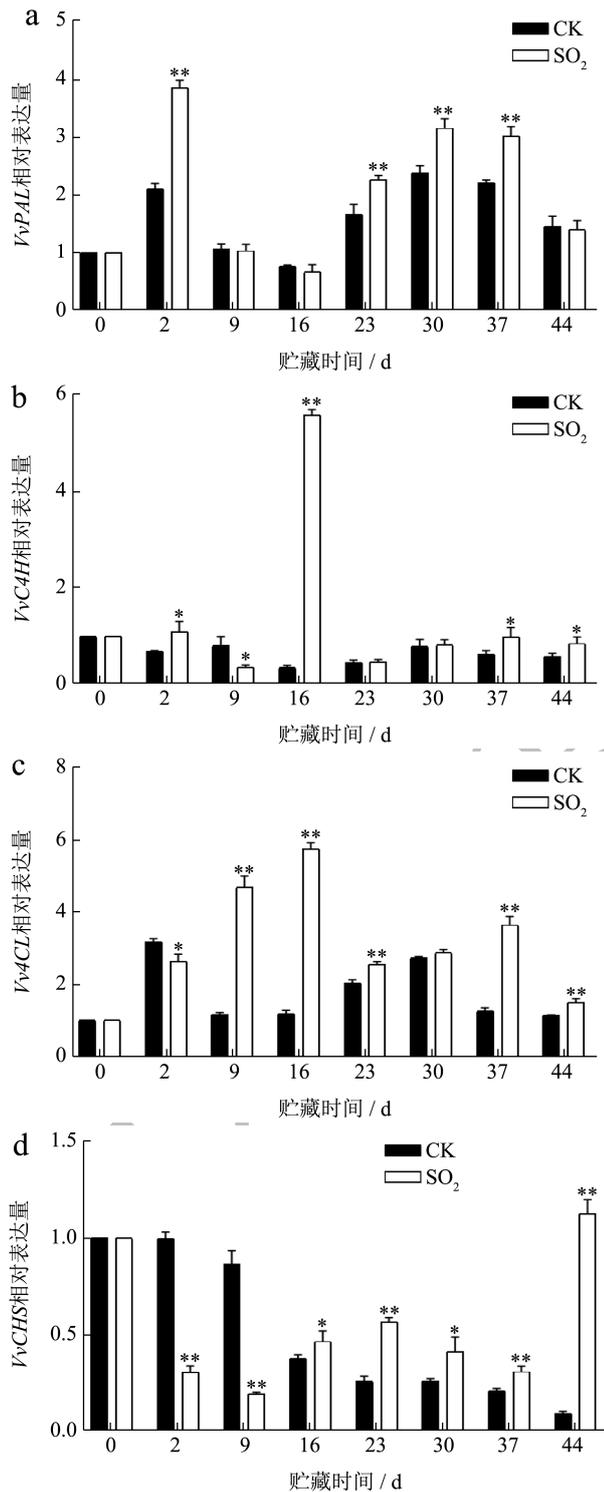


图 4  $SO_2$ 对葡萄果皮酚类合成基因表达量的影响

Fig.4 Effect of  $SO_2$  on the expression of grape peel phenols synthesis genes

$VvPAL$ 、 $VvC4H$  和  $Vv4CL$  是苯丙烷途径开始的第一步基因,可能影响下游基因  $VvCHS$ 、 $VvCHI$ 、 $VvDFR$ 、 $VvLAR$  和  $VvANR$  的表达。对照组  $VvCHS$  的表达量在贮藏前 16 d 无明显变化 (图 4d), 贮藏至第 44 天时,  $SO_2$  处理组表达量最高为 1.12, 是对照组的 12.11 倍。

由图 4e 可知, 查尔酮异构酶基因(Chalcone Isomerase, CHI) 表达量在 16 d 之后 SO<sub>2</sub> 处理组均显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 第 44 天对照组几乎不表达, SO<sub>2</sub> 处理组是对照组的 20.31 倍。同样, 观察到 SO<sub>2</sub> 处理组酚类物质含量均显著高于对照组。*VvCHS* 和 *VvCHI* 的表达可能为酚类合成提供了前体物质, 这与褪黑素处理的‘Kyoho’葡萄结果相似<sup>[28]</sup>。值得一提的是, 对照组 *VvCHS* 和 *VvCHI* 的表达在第 2 天和第 9 天均显著增加, 而 SO<sub>2</sub> 处理组显著抑制了二者的表达 ( $P < 0.01$ )。说明 SO<sub>2</sub> 可以诱导 *VvCHS* 和 *VvCHI* 的表达, 但这种诱导具有时间效应。

如图 4f 所示, SO<sub>2</sub> 处理组二氢黄酮醇-4-还原酶基因(Dihydroflavonol 4-Reductase, DFR) 表达量仅在第 2 天显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 这与 SO<sub>2</sub> 对总花青素的调控模式类似, SO<sub>2</sub> 处理组 *VvDFR* 的表达总体呈先上升后下降趋势, 峰值出现在第 9 天, SO<sub>2</sub> 处理组比对照组高 32.33%。DFR 是花青素生物合成的限速酶, 控制花青素合成途径的碳通量方向, 从而影响花青素的含量<sup>[29]</sup>。在 UV-C 处理的甜樱桃中观察到 *PaDFR* 的表达增强, 促进了花青素的生物合成<sup>[26]</sup>。因此, 推测 SO<sub>2</sub> 处理总花青素含量高于对照组可能是因为 *VvDFR* 的表达量提高。

在图 4g 中, SO<sub>2</sub> 处理的 *VvLAR* 表达量在第 9、16、23 和 44 天均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 分别比对照组高 36.28%、113.01%、19.10% 和 221.91%。同时, 也相应提高了(-)表儿茶素和(-)表儿茶素没食子酸酯的含量。由图 4h 可知, 除第 2 天和第 44 天, 贮藏期间 SO<sub>2</sub> 处理组 *VvANR* 表达量均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 且与(+)-儿茶素和(-)表没食子儿茶素含量变化趋势总体一致, SO<sub>2</sub> 处理组第 9 天表达量为 5.32, 比对照组高 164.09%。这与 Liang 等<sup>[15]</sup>对‘早黑宝’葡萄的研究结果类似。LAR 和 ANR 是负责黄烷醇合成的关键酶<sup>[9]</sup>。SO<sub>2</sub> 处理可通过诱导 *VvANR* 和 *VvLAR* 的表达, 提高果皮中黄烷醇的含量。有类似的研究表示可以通过调节 *VvANR*、*VvLARI* 和 *VvLAR2* 的表达, 而提高葡萄叶片中黄烷醇含量<sup>[9]</sup>。因此, SO<sub>2</sub> 的应用可能是诱导 *VvANR* 和 *VvLAR* 的表达促进葡萄果皮黄烷醇合成的有效方式。

### 3 结论

SO<sub>2</sub> 处理可激活木纳格葡萄果皮的苯丙烷代谢途径。SO<sub>2</sub> 处理可通过上调 *VvPAL*、*VvCAH*、*VvACL*、*VvCHS*、*VvCHI*、*VvDFR*、*VvLAR* 和 *VvANR* 的表达, 延缓果皮中总酚、总黄烷醇、总黄酮和总花青素含量的下降, 增加黄烷醇单体(+)-儿茶素、(-)表儿茶素、

(-)表没食子儿茶素和(-)表儿茶素没食子酸酯的含量, 维持采后葡萄果皮的抗氧化能力。然而, 酚类化合物单体众多且结构复杂, SO<sub>2</sub> 对其他酚类化合物单体的调控作用仍有待进一步研究。且不同浓度 SO<sub>2</sub> 对酚类化合物的影响尚不明确, 本研究为 SO<sub>2</sub> 在葡萄果实采后酚类化合物合成方面的研究提供理论依据。

### 参考文献

- [1] 闫波雯,袁宇尧,魏佳,等.二氧化硫对葡萄采后有机酸含量及苹果酸代谢途径的调控作用[J].现代食品科技,2020,36(7):133-141.
- [2] 徐洁,王君,谭欣同,等.食源性黄酮类化合物调控自噬干预疾病的研究进展[J].食品工业科技,2020,41(16):326-333.
- [3] 孙永蓉,宫鹏飞,李蔚,等.茉莉酸甲酯处理对‘黑比诺’葡萄果皮酚类物质及其抗氧化活性的影响[J].食品与发酵工业,2021,47(12):196-202.
- [4] Zerbib M, Cazals G, Enjalbal C, et al. Identification and quantification of flavanol glycosides in *Vitis vinifera* grape seeds and skins during ripening [J]. *Molecules*, 2018, 23(11): 2745.
- [5] Eshghi S, Karimi R, Shiri A, et al. Effects of polysaccharide-based coatings on postharvest storage life of grape: Measuring the changes in nutritional, antioxidant and phenolic compounds [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2022, 16(2): 1159-1170.
- [6] Arancibia-Avila P, Namiesnik J, Toledo F, et al. The influence of different time durations of thermal processing on berries quality [J]. *Food Control*, 2012, 26(2): 587-593.
- [7] Sheng K, Zheng H, Shui S, et al. Comparison of postharvest UV-B and UV-C treatments on table grape: Changes in phenolic compounds and their transcription of biosynthetic genes during storage [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2018, 138: 74-81.
- [8] Faruq M, Tajima H, Lemo L A, et al. Changes in ethylene and sugar metabolism regulate flavonoid composition in climacteric and non-climacteric plums during postharvest storage [J]. *Food Chemistry*, 2022, 4(30): 100075.
- [9] Liang C, Yang B, Wei Y, et al. SA incubation induced accumulation of flavan-3-ols through activated *VvANR* expression in grape leaves [J]. *Scientia Horticulturae*, 2021, 287(20): 110269.
- [10] Sheng K, Shui S, Yan L, et al. Effect of postharvest UV-B or UV-C irradiation on phenolic compounds and their transcription of phenolic biosynthetic genes of table grapes [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2018, 55(8):

- 3292-3302.
- [11] Jacob H E, Winkler A J. The utilization of sulfur dioxide in the marketing of grapes [J]. *Hilgardia*, 1925, 1(6): 107-131.
- [12] Guzev L, Danshin A, Zahavi T, et al. The effects of cold storage of table grapes, sulphur dioxide and ethanol on species of black *Aspergillus* producing ochratoxin A [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2008, 43(7): 1187-1194.
- [13] Zhang Z, Wu Z H, Yuan Y Y, et al. Sulfur dioxide mitigates oxidative damage by modulating hydrogen peroxide homeostasis in postharvest table grapes [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2022, 188: 111877.
- [14] Xue M Z, Yi H L. Induction of disease resistance providing new insight into sulfur dioxide preservation in *Vitis vinifera* L. [J]. *Scientia Horticulturae*, 2017, 225(18): 567-573.
- [15] Liang C M, Guo J Y, Chen M X, et al. *VvMYBPA2* regulated the accumulation of flavan-3-ols through forming a trimeric complex in 'Zaoheibao' grape [J]. *Agriculture*, 2022, 12(9): 1414.
- [16] Shen Y, Sun Y J, Qiao L P, et al. Effect of UV-C treatments on phenolic compounds and antioxidant capacity of minimally processed *Satsuma mandarin* during refrigerated storage [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2013, 76: 50-57.
- [17] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26(9-10): 1231-1237.
- [18] Benzie I F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay [J]. *Anal Biochem*, 1996, 239(1): 70-76.
- [19] 余舜武,刘鸿艳,罗利军.利用不同实时定量 PCR 方法分析相对基因表达差异[J].*作物学报*,2007,7:1214-1218.
- [20] 吴敏,张健,玛依努尔·扎衣提,等.基于代谢组学解析 SO<sub>2</sub> 对鲜食葡萄贮藏品质的调控作用[J/OL].*食品与发酵工业*: 1-12[2023-03-14].DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.033073.
- [21] 张磊,许静,魏佳,等.二氧化硫(SO<sub>2</sub>)熏蒸对葡萄果实结构和花色素苷含量的影响[J].*食品工业科技*,2018,39(10):292-297.
- [22] Souquet J M, Cheynier V, Brossaud F, et al. Polymeric proanthocyanins from grape skins [J]. *Phytochemistry*, 1996, 43(2): 509-512.
- [23] 卫颖,杨波,李敏,等.水杨酸对葡萄果实酚类物质积累的影响[J].*山西农业科学*,2021,49(5):554-559.
- [24] 李小娟,聂钰洪,刘琦琦,等.鲜食葡萄品种多酚类物质含量及抗氧化活性分析[J].*北方园艺*,2017,21:37-42.
- [25] 薛鹏宇,殷菲彤,刘云芬,等.茉莉酸甲酯(MeJA)处理对采后龙眼果皮褐变的影响[J].*食品科学*,2023,44(5):169-178.
- [26] Zhang Q, Yang W B, Liu J C, et al. Postharvest UV-C irradiation increased the flavonoids and anthocyanins accumulation, phenylpropanoid pathway gene expression, and antioxidant activity in sweet cherries (*Prunus avium* L.) [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2021, 175: 111490.
- [27] Liu Y J, Tang Y C, Zhang W L, et al. Postharvest methyl jasmonate treatment enhanced biological activity by promoting phenylpropanoid metabolic pathways in *Lilium brownii* var. *viridulum* [J]. *Scientia Horticulturae*, 2023, 308(27): 111551.
- [28] Wang L, Luo Z, Yang M, et al. Role of exogenous melatonin in table grapes: First evidence on contribution to the phenolics-oriented response [J]. *Food Chemistry*, 2020, 329(1): 127155.
- [29] Miyagawa N, Miyahara T, Okamoto M, et al. Dihydroflavonol 4-reductase activity is associated with the intensity of flower colors in *Delphinium* [J]. *Plant Biotechnology*, 2015, 32(3): 249-255.