

不同溶质型桃果实成熟过程中酚类代谢与抗氧化能力的研究

阚娟, 林仙佩, 万冰, 金昌海

(扬州大学食品科学与工程学院, 江苏扬州 225127)

摘要: 以不同溶质型桃果实“加纳岩”和“雨花三号”为试材, 测定两个品种桃果实在树体成熟过程中的多酚含量、类黄酮含量以及苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia lyase, PAL)、过氧化物酶 (peroxidase, POD)、多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 活性变化, 并采用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 法及 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS) 法对其抗氧化能力进行评价。结果表明: “加纳岩”桃果实的多酚含量和类黄酮含量在成熟过程中均显著高于“雨花三号”桃果实; 软溶质型“雨花三号”桃 PPO 活力高于硬溶质型“加纳岩”桃, 但前者 POD 及 PAL 活力低于后者, 其中“加纳岩”桃 PAL 活力初期高, 成熟过程中与多酚含量呈正相关, “雨花三号”桃 PAL 活力呈上升趋势, 与多酚含量无显著相关性; DPPH 法和 ABTS 法均表明“加纳岩”桃抗氧化能力高于“雨花三号”桃。

关键词: 桃; 苯丙氨酸解氨酶; 过氧化物酶; 多酚氧化酶; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2017)6-74-79

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.011

Study of Phenolic Metabolism and Antioxidant Activities of Two Peach Cultivars during Maturation

KAN Juan, LIN Xian-pei, WAN Bing, JIN Chang-hai

(College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

Abstract: The peach (*Prunus persica*) cultivars, Jianayan and Yuhua 3 were used in determining the changes in the total phenol and flavonoid content, and the activities of phenylalanine ammonia lyase (PAL), peroxidase (POD), and polyphenol oxidase (PPO) in the process of fruit ripening, and evaluating the antioxidant capacity of the peach fruits by DPPH and ABTS assays. The total phenol content and flavonoid content of Jianayan were significantly higher than those of Yuhua 3 during the maturation process. PPO activity in the melting-flesh Yuhua 3 peach fruits was higher than that in the non-melting-flesh Jianayan peach fruits; however, the activities of POD and PAL in Yuhua 3 were lower than those in Jianayan. PAL activity in Jianayan was high at the beginning of the maturation process, and there was a positive correlation with polyphenols. PAL activity in Yuhua 3 showed an increasing trend during the maturation process, and there is no significant correlation between PAL activity and polyphenol content; DPPH and ABTS assay methods showed that the antioxidant capacity of the Jianayan peach cultivar was higher than that of the Yuhua 3 peach cultivar.

Key words: peach cultivars; phenylalanine ammonia lyase; peroxidase; polyphenol oxidase; antioxidant ability

桃果实中的酚类物质是在其生长代谢中的次生产物, 酚类物质对人体有着重要的生理功能。酚类物质的合成代谢是一个由许多生化反应组成的网络, 这些

收稿日期: 2016-07-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31101586); 江苏省科技计划项目资助 (BC2013401); 江苏省自然科学基金项目 (BK2010310); 扬州大学科技创新培育基金 (2016CXJ105)

作者简介: 阚娟 (1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 农产品贮藏与加工

通讯作者: 金昌海 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品贮藏与加工

网络又由很多酶来催化。果蔬酚类代谢途径中主要由苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、多酚氧化酶 (PPO) 和过氧化物酶 (POD) 三种酶的参与, 其中 PAL 是催化苯丙烷类代谢第一步反应的酶, 也是酚类物质代谢网络上游的关键限速酶。有研究表明品种和成熟度对植物组织中相关生物活性物质有一定影响。Ullah 等^[1]人认为品种对桃果实的抗氧化酶类有重要影响。Abidi 等^[2]人发现基因型对增强抗氧化能力有明显的作用。Wang 等^[3]对黑莓的研究表明相比于成熟度而言, 品种对果实的抗氧化能力影响更为显著。果蔬中抗氧化活性物质种类多样, 包括维生素, 多酚以及黄酮等^[4]。

Maisuthisakul 等^[5]人认为植物体内的酚类物质与抗氧化活性直接相关。Thaipong 等^[6]人利用 DPPH、ABTS、FRAP 和 ORAC 法分析评估了番石榴果实提取物的抗氧化活性。采用不同方法测定抗氧化能力时结果有差异,且对某些产品不同方法测定结果之间无相关性。

目前对不同溶质型桃果实成熟过程中酚类物质积累、酚类代谢的关键酶及抗氧化能力的比较研究还未见报道。本研究以硬溶质型桃果实“加纳岩”及软溶质型桃果实“雨花三号”为试材,通过测定不同溶质型桃果实成熟过程中多酚、类黄酮含量、酚类代谢相关酶活力等相关指标,研究桃果实成熟过程中酚类代谢及抗氧化的变化,为不同溶质型桃果实成熟过程中的酚类代谢及抗氧化机理提供一定的理论依据,同时为桃果实的深加工利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

供试品种为软溶质型“雨花 3 号”水蜜桃果实和硬溶质型“加纳岩”桃果实。按果实的不同成熟度采自扬州仪征,进行分批采样,采收后立刻运至实验室,剔除病果、伤果,果实成熟度划分如下:“雨花 3 号”:成熟度 I (盛花后 55 d,果皮颜色青绿,基部很硬),成熟度 II (盛花后 65 d,果皮颜色青绿,基部较硬),成熟度 III (盛花后 70 d,果皮颜色青绿微黄,基部微软),成熟度 IV (盛花后 75 d,果皮颜色微青带黄,基部较软),成熟度 V (盛花后 80 d,果皮颜色黄带微白,基部很软)。

“加纳岩”:成熟度 I (盛花后 85 d,顶部红色,整果很硬),成熟度 II (盛花后 90 d,顶部红色面积增大,整果很硬),成熟度 III (盛花后 95 d,基本全红,顶部暗红,果实较硬),成熟度 IV (盛花后 100 d,顶部暗红,果实较硬),成熟度 V (盛花后 80 d,果皮颜色黄带微白,基部很软)。成熟度 V (盛花后 105 d,顶部暗红面积达 1/2,果实微软)。

在采收当天去掉果皮和果核,将果肉部分切成小块,用液氮处理后装在聚乙烯薄膜塑料袋中,并立即保存于-80℃超低温冰箱中用于试验分析。

1.2 试验方法

1.2.1 果实硬度的测定

采用 GY-1 型果实硬度计测定(调头直径 3.5 mm),单位以 N 计算。每个果实胴部不同部位对称均匀选取六个点,每次测量 6 个果实,均匀取平均值,试验重复三次。

1.2.2 多酚含量的测定

参照 Campbel^[7]和 Lugato^[8]等方法进行。

1.2.3 类黄酮含量的测定

参照 Olusola 等^[9]的方法进行。

1.2.4 苯丙氨酸解氨酶活性的测定

参照 Surjadinata 等^[10]的方法。

1.2.5 多酚氧化酶活性的测定

参照 Yudou Cheng 等^[11]的方法。

1.2.6 过氧化物酶活性的测定

参照 Yingsanga 等^[12]的方法。

1.2.7 抗氧化能力评价

参照 Puerta-Gomez 等^[13]的方法。

1.2.7.1 DPPH 法测定不同溶质型桃果实抗氧化能力

随机称取 5 g 果肉,加入 25 mL 甲醇溶液,冰浴条件下匀浆,之后 4℃、10000 r/min 冷冻离心 25 min,取上清液备用。准确移取 0.2 mL 样品液于试管中,加入 2.8 mL、0.05 mg/mL DPPH,充分混匀,37℃水浴静置 30 min 后用分光光度计测定 517 nm 下吸光度 A_1 (以无水乙醇为参比);同时测定 2.8 mL DPPH 溶液与 0.2 mL 无水乙醇混合后的吸光度 A_0 ,以及 0.2 mL 的样液与 2.8 mL 的无水乙醇混合后的吸光度 A_2 。平行测定 3 次,取平均值后根据以下公式计算 DPPH 清除率,试验重复三次。

$$\text{DPPH 清除率}/\%=[1-(A_1-A_2)/A_0]\times 100$$

1.2.7.2 ABTS 法测定不同溶质型桃果实抗氧化能力

采用 ABTS 法总抗氧化能力检测试剂盒(碧云天生物技术研究所)。样品的抗氧化能力用 $\mu\text{g Trolox equivalents (TE)}/\text{g FW}$ 表示,试验重复三次。

1.2.8 数据分析

数据分析采用 SPSS 19.0 软件。

2 结果与分析

2.1 不同溶质型桃果实成熟软化过程中果实硬度的变化

果实硬度是反映果实质地和耐贮藏性的一个重要指标,也是反映果实成熟软化的重要指标之一。如图 1 所示,不同溶质型桃果实成熟过程中果实硬度均发生一定程度的下降。‘雨花 3 号’桃果实在成熟的第 I~III 成熟度时硬度变化较小,第 III~V 成熟度时果实硬度迅速下降。‘加纳岩’桃果实在成熟过程中果实硬度变化缓慢,仅在成熟末期有明显下降,但在成熟过程中整体保持较高的硬度,不同溶质型果实硬度差异显著 ($p<0.05$)。

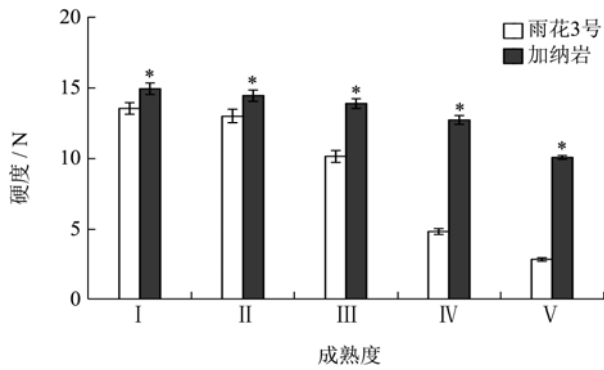


图1 不同溶质型桃果实成熟过程中硬度的变化

Fig.1 Changes in firmness during peach fruit maturation

注: *表示同一成熟度不同品种之间的差异显著($p<0.05$),下同。

2.2 不同溶质型桃果实成熟过程中多酚含量的变化

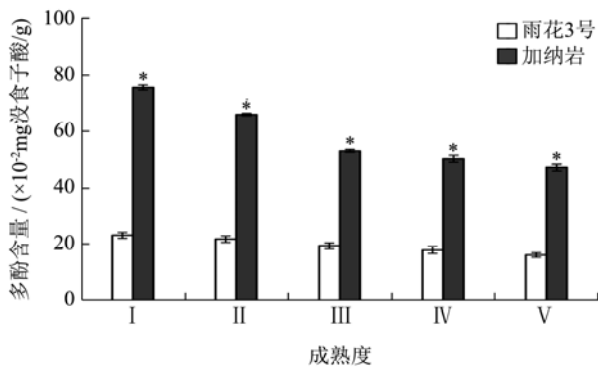


图2 不同溶质型桃果实成熟过程中多酚含量的变化

Fig.2 Changes in total phenol content during peach fruit maturation

水果多酚具有生物活性,其含量高低直接影响到水果本身及其制品的风味和品质。如图2所示,“加纳岩”与“雨花三号”桃果实在树体成熟过程中多酚含量从整体看呈下降趋势,均在中期含量最低。“加纳岩”桃果实在树体成熟的第I至第III成熟度多酚含量下降明显,中后期则呈缓慢降低趋势;而“雨花三号”桃果实在成熟过程中多酚含量变化相对平缓,且在成熟过程中硬溶质型桃多酚含量显著高于软溶质型桃($p<0.05$)。

2.3 不同溶质型桃果实成熟过程中类黄酮含量的变化

黄酮类化合物(又称类黄酮)是广泛存在于植物界的一大类多酚类化合物。从图3中可以看出,在不同成熟阶段“加纳岩”桃果实类黄酮含量均显著高于

“雨花三号”桃果实($p<0.05$);但“雨花三号”与“加纳岩”桃果实树体成熟过程中类黄酮含量变化均不显著。

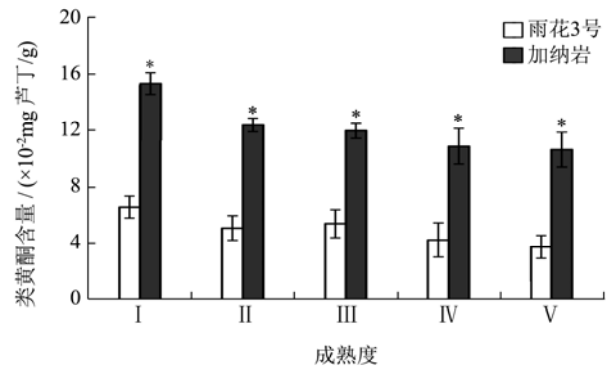


图3 不同溶质型桃果实成熟过程中类黄酮含量的变化

Fig.3 Changes in flavonoid content during peach fruit maturation

2.4 不同溶质型桃果实成熟过程中苯丙氨酸解氨酶活性的变化

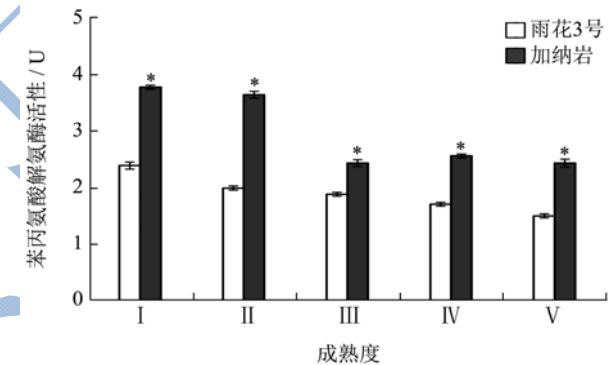


图4 不同溶质型桃果实成熟过程中苯丙氨酸解氨酶活性的变化

Fig.4 Changes in PAL activity during peach fruit maturation

PAL是催化苯丙烷类代谢第一步反应的酶,也是酚类物质代谢网络最上游的关键限速酶。从图4中可以看出,“加纳岩”桃果实PAL活性在成熟过程中均高于“雨花三号”桃果实,初期酶活相对较高;“加纳岩”桃PAL活性整体上表现为下降,而“雨花三号”桃果实成熟过程中PAL活性变化平缓,这与桃果实成熟过程中多酚含量的变化呈现一定的相关性。

2.5 不同溶质型桃果实成熟过程中多酚氧化酶活性的变化

PPO对次生代谢具有重要作用。如图5所示,“加纳岩”桃果实在树体成熟过程中酶活力呈缓慢上升,而“雨花三号”桃果实在成熟前期酶活力高,表现在第I至第II成熟度酶活增加,在第II至第III急剧降低,之

后又缓慢增加;“加纳岩”在整个过程中酶活均显著低于“雨花三号”桃果实。不同品种果实在相应成熟时期PPO活性差异显著 ($p<0.05$)。

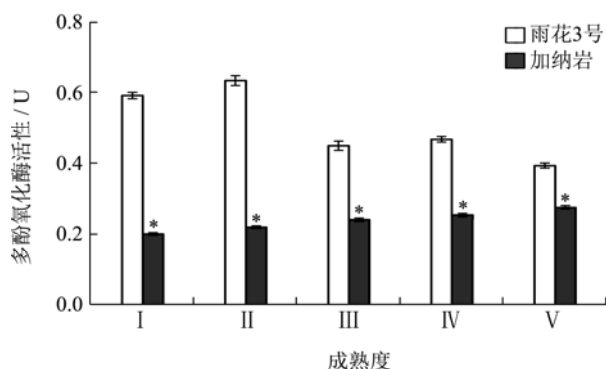


图5 不同溶质型桃果实成熟过程中多酚氧化酶活性的变化
Fig.5 Changes in PPO activity during peach fruit maturation

2.6 不同溶质型桃果实成熟过程中过氧化物酶活性的变化

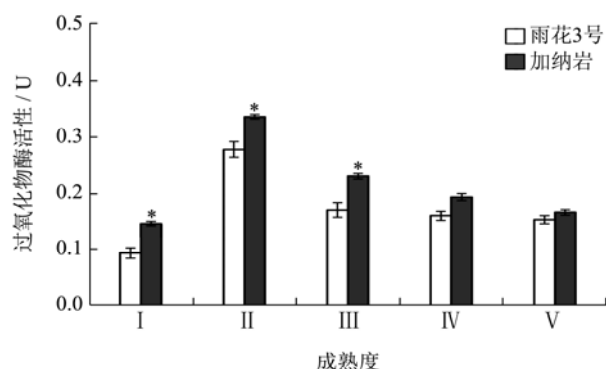


图6 不同溶质型桃果实成熟过程中过氧化物酶活性的变化
Fig.6 Changes in POD activity during peach fruit maturation

如图6所示,“雨花三号”桃果实在树体成熟过程中酶活水平始终低于“加纳岩”桃果实,两种品种桃果实在成熟度I到成熟度II时有显著上升,在第II至第III成熟度酶活下降较为明显。且在成熟前期和中期两品种间POD活性差异显著。由于POD与呼吸作用及生长素的氧化等有关系,随着组织的成熟衰老,呼吸作用增强,表现为成熟度V时的酶活高于成熟度I。

2.7 不同溶质型桃果实成熟过程中抗氧化能力的评价

2.7.1 DPPH 自由基清除能力评价

如图7所示,“加纳岩”桃果实在树体成熟过程中,其对DPPH自由基的清除能力均显著高于“雨花三号”桃果实,且两种溶质型桃果实均在成熟初期时清除率

较高,由于“加纳岩”桃多酚及类黄酮含量高于“雨花三号” ($p<0.05$),且均在成熟前期和成熟中期具有较高的含量,这表明抗氧化与多酚和类黄酮含量具有一定的相关性。

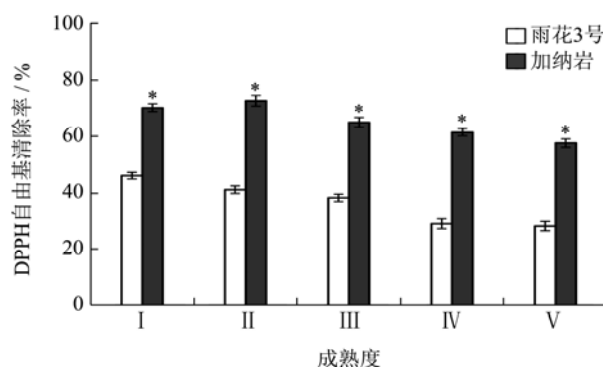


图7 不同溶质型桃果实成熟过程中DPPH自由基清除率的变化
Fig.7 Changes in DPPH free-radical scavenging ability during peach fruit maturation

2.7.2 ABTS 自由基清除能力评价

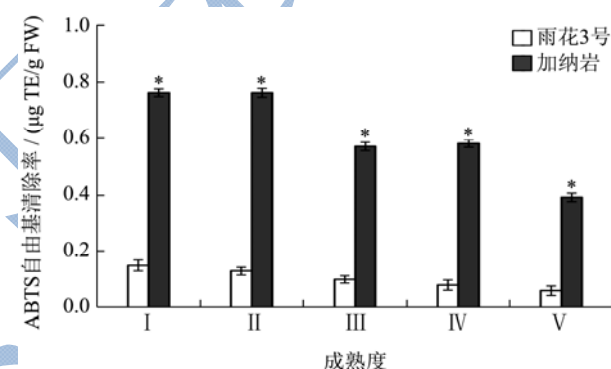


图8 不同溶质型桃果实成熟过程中ABTS自由基清除率的变化

Fig.8 Changes in ABTS free-radical scavenging ability during peach fruit maturation

如图8所示,桃果实在树体成熟过程中,“加纳岩”对ABTS自由基的清除能力显著高于“雨花三号” ($p<0.05$),“雨花三号”桃果实在树体成熟过程中对ABTS自由基清除能力都较弱,整体上看,两种溶质型桃果实在树体成熟过程中,对ABTS自由基的清除能力呈下降趋势,即总抗氧化能力的下降,与多酚和类黄酮含量呈现一定的相关性。

3 讨论

植物多酚,又称植物单宁,是一类广泛存在于植物体内的多元酚化合物,其含量受诸多因素影响,如成熟程度、品种等。Alarcon-Flores等^[14]报道了几种不同品种苹果果肉及果皮中的多酚含量,不同品种间存在显著差异,本试验中两种桃的成熟软化过程存在差异性;但“加纳岩”桃果实在树体成熟过程中一直保持

相对较高的硬度,这可能导致其多酚含量的差异。软溶质型“雨花三号”桃果实在树体成熟过程中多酚含量相对稳定,硬溶质型“加纳岩”桃果实在成熟过程中,其多酚含量较“雨花三号”处于较高水平,在成熟前期多酚含量高,成熟后期含量低(图2);“加纳岩”桃果实在树体成熟过程中,其类黄酮含量显著高于“雨花三号”桃果实,同时“加纳岩”和“雨花三号”桃果实类黄酮含量的变化幅度都不大(图3)。

“加纳岩”桃果实的PAL活力始终高于“雨花三号”品种桃(图4);PAL可把苯丙氨酸用于酚类化合物的合成,PAL活力与二者多酚含量存在着一定相关性。PPO是引起果蔬酶促褐变的主要酶类,PPO基因沉默的核桃中酚和其衍生物的代谢改变,苯丙烷途径代谢的相关基因表达发生改变。两种品种桃果实在成熟前期PPO活性存在显著差异,“雨花三号”桃显著高于“加纳岩”桃,“加纳岩”桃果实PPO活性表现为随果实不断成熟而缓慢上升,整体酶活水平较低,由于“加纳岩”在成熟过程中硬度变化并不明显,同时“雨花三号”桃果实在成熟度II、III时细胞壁中胶层迅速降解,而“加纳岩”桃果实成熟过程中果肉细胞细胞壁有较长时间的相对完整期,中胶层的降解明显迟于雨花三号^[15],从而可能导致酶活与“雨花三号”表现出差异性。过氧化物酶是由微生物或植物所产生的一类氧化还原酶,能催化很多反应。“加纳岩”与“雨花三号”桃果实在树体成熟过程POD活性变化相似,呈先上升后下降,初期酶活高,后期活性低(图6);由于过氧化物酶与呼吸作用及生长素的氧化等有关,随着组织的成熟衰老,呼吸作用增强,同时“雨花三号”成熟初期时果实软化开始启动,可能使得组织代谢、褐变等突然增强,导致过氧化物酶活力在初期时也增强。

“加纳岩”和“雨花三号”,二者对自由基的清除能力整体上降低(图7);但硬溶质型“加纳岩”桃果实比软溶质型“雨花三号”抗氧化能力强,且二者差异显著(图8)。在DPPH自由基清除试验中,结果表明两种品种桃果实的清除能力差异较大,“雨花三号”桃果实清除DPPH自由基的能力明显低于“加纳岩”桃果实,清除自由基能力与多酚、类黄酮测定结果关系紧密,这与Puerta-Gomez等^[13]的研究结果一致。而通过ABTS自由基清除能力试验,可以发现这两种方法得到的结果存在差异性,通过DPPH测定的抗氧化能力与清除ABTS自由基的能力高低排序不完全一致,可见采取不同的测定方法会对最终结果产生一定影响,在不同体系中对抗氧化作用产生影响因素可能不同。

4 结论

不同溶质型桃果实在多酚、类黄酮含量、PAL、PPO、POD活力及抗氧化能力方面差异较大,硬溶质型“加纳岩”桃多酚、类黄酮含量显著高于软溶质型“雨花三号”桃,抗氧化能力与多酚及类黄酮含量密切相关,由于硬溶质型“加纳岩”成熟过程中硬度较高,而软溶质型“雨花三号”在初期时果实的软化就已启动,这可能对PPO及POD活力产生了一定影响,PAL活力与多酚含量存在相关性。同时在不同体系里,对抗氧化作用产生影响的因素可能不同,因而影响了抗氧化能力的高低排序,即不同方法评价抗氧化能力的结果存在差异。

参考文献

- [1] Ullah S, Khan A S, Malik A U, et al. Cultivar and harvest location influence fruit softening and antioxidative activities of peach during ripening [J]. International Journal of Agriculture and Biology, 2013, 15(6): 1059-1066
- [2] Abidi W, Maria S J, Moreno M A, et al. Evaluation of antioxidant compounds and total sugar content in a Nectarine [*Prunus persica* (L.) Batsch] progeny [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(10): 6919-6935
- [3] Wang S Y, Chen C T, Wang C Y. The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries [J]. Food Chemistry, 2009, 112(3): 676-684
- [4] Nunez Selles A J. Antioxidant therapy: Myth or reality? [J]. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2005, 16(4): 699-710
- [5] Maisuthisakul P, Pongsawatmanit R, Gordon M H. Characterization of the phytochemicals and antioxidant properties of extracts from tea (*Cratogeomys formosum* Dyer) [J]. Food Chemistry, 2007, 100(4): 1620-1629
- [6] Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2006, 19(6-7): 669-675
- [7] Campbel O E, Padilla-Zakour O I. Phenolic and carotenoid composition of canned peaches (*Prunus persica*) and apricots (*Prunus armeniaca*) as affected by variety and peeling [J]. Food Research International, 2013, 54(1): 448-455
- [8] Lugato D, Simo M J, Garcia R, et al. Determination of antioxidant activity and phenolic content of extracts from *in vivo* plants and *in vitro* materials of *Passiflora alata* Curtis [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2014, 118(2): 339-346
- [9] Olusola Olalekan Elekofehinti, Jean Paul Kamdem, Aline Augusti Bolingon, et al. African eggplant (*Solanum anguivi*

- Lam.) fruit with bioactive polyphenolic compounds exerts *in vitro* antioxidant properties and inhibits Ca^{2+} -induced mitochondrial swelling [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2013, 3(10): 757-766
- [10] 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
- [11] Yu-dou Cheng, Li-qin Liu, Guo-qun Zhao, et al. The effects of modified atmosphere packaging on core browning and the expression patterns of PPO and PAL genes in 'Yali' pears during cold storage [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60(2): 1243-1248
- [12] P Yingsanga, V Srilaong, S Kanlayanarat, et al. Relationship between browning and related enzymes (PAL, PPO and POD) in rambutan fruit (*Nephelium lappaceum* Linn.) cvs. rongrien and see-chompoo [J]. Postharvest Biology and Technology, 2008, 50(2-3): 164-168
- [13] Puerta-Gomez A F, Cisneros-Zevallos L. Postharvest studies beyond fresh market eating quality: Phytochemical antioxidant changes in peach and plum fruit during ripening and advanced senescence [J]. Postharvest Biology and Technology, 2011, 60(3): 220-224
- [14] Alarcon-Flores M I, Romero-Gonzalez R, Martinez Vidal J L, et al. Evaluation of the presence of phenolic compounds in different varieties of apple by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry [J]. Food Analytical Methods, 2014, 8(3): 696-709
- [15] 阚娟,谢海艳,金昌海.桃果实成熟软化过程中生理特性及细胞壁超微结构的变化[J].江苏农业学报,2012,28(5): 1125-1129
- KAN Juan, XIE Hai-yan, JIN Chang-hai. Physiological characteristics and cell wall ultrastructure during ripening and softening of peach fruit [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Science, 2012, 28(5): 1125-1129