

采后荔枝果皮色素、总酚及有关酶活性的变化

林植芳 李双顺 张东林 林桂珠

李月标 刘淑娴 陈绵达

(中国科学院华南植物研究所, 广州)

摘 要

成熟度约八成的“淮枝”在采收后 2 天内, 色素的合成代谢仍相当活跃。类胡萝卜素、花色素苷的含量增高, 多酚氧化酶和苯丙氨酸解氨酶的活性增大, 总酚保持原有水平, 叶绿素降解, 反映了果实达到完全成熟的特征。随后, 上述各项参数因果实的衰老而下降, 与采收当天相比, 7 天后花色素苷为 90%, 类黄酮为 59%, 总酚为 71%, 苯丙氨酸解氨酶活性为 46%。讨论了酚类、花色素苷及两种酶活性之间的关系及对荔枝果实在成熟、衰老褐变中的作用。

关键词 色素; 酚类; 多酚氧化酶; 荔枝

果实的外观色泽是评价其商品价值的重要指标。与其它水果相比, 采后的荔枝果实的耐藏性较低。常温放置 2—3 天之后, 果色逐渐变褐, 果皮失水, 并因病菌侵染而很快变质腐烂。通常认为酚类物质的氧化是导致果实和蔬菜变色的主要因素。酚类的代谢与苯丙氨酸解氨酶及多酚氧化酶的活性密切相关。苯丙氨酸解氨酶是酚类和类黄酮化合物合成的一种控制酶, 它催化苯丙氨酸转化为肉桂酸, 产生许多次生产物, 如木质素、酚类、香豆素、黄酮和花色素苷^[6]。多酚氧化酶催化酚类物质的氧化, 直接影响荔枝果实的色泽^[1,4]。Prasad 等^[11]曾报道荔枝果皮的红色与 4 种花色素苷和其它的类黄酮有关, 但迄今未见研究荔枝果实在贮藏期间果皮色素含量变化以及苯丙氨酸解氨酶活性与总酚含量变化的资料。

本文以广东省大量生产的荔枝品种“淮枝”为材料, 阐明采后果实的果皮中花色素苷、类胡萝卜素、叶绿素含量, 以及多酚氧化酶、苯丙氨酸解氨酶活性的变化, 探讨其与果实成熟和衰老的关系, 为研究荔枝的保鲜技术提供依据。

材 料 和 方 法

供试的“淮枝” *Litchi chinensis* 果实采自广州市郊。果实经精选后, 贮放于 27—30℃, 相对湿度 73—79% 的条件下, 分别于 0、2、4、7 天取样进行各项分析。

(一) 叶绿素和类胡萝卜素含量

用钻孔器从 10 个荔枝中部的果皮上取下 30 个直径 6mm 的小圆片, 迅速投入 90% 丙酮中, 研磨提取, 过滤后, 定容 50ml, 分别测定 663、645、440nm 的吸收, 按 Fadeel 法^[7]计算叶绿素及类胡萝卜素含量。

(二) 花色素苷、类黄酮和总酚含量

参照 Pirie 等^[10]方法, 将果皮分开为外果皮和内果皮 (白色或淡红色膜), 各钻取 30 个小圆片, 立即以含 1% HCl 的甲醇溶液提取, 定容后, 于 600nm、530nm (花色素苷)、325nm (类黄酮)、280nm (总酚) 测定吸收变化。以 $\Delta A_{530-600nm} = 0.1$ 作为一个花色素苷单位。类黄酮含量直接以 $A_{325nm} g^{-1}$ 干重表示。总酚以没食子酸作标准曲线加以计算。

(三) 多酚氧化酶活性

2g 果皮加 0.05mol/l 磷酸缓冲液, pH6.8, 4℃ 下研磨提取, 19000 × g 离心 20 分钟。取上清液参照谭兴杰等^[4]所述方法, 以邻苯二酚为底物作活性测定。反应液总体积 3ml, 测定波长 398nm, 酶活性以每分钟光密度变化 0.001 为一个单位。

(四) 苯丙氨酸解氨酶活性

参照 Zucker 法^[13], 略有修改。2g 果皮加 0.1mol/l 磷酸缓冲液 pH8.7 (1:3—4, W/V), 于低温下研磨, 4 层纱布过滤后, 6000 × g 离心 15 分钟。取 0.1ml 上清液, 0.9ml H₂O, 30 μmol 苯丙氨酸, 100 μmol 硼酸缓冲液 (pH8.7, 总体积 3ml)。30℃ 保温 1 小时后, 加入 0.25ml 5mol/l HCl 停止反应。对照 (空白) 加等量的煮沸酶液。在 290nm 测定吸收, 以 $\Delta A_{290} = 0.01$ 作一个活性单位。

蛋白质含量按 Lowry 法^[8]。

酶液分离制备用 Hitachi PE-52D 离心机, 光吸收用 Gilford Response V. 7.0 紫外分光光度计测定。

实 验 结 果

(一) 色素和类黄酮含量的变化

“淮枝”果实采收时, 果色鲜红, 成熟度约为 8 成。外果皮中仍含有少量的叶绿素, 内果皮白色。室温贮存 2 天, 果皮呈深红色。4 天后, 果色逐渐加深, 局部出现褐斑, 最后 (7 天) 成为无光泽的暗褐色。与此相应, 果皮的叶绿素降解, 类胡萝卜素含量增加 (图 1A) 放置 2、4、7 天后, 叶绿素分别下降 14%、24% 和 54%, 类胡萝卜素则增大 4% 及 17%, 第 7 天稍为低些 (14%)。因此, 类胡萝卜素/叶绿素比值从原来的 2.88, 增到 3.48 (2 天)、4.42 (4 天), 和 7.05 (7 天)。

花色素苷主要存在于外果皮中, 内果皮只含少量的花色素苷。图 1B 可见, 果皮的花色素苷含量在果实贮放 2 天 (外果皮) 或 4 天 (内果皮) 内有所增多, 第 7 天则下降, 在外果皮中, 其数量为采收当天的 90.6%, 或最高含量时 (放置 2 天) 的 72.3%。实验中发现以 HCl-甲醇提取花色素苷后的残渣中保留着不能为其他多种溶剂萃取的红褐色物质, 其量似随果实贮放时间而增多, 估计其为果皮褐变形成的高分子聚合物。

外果皮的类黄酮含量随果实采后时间而逐步减少 (图 2)。内果皮的类黄酮在 4 天内仍保持原有的水平, 第 7 天急剧降低。

(二) 总酚含量的变化

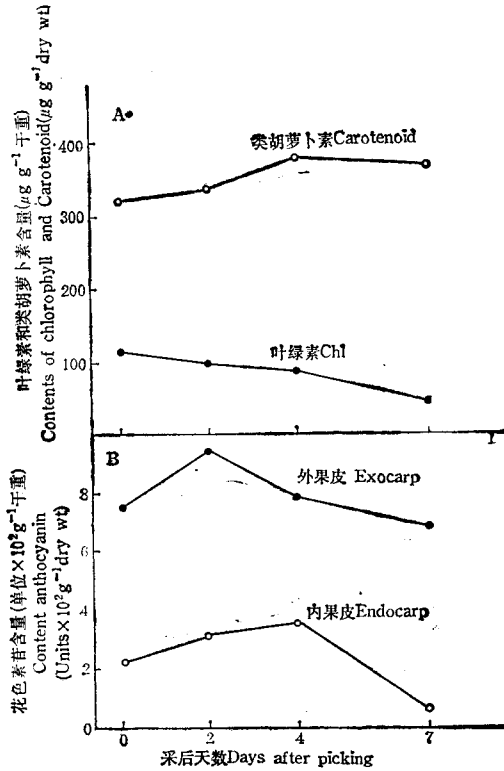


图 1 采后淮枝果皮的类胡萝卜素、叶绿素和花色苷含量的变化

Fig. 1 Change of carotenoid, chlorophyll and anthocyanin contents in pericarp of litchi fruit after picking

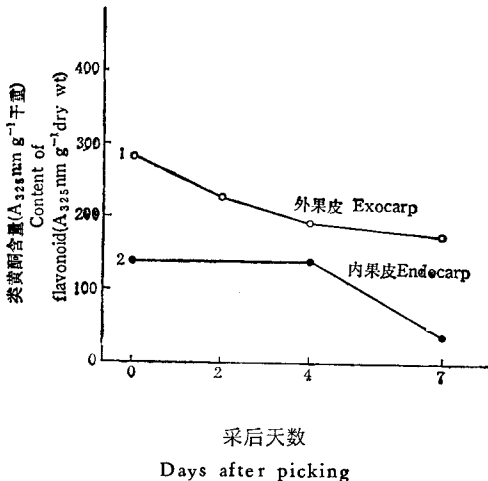


图 2 淮枝果皮的类黄酮含量在果实采后不同时间中的变化
Fig. 2 Change of flavonoid content in pericarp of Huaizhi fruit after different time of picking

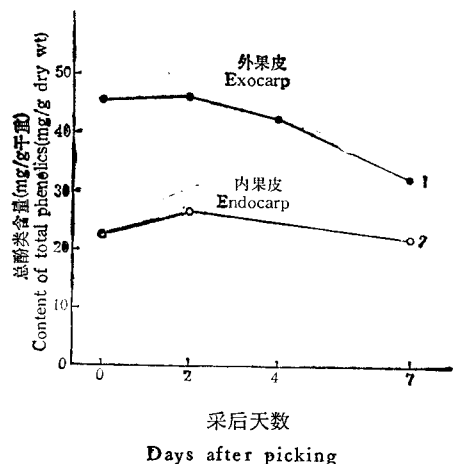


图 3 采后淮枝果皮中总酚类含量的变化
Fig. 3 Change of total phenolics in pericarp of Huaizhi fruit after picking

“淮枝”果汁中溶于甲醇的酚类只为果皮的3%左右。以克干重表示的新鲜“淮枝”外果皮含总酚 45mg, 内果皮含 22.2mg。果实采后的头两天, 总酚含量不变 (外果皮) 或略

有增高(内果皮),接着下降(图3)。到第7天时,外果皮的总酚量为原有含量的71%,内果皮的总酚只减少了3%。结果表明,直接曝露于大气中的外果皮的酚类在果实老化时受到氧化,内果皮则通常只在果皮剥离时由于损伤及与空气接触而呈明显的褐变。

(三) 多酚氧化酶及苯丙氨酸解氨酶活性的变化

苯丙氨酸解氨酶及多酚氧化酶活性在最初两天内显著增大,然后随时间延长而降低(图4)。两种酶的活性-时间曲线形状很相似,相关系数 $R^2 = 0.70$,说明在其酶类代谢中的良好协调作用。与图1的花色素苷及图3的总酚量变化相比,虽然各自的变化幅度不同,但都是在采后2天的含量较高,随后降低。这说明“淮枝”果皮中酚类、花色素苷水平及多酚氧化酶和苯丙氨酸解氨酶活性之间的变化有一定的联系。

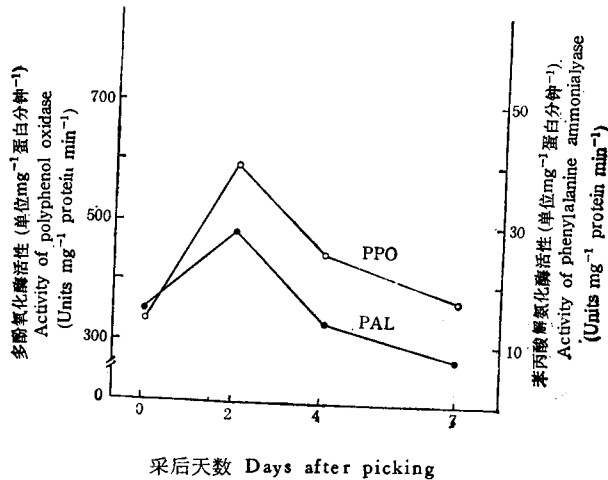


图4 采后淮枝果皮的多酚氧化酶及苯丙氨酸解氨酶活性的变化

Fig. 4 Changes of activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia-lyase in pericarp of Huaizhi fruit after picking

讨 论

采收时未达全熟的新鲜荔枝果实在室温贮放初期(2天),果皮中的类胡萝卜素、花色素苷、总酚含量以及多酚氧化酶和苯丙氨酸解氨酶活性增大的现象,表明果实进入成熟阶段,此时的果皮尚有较活跃的合成代谢能力。随后,两种酶活性降低,总酚及色素含量减少,反映了果实的衰老褐变。这些变化与果实内源乙烯在采后2—3天内增多^[3]以及果皮中氧化与过氧化作用加强等(另文报道)相应。

李堂察等^[2]根据褐变荔枝果皮的花色素苷外渗现象而认为褐变的主因是花色素苷颜色的改变。有人报道^[9]花色素苷受邻苯二酚氧化酶的作用而引起的降解,也能导致果蔬质量的降低。但葡萄的老叶中花色素苷的变化只为总酚最大变化的1/5^[10]。我们的结果看出,果皮的颜色从红到褐时(7天),总酚、类黄酮、叶绿素含量的相对变化较大,分别比采收当天降低29%、41%及54%。而外果皮的花色素苷只降低了10%左右。同时,研磨提取或以完整果实浸提花色素苷,在褐变果的完整果皮组织上或残渣中都可观察到不溶性褐色物。可见,荔枝的褐变主因不是花色素苷的颜色或数量的明显改变。褐色的产

生可能主要是酚类(包括部分类黄酮和花色素苷)氧化成醌,并通过自身聚合或与其他含—NH₂或—SH化合物聚合浓缩而成的物质。我们原来试图以果皮的花色素苷含量作为果色分级的定量指标,结果发现并不可行。

植物及组织中苯丙氨酸解氨酶活性与酚类化合物有密切的关系^[5],影响苯丙氨酸解氨酶诱导作用的各种因子通常刺激酚类化合物的形成^[13,14]。本文中,苯丙氨酸解氨酶活性的变化与花色素苷及总酚含量和多酚氧化酶活性的增减的近似趋势,表明荔枝果皮的总酚含量在一定程度上受到苯丙氨酸解氨酶活性的影响。通常,苯丙氨酸解氨酶活性的提高可能与乙烯的作用有关^[12],其失活取决于蛋白质合成的降低^[5]。

上面的结果再次表明,控制果实的褐变应着重防止酚类的氧化(酶促或非酶促)。目前,在室温下保藏荔枝,控制其有效商品期10天以上,尚缺乏妥善、重复性好而便于大量应用的技术。看来,除了已采用的薄膜包装辅以防腐剂及某些多酚氧化酶活性的抑制剂之外,进一步筛选新的抗氧化剂及其增效剂,考虑果实自身释放出微量乙烯的控制以及研究出最佳的贮藏湿度和气体成分,对于延长荔枝贮藏期、保持果实的色泽是必要的。

参 考 文 献

- [1] 广东荔枝贮藏协作组, 1975: 防止速冻荔枝果皮变褐的研究. 植物学报, **17**: 303—308.
- [2] 李堂察、蔡书芬、俞永标, 1983: 温度和数种不同处理对荔枝贮藏寿命的影响. 中国园艺(台湾省) **29**: 46—52.
- [3] 陈芳、李月栋、陈绵达, 1986: 荔枝果实贮藏中乙烯产生和控制. 园艺学报, (3), 151—155.
- [4] 谭兴杰、李月标, 1984: 荔枝果皮多酚氧化酶的部分纯化及性质. 植物生理学报, **10**: 339—346.
- [5] Camm, E. L. and G. H. N. Towers, 1973: Phenylalanine ammonia-Lyase *Phytochem.*, **12**: 961—973.
- [6] Dudely, K. and D. H. Northcote, 1979: Regulation of induction of phenylalanine ammonia-lyase in suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*. *Planta*, **146**: 433—440.
- [7] Fadeel, A. A., 1967: Location and properties of chloroplasts and pigment determination in root. *Physiol. Plant.*, **15**: 130—147.
- [8] Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, 1951: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265—275.
- [9] Mayer, A. M. and E. Harel, 1979: Polyphenol oxidases in plants. *Phytochem.*, **18**: 193—215.
- [10] Pirie, A. and M. G. Mullins, 1976: Changes in anthocyanin and phenolics content of grapevine leaf and fruit tissue treated with sucrose, nitrate and abscisic acid. *Plant Physiol.*, **58**: 468—472.
- [11] Prasad, U. S. and O. P. Jha, 1978: Changes in pigmentation patterns during litchi ripening: flavanoid production. *Plant Biochem. J.*, **5**: 44—49.
- [12] Riou, J., S. P. Monselise and R. S. Kahaa, 1969: Ethylene-controlled induction of phenylalanine ammonia-lyase in citrus fruit peel. *Plant Physiol.*, **44**: 631—635.
- [13] Zucker, M., 1965: Light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiol.*, **40**: 779—784.
- [14] Zucker, M., 1972: Light and enzyme. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **23**: 133—156.

THE CHANGES OF PIGMENTS, PHENOLICS CONTENTS AND ACTIVITIES OF POLYPHENOL OXIDASE AND PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE IN PERICARP OF POSTHARVEST LITCHI FRUIT

Lin Zhi-fang Li Shuang-shun Chang Dong-lin Lin Gui-zhu Li Yue-biao

Liu Shu-xian and Chen Mian-da

(South China Institute of Botany, Academia Sinica Guangzhou)

Abstract

A common litchi cultivar "Huaizhi" was used for the experiment to understand the changes of pigment, phenolics content and activities of two enzymes involving in phenolics metabolism in pericarp during storage at room temperature and relative humidity of 73—79%. The maturation of "Huaizhi" fruit was 80% when harvested.

The contents of carotenoid, anthocynin and activities of phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase were increased, and the content of total phenolics was kept at its initial level in the first 2 days of storage. It indicated that the active synthesis of pigments and phenolics still continued with the progressive ripening.

A decline of above parameters and content of flavonoid were observed during the senescence of fruit. The relative contents of anthocynin, flavonoid, phenolics and activity of phenylalanine ammonia-lyase were 90%, 59%, 71% and 46% in the day of 7 compared with that when harvested, respectively. Less change of anthocynin content was found in browning pericarp. The relation between phenolics, anthocynin and activities of two enzymes during ripening and senescence of litchi fruit was discussed.

Key words Pigment; Phenolics; Polyphenol oxidase; Phenylalanine ammonia-lyase; Litchi