

荔枝采后果皮花色素苷的降解与花色素苷酶活性变化

张昭其¹, 庞学群², 段学武¹, 季作梁¹

(¹ 华南农业大学园艺学院; ² 华南农业大学生命科学学院, 广州 510642)

摘要:荔枝果实外观颜色在很大程度上取决于果皮花色素苷含量及其存在的状态,果皮褐变与花色素苷含量呈显著的负相关。荔枝果皮存在高活性的花色素苷酶,而同样富含花色素苷的水果如苹果、葡萄、草莓和杨梅等则不含花色素苷酶活性。容易褐变的糯米糍荔枝含有较高的花色素苷酶和 PPO 活性;不容易褐变的桂味、兰竹则含有较低量的花色素苷酶和 PPO 活性。在荔枝采后褐变过程中,花色素苷酶活性一直维持在较高水平并呈逐渐上升的趋势,PPO 活性随褐变加重而下降,POD 活性则逐渐升高。因此推测,荔枝果皮花色素苷的降解及果皮褐变除了与 PPO 和 POD 有关之外,还可能与花色素苷酶有关。

关键词:荔枝;花色素苷;花色素苷酶

The Anthocyanin Degradation and Anthocyanase Activity During the Dericarp Browning of Lychee Fruit

ZHANG Zhao-qi¹, PANG Xue-qun², DUAN Xue-wu¹, JI Zuo-liang¹

(¹ College of Horticulture, South China Agricultural University;

² College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract: The pericarp color of lychee fruit is mainly determined by its anthocyanin content. A significant inverse relationship between anthocyanin content and pericarp browning index was established. A high activity of anthocyanase (anthocyanin-3-glucosidase) in lychee pericarp was identified, whereas, under the same conditions, no anthocyanase activity could be detected in red apple, red grape, red bayberry and strawberry. Furthermore, a higher anthocyanase and PPO activity was recorded in Nuomici fruit, which is sensitive to pericarp browning, compared to lower activity in Guiwei and Lanzhu fruit, which are less sensitive to pericarp browning. Anthocyanase activity maintained at high level and increased gradually along with postharvest pericarp browning. In the same condition, PPO activity decreased gradually, whereas POD activity increased gradually during the pericarp browning, which implied that anthocyanase was involved in anthocyanin degradation and pericarp browning of lychee fruit as PPO and POD.

Key words: Lychee; Anthocyanin; Anthocyanase

荔枝果皮大量存在的红色色素是花色素苷^[1]。长期以来,荔枝果皮褐变被认为是由于多酚氧化酶(PPO)催化氧化花色素苷,形成了一种称“类黑精”(melanin)的物质^[2,3]。最近的研究表明,荔枝花色素苷虽然是多酚类物质,却不能被荔枝果皮 PPO 直接催化氧化^[4],类似的报道还见于葡萄^[5]、草莓^[6]等水果。Markakis^[7]推测,花色素苷的糖组分可成为

PPO 与花色素苷结合的立体障碍,使得 PPO 对花色素苷不起作用。花色素苷- β -糖苷酶(简称花色素苷酶,anthocyanase)是催化花色素苷糖苷键断裂的一种 β -糖苷酶,从目前报道的文献来看,仅存在于真菌中,特别是一些病原真菌中^[8],笔者首次报道了采后荔枝果皮存在高活性的花色素苷酶并推测其与果皮褐变有关^[9],本文探讨了采后荔枝果皮褐变过程中

收稿日期 2002-05-20

基金项目:国家自然科学基金农业倾斜资助项目(30070534)和广东省教育厅自然科学基金资助项目(200002)

作者简介:张昭其(1965-),男,湖南东安人,副研究员,博士,主要从事果蔬采后生理及保鲜贮藏方面的研究。Tel: 020-85280228; E-mail:

zhangzhaoqi2001@yahoo.com.cn

果皮花色素苷酶及其它与果皮褐变相关的酶活性的变化。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

荔枝品种淮枝 (*Litchi Chinensis* Sonn. cv. Huaizhi) 采自广东从化, 红熟后采收并立即运回实验室, 挑选无病虫害及机械伤的果实, 用 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 施保功 (德国艾格福公司生产, 咪唑类杀菌剂) 浸泡 2 min 后, 置于常温下无包装贮藏, 3 个重复, 每重复 1.5 kg, 每日观察果实褐变指数, 测定花色素苷含量和花色素苷酶活性、多酚氧化酶 (PPO)、过氧化物酶 (POD)。其它荔枝品种, 桂味 (cv. Guiwei) 和糯米糍 (cv. Nuomici) 采自深圳西丽果场, 兰竹 (cv. Lanzhu) 荔枝、苹果、葡萄、草莓和杨梅等富含花色素苷的果实均购自鲜果市场。

1.2 方法

1.2.1 果皮褐变程度评价 参照 Zhang 等^[9]的方法确定荔枝果皮褐变级数, 以不少于 30 个的荔枝果实为基数计算褐变指数。褐变指数 = $\sum(\text{褐变级数} \times \text{果数}) / \text{总果数}$ 。褐变级数标准是: 1 级果为全红, 2 级果为果表面积有 25% 发生褐变, 3 级果为果表面积有 50% 发生褐变, 4 级果为果表面积有 75% 发生褐变, 5 级果为完全褐变。

1.2.2 花色素苷含量测定 参照庞学群等^[10]的方法。取 5 g 果皮切碎, 用 1% HCl 多次浸提, 直至果皮褪至无红色, 合并浸提液并过滤, 将滤液定容至 100 ml, 取 1 ml 滤液, 分别用 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl-HCl 缓冲液 pH 1.0 和 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸/磷酸氢二钠缓冲液 pH 5.0, 稀释至 5 ml, 混匀后, 用蒸馏水作对照, 测定 A_{510} 。

果皮花色素苷含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)

$$= \Delta A \times 5 \times 0.1 \times 1000 \times 445.2 / 29600 \times 5$$

其中 $\Delta A = A(\text{pH}_{1.0}) - A(\text{pH}_{5.0})$; 5 为稀释倍数; 0.1 为浸提液体积 (L); 445.2 为矢车菊素-3-葡萄糖苷分子的摩尔质量; 29600 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的摩尔比吸收系数; 5 为果皮质量 (g)。

1.2.3 花色素苷酶活性测定 参照 Martino 等^[11]的方法, 取果皮 4 g 加 0.4 g 不溶性 PVP, 10 ml $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸缓冲液 pH 4.0, 匀浆, 4°C 下 $15000 \times \text{g}$ 离心 20 min, 上清液为酶提取液。取 1 ml 酶液, 加 4 ml 底物, 40°C 反应 30 min, 加 4 ml 1% 盐酸-甲醇终止反应, 以 100°C 沸水浴 10 min 灭活的酶液代替上述酶液作对照, 测定 A_{530} 。

酶活性单位为 40°C 下 1 min 水解 1 nmol 的花色素苷所需的酶量。酶活性 ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$) = $[A_{530}(\text{灭活酶}) - A_{530}(\text{酶})] \times 9 \times 10^{-3} \times 10^9 \times 10 / 29600 \times 30 \times 4$

其中 $[A_{530}(\text{灭活酶}) - A_{530}(\text{酶})] / 29600$ 为被水解的花色素苷的摩尔浓度, t 为反应体系的最终体积 (ml), 30 为反应时间 (min), A 为果皮质量 (g)。

底物制备 黑豆皮花色素苷主要为矢车菊素-3-葡萄糖, 制备后作为测定花色素苷酶的底物。参照 Baublis 等^[12]的方法并作一定改进。取一定量黑豆用 1% (v/v) 盐酸多次浸提, 过滤浸提液, 得花色素苷盐酸提取液。将该提取液上 Amberlite XAD-7 树脂 (Sigma 公司) 层析柱 (1.5 cm \times 40 cm), 先用 300 ml 蒸馏水洗柱以除杂质和脱酸, 然后用 0.1% 盐酸甲醇洗脱, 将洗脱液用减压旋转蒸发仪低于 40°C 下浓缩和回收甲醇, 并通过 Sep-Pak C18 柱 (Waters 公司) 以除去不溶性杂质, 得初步纯化的花色素苷浓缩液, 根据 1.2.2 方法测定该花色素苷浓缩液的浓度, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸缓冲液 pH 4.0 稀释至 $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为测定花色素苷酶的底物。

1.2.4 PPO 活性测定 参照 Jiang^[4]的方法, 取 2 g 果皮, 加入 5 倍量 (w/v) 的 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸-磷酸缓冲液 pH 6.8 及 0.4 g PVP, 冰浴研磨, 4°C 下 $15000 \times \text{g}$ 离心 15 min, 上清液用于酶活性测定。3 ml 反应液中含有 2.9 ml 含 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯二酚的缓冲液、0.1 ml 酶液, 测定 OD_{398} 值的变化, 以每分钟 ΔOD_{398} 变化 0.001 表示一个酶活性单位 (U)。

1.2.5 POD 活性测定 参照陈贻竹等^[13]的方法, 取 2 g 果皮, 加入 5 倍量 (w/v) 的 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 pH 7.0 及 0.4 g PVP, 冰浴研磨, 4°C 下 $15000 \times \text{g}$ 离心 15 min, 上清液用于酶活性测定。3 ml 反应液中含有 0.1 ml 愈创木酚 (4.0%, 过饱和) 和 0.1 ml 过氧化氢 (0.46%), 0.05 ml 酶液、2.75 ml 磷酸缓冲液, 测定 OD_{470} 值的变化, 以每分钟 ΔOD_{470} 变化 0.01 表示一个酶活性单位 (U)。

2 结果与分析

2.1 荔枝果皮褐变与花色素苷含量的关系

如图 1 所示, 在 30°C 、无包装条件下, 采后荔枝果实褐变指数迅速增加, 4 d 后褐变指数达到 4.8, 随着褐变指数的升高, 果皮花色素苷含量明显下降, 从起始的 $0.169 \pm 0.020 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 降至 $0.057 \pm 0.024 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$, 统计分析表明褐变指数与花色素苷含量呈显著负相关 ($r = -0.988$)。暗示花色素苷的

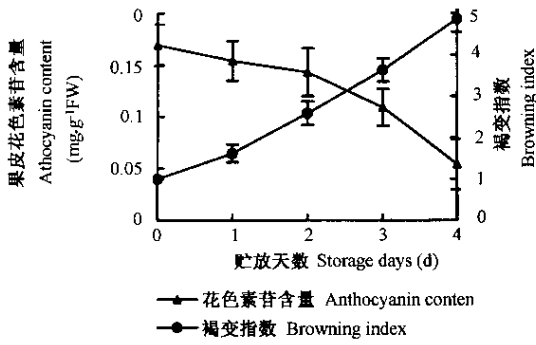


图 1 荔枝采后果皮花色苷含量与褐变指数的关系

Fig.1 The relationship between anthocyanin content and browning index of lychee pericarp

表 几种富含花色苷水果的花色素苷酶、PPO 及 POD 活性¹⁾

Table Activities of anthocyanase, PPO and POD in several kinds of fruits rich in anthocyanin

水果种类 Fruit species	花色苷酶 Anthocyanase (nmol·min ⁻¹ ·g ⁻¹ FW)	PPO (U·g ⁻¹ FW)	POD (U·g ⁻¹ FW)
荔枝(糯米糍) Lychee(cv. Nuomici)	12.87 ± 2.06a	1 700 ± 187a	4 160 ± 483b
荔枝(桂味) Lychee(cv. Guiwei)	5.87 ± 0.75b	980 ± 162b	6 205 ± 417a
荔枝(兰竹) Lychee(cv. Lanzhu)	4.37 ± 2.28b	1 070 ± 139b	4 563 ± 822b
红苹果 Red apple	ND	620 ± 146c	893 ± 287c
红葡萄 Red grape	ND	560 ± 144c	633 ± 63c
杨梅 Red bayberry	ND	—	—
草莓 Strawberry	ND	610 ± 131c	374.6 ± 23d

¹⁾ n = 3, P = 0.05

从图 2 可知,在荔枝采后果皮褐变过程中,荔枝果皮花色苷酶活性一直维持在较高水平,并随着褐变指数的升高有上升的趋势。从图 3、图 4 可知,在荔枝采后果皮褐变过程中,果皮 PPO 活性随褐变加重有下降的趋势,而 POD 活性逐渐升高,与多数研究者的结果是一致的。

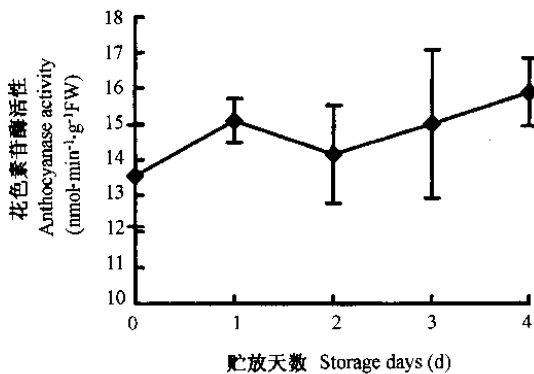


图 2 常温条件下荔枝果皮花色苷酶活性变化

Fig.2 The changes of pericarp anthocyanase activity of lychee fruit in ambient storage

降解与果皮褐变具密切关系。

2.2 荔枝果皮花色苷酶的存在

按真菌花色苷酶测定方法,检测了荔枝及其它水果的花色素苷酶活性,发现荔枝果皮存在高活性的花色苷酶,而在其它同样富含花色苷的水果中,如红苹果、红葡萄、草莓和杨梅等则不能检测到花色苷酶活性(表)。从表中还可看出,耐藏的不易褐变的荔枝品种如桂味、兰竹等含有较低活性的花色苷酶和 PPO,而易于褐变的荔枝品种如糯米糍等则含有较高活性的花色苷酶和 PPO,此外,荔枝各品种都含有非常高活性的 POD。

2.3 荔枝采后花色苷酶活性变化

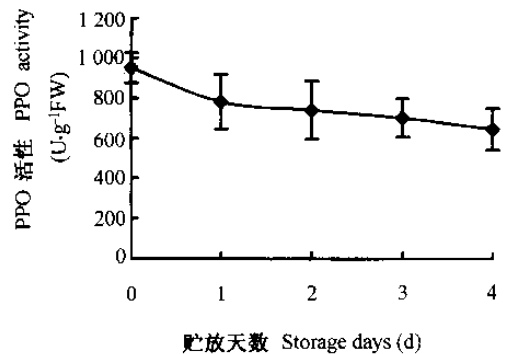


图 3 常温条件下荔枝果皮 PPO 活性的变化

Fig.3 The changes of pericarp PPO activity of lychee fruit in ambient storage

荔枝果皮存在大量的红色色素即花色苷^[1]。早在 1960 年, Akamine 就推测荔枝果皮褐变主要是由于 PPO 催化氧化花色苷的降解,形成了一种称作“类黑精”(melenin)的物质^[2]。本文发现采后荔枝果实在常温无包装条件下果皮褐变指数迅速增加,而在此期间果皮花色苷含量则持续下降,褐变指数与花色苷含量呈显著负相关(图 1),暗示花色苷的降解参与了果皮褐变过程。

3 讨论

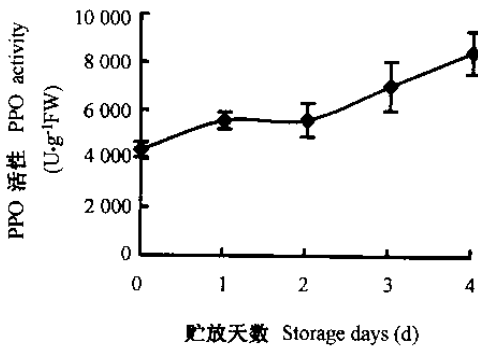


图 4 常温条件下荔枝果皮 PPO 活性的变化

Fig. 4 The changes of pericarp PPO activity of lychee fruit in ambient storage

本研究中,随着荔枝果皮褐变指数的提高,果皮 PPO 活性有下降的趋势,而 POD 活性逐渐升高(图 3 图 4),与多数研究者的结果是一致的^[14]。长期以来荔枝果皮褐变被认为是由 PPO 和 POD 引起的酶促褐变^[14]。但酶促褐变观点仍然不能很好地解释以下问题,如谭兴杰等通过柱层析从荔枝果皮中分离出 6 种含酚羟基的物质,只有 1 种(未确定结构)可被 PPO 催化氧化^[15]。荔枝果皮大量存在的红色色素即花色苷,虽然是酚类物质,但不能直接被荔枝果皮的 PPO 所催化氧化^[4]。花色苷不是 PPO 的最适底物,已为众多研究所证实^[5,6]。Zapata 等也发现,POD 对花色苷也不表现活性^[16]。

Markakis 推测,花色苷的糖组分可成为 PPO 与花色苷结合的立体障碍,使得 PPO 对花色苷不起作用^[7]。Zapata 等发现,当花色苷的糖组分去掉以后,剩下的花色苷部分对 POD 的亲合力大大提高^[16]。那么,荔枝果皮的花色苷是否需要去掉糖组分后才能被 PPO、POD 所催化氧化?荔枝果皮内是否存在一个特有的水解花色苷糖苷键的系统?花色苷酶(anthocyanin- β -glucosidase,简称 anthocyaninase)是催化花色苷糖苷键断裂的一种 β -糖苷酶,目前仅在微生物上发现有该酶的存在,在植物上尚未见报道^[8]。笔者参照黑曲霉花色苷酶活性的测定方法,首次报道了荔枝果皮存在高活性的花色苷酶^[9]。笔者发现,荔枝果皮存在高活性的花色苷酶,而在其它同样富含花色苷的水果如红苹果、红葡萄、草莓和杨梅中则不能检测到花色苷酶活性(见表),尽管这些水果跟荔枝一样含有 PPO、POD 活性,但它们经较长时间的贮藏之后仍含有高水平的花色苷。从表中还可看出,耐藏的不易褐变的荔枝品种如桂味、兰竹等含有较低活性的

花色苷酶和 PPO,而易于褐变的荔枝品种如糯米糍等则含有较高活性的花色苷酶和 PPO,暗示荔枝果皮褐变敏感性与其花色苷酶和 PPO 活性高低有关,此外,荔枝各品种都含有非常高活性的 POD。看来,荔枝果皮的迅速褐变除了与 PPO 和 POD 有关之外,还可能与花色苷酶及花色苷的迅速降解有关。

References

- [1] Lee H S, Wicker L. Anthocyanin pigments in the skin of lychee fruit. *Journal of Food Science*, 1991, 56: 466-483.
- [2] Akamine E. Preventing the darkening of fresh litchi prepared for export. *Technical Program Report of University of Hawaii*, 1960, 127: 1-17.
- [3] Huang S, Hart H, Lee H, Wicker L. Enzymic colour changes during postharvest storage of lychee fruit. *Journal of Food Science*, 1990, 55: 1762-1763.
- [4] Jiang Y M. Role of anthocyanins, polyphenol oxidase and phenols in lychee pericarp browning. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, 80: 305-310.
- [5] Sarni P, Fulcrand H, Souillol V, Souquet J M, Cheynier V. Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must-like model solution. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1995, 69: 385-391.
- [6] Wesche Ebeling P, Montgomery M W. Strawberry polyphenoloxidase: its role in anthocyanin degradation. *Journal of Food Science*, 1990, 55: 731-734, 745.
- [7] Markakis P. Stability of anthocyanin in food. In: *Anthocyanin as Food Colour*. New York: Academic Press, 1982: 163-180.
- [8] 张昭其, 庞学群. 真菌花色苷酶研究进展. *微生物通报*, 2001, 28(6): 86-89.
Zhang Z Q, Pang X Q. Current trends: anthocyanase of fungi. *Bulletin of Microbiology*, 2001, 28(6): 86-89. (in Chinese)
- [9] Zhang Z Q, Pang X Q, Ji Z L, Jiang Y M. Role of Anthocyanin degradation in litchi-pericarp browning. *Food Chemistry*, 2001, 75: 217-221.
- [10] 庞学群, 张昭其, 段学武, 季作梁. pH 和温度对荔枝花色苷稳定性的影响. *园艺学报*, 2001, 28(1): 23-27.
Pang X Q, Zhang Z Q, Duan X W, Ji Z L. Influence of pH and temperature on the stability of anthocyanin from litchi pericarp. *Acta Horticulturae Sinica*. 2001, 28(1): 23-27. (in Chinese)
- [11] Martino A, Pifferi P G, Spagna G. The separation of pectinlyase from β -glucosidase in a commercial preparation. *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology*, 1994, 61: 255-260.
- [12] Baublis A, Spomer A, Berber-Jimenez M D. Anthocyanin pigment: comparison of extract stability. *Journal of Food Science*, 1994, 59: 1219-1221.
- [13] 陈贻竹, 王以柔. 荔枝果实过氧化物酶(POD)的研究. *中国科学院华南植物研究所集刊*, 1989, 5: 47-52.
Chen Y Z, Wang Y R. A study on peroxidase in Litchee pericarp. *Acta Botanica Austro Sinica*, 1989, 5: 47-52. (in Chinese)

- [14] 张昭其, 庞学群. 荔枝果皮的褐变机理. 《园艺学进展》第 2 辑). 南京: 东南大学出版社, 1998: 261 - 265.
Zhang Z Q, Pang X Q. The mechanism of litchi pericarp browning (review). *Advance in Horticulture*, (2). Nanjing: China South-East University Press, 1998: 261 - 265. (in Chinese)
- [15] 谭兴杰, 周永成. 荔枝果皮多酚氧化酶促褐变的研究. 植物生理学报, 1987, 13: 197 - 203.
- Tan X J, Zhou Y C. Studies of the enzymatic browning of Litchi chinensis pericarp by polyphenol. *Acta Phytobiologica Sinica*, 1987, 13: 197 - 203. (in Chinese)
- [16] Zapata J M, Calderon A A, Ros Barcelo A. Actual browning and peroxidase level are not correlated in red and white berries from grapevine (*Vitis vinifera*) cultivars. *Fruit Varieties Journal*, 1995, 49 (2): 82 - 84.

(责任编辑 王红艳)

简讯

小麦育种技术实现重大革新

受农业部委托, 中国农业科学院于 2003 年 7 月 15 日主持召开了“矮败小麦创制与高效育种技术新体系建立”研究项目成果鉴定会。翟虎渠院长、刘旭副院长、科技局叶志华局长、李建萍处长、作物科学研究所万建民所长、张保明书记等参加了鉴定会。农业部科教司段武德副司长代表农业部到会讲了话。由庄巧生、李振声、刘大钧、董玉琛 4 位院士和来自全国各主要麦区专家组成的鉴定委员会听取了我院作物科学研究所刘秉华研究员做的技术报告, 审阅了相关资料, 综合评议后, 一致认为, 矮败小麦这个独特遗传资源属国际首创, 经过 10 多年反复探索与实践, 利用矮败小麦建立了高效育种技术新体系。该体系创新性强、实用效果好、发展潜力大, 整体达到国际领先水平。

矮败小麦是具有矮秆基因标记的太谷核不育小麦。它接受其它品种花粉后, 其下一代的矮秆株为雄性不育, 非矮秆株为雄性可育, 二者极易辨认; 且雄性败育彻底, 不育性稳定, 异交结实率高, 是开展轮回选择育种的理想工具。

矮败小麦经过 10 轮的选优、去劣和不断引入优异种质(基因), 形成了一个遗传组成优良的动态群体。目前矮败小麦改良群体的遗传构成得到了显著改进, 其产量、品质、抗病性、株型等性状都得到较大幅度提高, 群体内每个可育株都相当于常规杂交育种的一个复合杂交组合, 数量大, 类型多, 性状整体水平高, 矮败小麦改良群体是优良基因库, 是新品种的加工厂, 从中可以源源不断地创造出新种质和满足不同需求的新品种。

通过进行轮回选择育种, 已选育出轮选 981、轮选 987、轮选 201 等小麦新品种及一批新品系, 其中轮选 987 在近几年参加国家小麦区域试验的北部冬麦区区试中, 产量都名列第一, 比主栽品种(京冬 8 号、京 411) 平均增产 13.6%。抗倒伏力强, 抗白粉病和条锈病, 成熟落黄好, 已于 2003 年通过国家审定。

以矮败小麦为基础, 轮回选择为核心, 建立的这一套小麦高效育种技术新体系, 为不同生态区域不同改良目标的小麦育种工作提供了成熟的技术平台。这项技术的广泛采用, 必将引起小麦育种技术的重大革新。专家们建议尽早在我国主产麦区建立矮败小麦轮回选择育种基地, 扩大推广应用这项技术, 使我国小麦育种工作走在世界前列。(作物所 杨丽 供稿)