

基于非靶向代谢组学分析黄桃果肉褐变过程中代谢产物的差异

龚意辉¹, 李丽梅¹, 黄华², 李论¹, 田宗琼¹, 张娟¹, 曾永贤¹, 陈致印^{1*}

¹ 湖南人文科技学院 农业与生物技术学院 湖南娄底 417000

² 广东省农业科学院果树研究所 农业农村部南亚热带果树生物学与遗传资源利用重点实验室
广东省热带亚热带果树研究重点实验室 广州 510640

摘要 以黄桃果实为试验材料, 利用非靶向代谢组学研究其贮藏期间不同褐变程度果肉中的代谢物差异。采用主成分分析、聚类分析、正交偏最小二乘判别分析等方法分析不同褐变程度果肉中的差异代谢产物。结果表明: PE 包装明显降低了黄桃果肉褐变指数, 以无褐变的果肉为对照, 共检出 991 种代谢物。在 CK 12 d vs CK 0 d 样本中, 共检出 206 种显著上调代谢物和 26 种显著下调代谢物, 而在 PE 12 d vs CK 0 d 样本中, 共检出 145 种显著上调代谢物和 58 种显著下调代谢物。经 HMDB 通路分析, 代谢物主要富集在 13 条通路中, 其中, 富集排名前 6 的通路分别是丙烷和聚酮化合物、脂质和类脂质分子、有机杂环化合物、有机酸及其衍生物、苯甲酸酯类、有机氧化合物。KEGG 通路分析表明, 代谢物主要富集在 10 条通路中, 其中, 富集排名前 4 的通路为其它次生代谢产物的生物合成、氨基酸代谢、辅因子和维生素的代谢通路, 其它氨基酸代谢等通路。研究从代谢组学角度初步揭示了黄桃果肉褐变过程中代谢产物的差异性, 为提高黄桃果实品质提供理论参考。

关键词 黄桃; 褐变; 包装; 非靶向代谢组学; 差异代谢物; 通路分析

文章编号 1009-7848(2023)02-0265-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.02.026

黄桃 (*Amygdalus persica*) 是湖南省最重要的特色水果之一, 富含大量的番茄红素、番茄黄素、胡萝卜素、维生素 C、膳食纤维等营养物质^[1], 具有果实大、果型优美、色泽金黄、肉质鲜美、口味香甜等特点, 其营养和经济价值都很高, 深受国内外广大消费者的欢迎。近年来, 黄桃种植已成为湖南省的重点支柱产业和扶贫产业, 是促进各县市农民产业增收的重要手段。然而, 黄桃采收时正处于高温盛夏季节, 采摘后的黄桃果实因代谢旺盛而易发生果实软化, 从而引发果肉褐变和异味现象的发生, 导致黄桃果实品质和市场价值下降, 严重制约了我省黄桃产业的进一步发展^[2]。

代谢组学 (Metabonomics) 是生物组学中发展出来的一门新兴学科, 是利用高通量化学分析技术对某一生物体细胞、组织中所有小分子代谢产物进行定性和定量研究的一门新学科, 是解决诸多果蔬采后病害问题的有效工具之一^[3-4]。其中, 非靶向代谢组学 (Untargeted metabolomics) 能全面反映生物样本中的代谢物信息, 有助于挖掘生物样本新的代谢通路等^[5]。代谢组学技术广泛应用于植物代谢及逆境响应机理^[6], 营养科学^[7], 采后病害诊断^[8], 品种鉴定^[9]等方面。Busatto 等^[10]利用靶向代谢组学技术 (Targeted metabolomics) 鉴定了苹果虎皮病发生过程中的代谢物差异, 发现表儿茶素、儿茶素、绿原酸等代谢物与虎皮病的形成有着密切的关系。Lee 等^[11]利用 LC-MS 技术研究了二苯胺 (DPA) 处理的苹果贮藏期间各代谢物含量的变化规律, 表明乙醛、乙酸乙酯和乙醇等挥发性代谢物的积累与果肉褐变有着密切的关系。Pedreschi 等^[12]利用 LC-MS 技术解析贵妃梨气调贮藏过程中果心褐变的发生机理, 发现葡萄糖酸和 GABA 可能是果心褐变和坍塌的代谢标志物。Gong 等^[13]基于非靶向代谢组学技术在苹果果皮中共鉴定出 833 种代谢产物, 其中 59 种显著差异代谢参与虎

收稿日期: 2022-02-02

基金项目: 湖南省自然科学基金项目 (2020JJ5270); 湖南省教育厅科学研究项目 (20A281); 湖南省科技创新计划项目 (2020RC1014); 湖南省教育厅创新创业教育中心 (湘教通 [2019]333 号); 湖南省教育厅新农科研究与改革实践项目 (湘教通 [2020]94 号); 湖南创新型省份建设专项经费资助项目 (2020NK4244); 湖南省普通高等学校教学改革研究项目 (HNJG-2020-0963)

第一作者: 龚意辉, 男, 博士, 讲师

通信作者: 陈致印 E-mail: 772612626@qq.com

皮病的形成。目前,国内外学者从酶促褐变、乙烯合成等角度深入研究了桃果肉褐变机理^[14-15],然而,利用代谢组学技术分析采后黄桃果肉褐变进程中的代谢物质目前尚无研究报道。本研究采用LC-MS/MS技术,以黄桃果实为试验材料,利用非靶向代谢组学技术对采后黄桃果肉褐变进程中的代谢物进行研究,以探明黄桃果肉褐变过程中的关键代谢物,为进一步完善黄桃果肉褐变机理及其控制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验处理

以采自冷水江市水云峰基地的黄桃果实为试验材料,所采摘果实的生长环境和栽培管理一致,挑选无病虫害、果形和色泽一致的果实。随机挑选30个黄桃果实为一组,装入PE薄膜袋中,放入温度为(20±1)℃,且湿度为85%的恒温箱中贮藏12 d。以无处理的黄桃果实作为对照组(CK),在同样条件下贮藏12 d,并进行3次生物学重复。分别在果实贮藏0,3,6,9,12 d后切取1 cm厚的果肉,用液氮速冻后立即放在-80℃的超低温冰箱中保存,用于后续样品的LC-MS/MS分析。

1.2 主要试剂与仪器

水,德国Merck公司,醋酸铵、甲酸、甲醇等质谱试剂,美国Thermo Fisher公司,PE薄膜袋(规格为200 mm×200 mm,厚度为0.05 mm),广州健阳生物科技有限公司。

D3024R 低温离心机,美国Scilogex公司, Vanquish UHPLC 色谱仪、Q Exactive™ HF-X 质谱仪,德国Thermo Fisher公司,Hypesil Gold column 色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.9 μm),美国Thermo Fisher公司等。

1.3 方法

1.3.1 褐变指数的测定 参照李丽梅等^[16]的方法。将黄桃果实中间部位纵切成两半,按照黄桃果肉褐变程度进行分级。0级:果肉完全无褐变;1级:1%~10%面积果肉轻微褐变;2级:10%~30%的褐变面积;3级:30%~50%的褐变面积;4级:果肉褐变面积>50%。

褐变指数=Σ(褐变级别×该级果实数占总黄桃数的百分比)。

1.3.2 黄桃果肉代谢物的提取 根据Want等^[17]的方法,称100 mg黄桃果肉样品,立即加入液氮速冻后研磨成粉末,加500 μL 80%甲醇用振荡器混匀,将黄桃果肉代谢物提取液放在冰上静置5 min,4℃、15 000×g条件下离心20 min取上清液,加质谱级水将甲醇体积分数稀释至53%;将样品在4℃、15 000×g条件下离心20 min取100 μL的上清液,全部用0.22 μm的有机相过滤后转入LC进样瓶中,以在每个提取液中吸取30 μL混匀作为质控QC样本,以53%甲醇作为空白对照,与试验样品进行同样的操作,将各提取液记录好并放入超低温冰箱中保存,用于后续质谱数据的采集。

1.3.3 色谱条件 柱温:40℃;流速:0.2 mL/min;正离子模式:流动相A:0.1%甲酸,流动相B:甲醇;负离子模式:流动相A:5 mmol/L醋酸铵(pH 9.0),流动相B:甲醇;进样体积:100 μL;按照体积比进行梯度洗脱,洗脱程序为:0~1.5 min,2%~2% B;1.5~14 min,2%~100% B;14~17 min,100%~2% B。

1.3.4 质谱条件 正负离子模式扫描范围 *m/z* 100~1 500;质谱电压3 200 V,离子源温度320℃,GS I和GS II分别为276 000 Pa和69 000 Pa,采用数据依赖型串联质谱法进行MS/MS二级扫描。

1.3.5 代谢物定性与定量 利用Compound Discoverer 3.1软件对黄桃果肉样本的下机数据(.raw)文件进行预处理,首先依据每种代谢物的保留时间、分子质量、质荷比等进行初步筛选,然后按照质量偏差和保留时间偏差在不同果肉样本比较组中进行峰对齐,再与北京诺禾致源科技股份有限公司自建代谢物数据库、mzCloud(<https://www.mzcloud.org/>)、mzVault等数据库进行匹配,鉴定黄桃果肉中的代谢物。最后对果肉样品中鉴定到的色谱峰进行积分,每个色谱峰对应一种代谢物,其相对含量用峰面积表示。

1.3.6 数据分析 使用Compound Discoverer 3.1软件对黄桃果肉褐变中所鉴定的代谢物数据进行相对定性和定量分析。采用主成分(PCA)、正交偏最小二乘判别分析(Orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA)等方法分析了黄桃各果肉样本中的显著差异代谢物。

根据 OPLS-DA 法判断模型稳定性和准确性。利用多维统计 VIP 值、差异倍数 (Fold change, FC) 以及 q 值分析黄桃果肉褐变中的显著代谢物, 显著代谢物满足 $FC \geq 1.2$ 或 ≤ 0.8333 , 且 $q < 0.05$ 两个条件。通过 Hem1.0 程序对黄桃果肉褐变进程中的显著差异代谢物进行聚类分析并绘制热图。利用 HMDB 数据库 (<https://hmdb.ca/metabolites>) 和 KEGG 数据库 (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) 对黄桃果肉褐变过程中的代谢物进行通路分析。

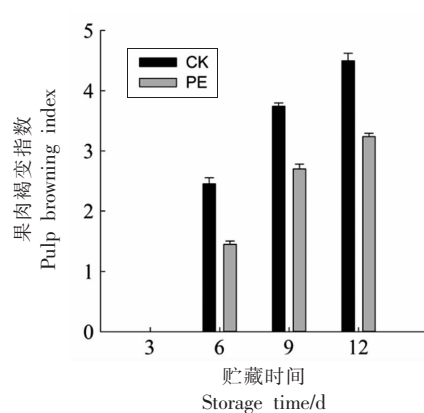
2 结果分析

2.1 PE 包装对果肉褐变的影响

在采后黄桃果实贮藏期间, PE 包装和对照组的果肉褐变指数均不断增加, PE 包装处理的黄桃果肉在第 3 天没有出现果肉褐变的现象, PE 包装的果肉褐变指数始终低于对照组 (图 1), 说明 PE 包装处理明显抑制黄桃果肉褐变的发生。

2.2 差异代谢物筛选结果

基于北京诺禾致源科技股份有限公司自建代谢物数据库、mzCloud、mzVault 等数据库, 对黄桃果肉褐变过程中的代谢物进行定性和定量分析。



注: 0 d 时果肉褐变指数为 0。

图 1 PE 包装对果肉褐变指数的影响

Fig.1 The effect of PE packaging on pulp browning index

表 1 显示, 共在黄桃果肉中检测出 991 种代谢化合物, 在 CK 12 d vs CK 0 d 样品中共筛选出 232 种显著差异代谢物, 相对含量显著上调、下调的代谢物分别为 206 种和 26 种; 在 PE 12 d vs CK 0 d 样品中共筛选出 203 种显著差异代谢物, 相对含量显著上调、下调的代谢物分别为 145 种和 58 种; 而在其它果肉样本中, 显著差异代谢物总数相对较少。

表 1 黄桃果实贮藏过程中差异代谢物的筛选

Table 1 Identification differential metabolites during the storage of peach fruit

| 样品比较 | 代谢物总数 | 显著差异代谢物 | 显著上调代谢物 | 显著下调代谢物 |
|-------------------|-------|---------|---------|---------|
| CK 12 d vs CK 0 d | 991 | 232 | 206 | 26 |
| PE 12 d vs CK 0 d | 991 | 203 | 145 | 58 |
| PE 9 d vs CK 9 d | 991 | 64 | 4 | 60 |
| PE 6 d vs CK 6 d | 991 | 73 | 12 | 61 |
| PE 3 d vs CK 3 d | 991 | 13 | 7 | 6 |

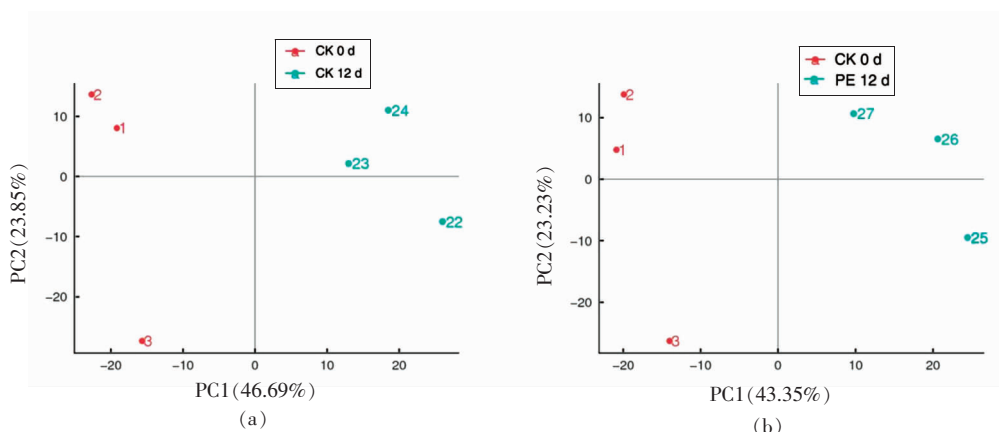
2.3 PCA 分析

分别对 CK 12 d vs CK 0 d 和 PE 12 d vs CK 0 d 样本进行主成分 (PCA) 分析, 以阐明褐变严重的果肉 (CK 12 d)、褐变中等程度的果肉 (PE 12 d) 和无褐变 (CK 0 d) 各分间和组内样品之间的变异度大小。PCA 结果显示, 在 CK 12 d vs CK 0 d 样本中, PC1、PC2 的贡献率分别为 46.69%、23.85%, CK 12 d vs CK 0 d 样本分离较为明显, 组内之间褐变严重的果肉样品分离小于无褐变的果肉样品, PCA 结果说明在 CK 12 d vs CK 0 d

样品比较对中的代谢物差异较大 (图 2a)。而在 PE 12 d vs CK 0 d 样本中, PC1、PC2 的贡献率分别为 43.35%、23.23%, 且 PE 12 d vs CK 0 d 样本在二维图上呈现出明显的分离趋势, 组内之间褐变中等程度的果肉样品分离小于无褐变的果肉样品, PCA 结果说明: 在 PE 12 d vs CK 0 d 样本中的代谢物存在较大的差异 (图 2b)。

2.4 OPLS-DA 分析

本研究采用的偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 能够实现黄桃果肉样品组间区分的最大



注:图中1、2、3、22、23、24、25、26、27分别表示CK 0 d、CK 12 d、PE 12 d样品3次生物学重复,下同。

图2 样品组间的PCA得分图

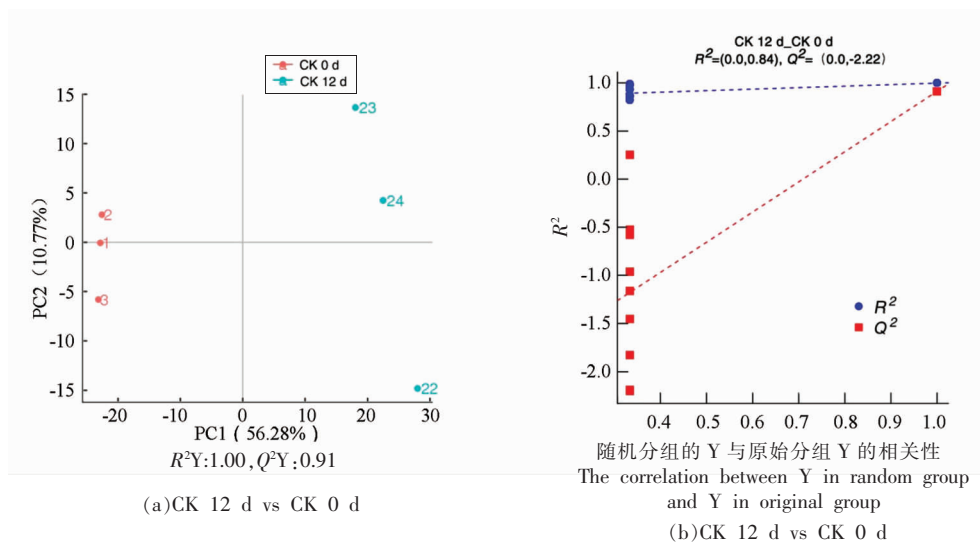
Fig.2 PCA results of samples

化,便于筛选黄桃果肉褐变中的差异代谢物。利用OPLS-DA模型分析了黄桃果肉褐变发生过程中991种代谢物,没有褐变的果肉样品(CK 0 d)和褐变程度严重的果肉样品(CK 12 d)分别位于置信区间左侧和右侧,并且CK 0 d和CK 12 d样本间具有明显的区分度(图3a)。PC1和PC2的贡献率为56.28%和10.77%, $R^2Y=1$ 、 $Q^2Y=0.91$,证实了OPLS-DA模型比PCA分析黄桃果肉褐变差异代谢物效果更佳(图3a)。进一步对该模型进行了200次排列试验验证,根据200次打乱并建模后的 Q^2 值和 R^2 值可以得到它们的回归线, $R^2=0.84$ 大于 $Q^2=-2.22$,并且 Q^2 回归线与Y轴截距小于0,表明该模型没有“过拟合”,能准确地描述样本的信息(图3b)。没有褐变果肉样品(CK 0 d)和中等褐变程度果肉(PE 12 d)分别位于置信区间左

侧和右侧,且CK 0 d和PE 12 d区分明显。PC1、PC2的贡献率分别为52.24%、17.82%, $R^2Y=0.99$ 、 $Q^2Y=0.81$ (图3c)。同样对该模型进行了200次的排列试验验证, $R^2=0.88$ 大于 $Q^2=-2.09$,同样说明该模型未“过拟合”且更好地分析果肉样品信息(图3d)。

2.5 差异代谢物火山图

分别对CK 12 d vs CK 0 d和PE 12 d vs CK 0 d两组样本进行火山图分析(图4),红、绿和灰3种颜色分别表示代谢物的相对含量呈显著上调、显著下调、无显著变化,表明CK 12 d vs CK 0 d和PE 12 d vs CK 0 d两组样本中大部分代谢物无显著变化,少数代谢物相对含量呈显著上调或下调。



(a)CK 12 d vs CK 0 d

(b)CK 12 d vs CK 0 d

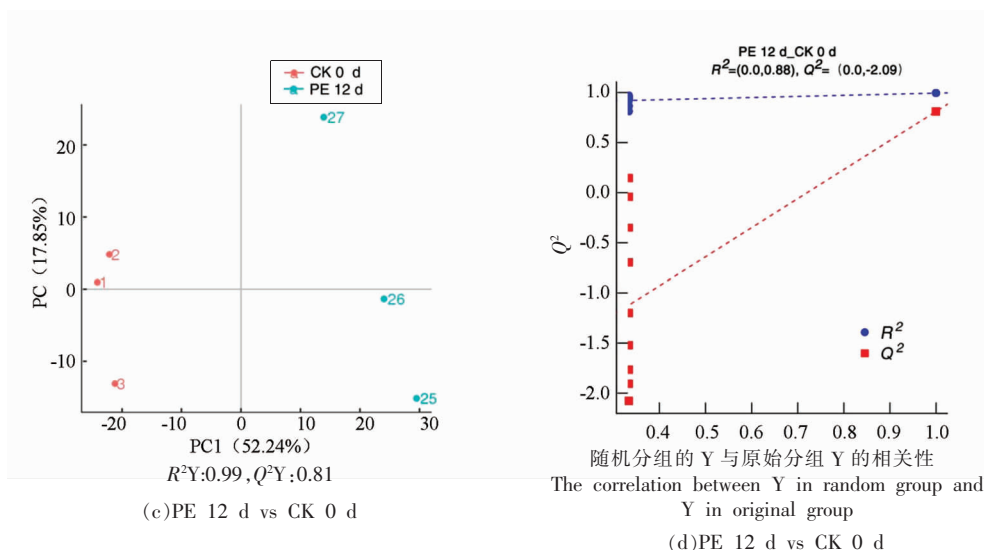


图 3 不同黄桃果肉 OPLS-DA 得分图及置换图

Fig.3 OPLS-DA score chart and replacement chart of different yellow peach pulp

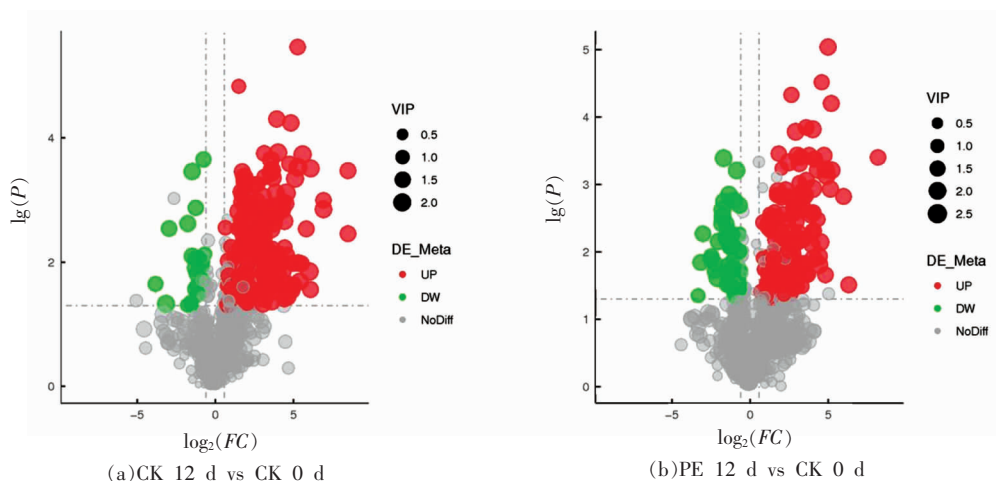


图 4 正离子模式下的组间火山图

Fig.4 Volcano map of two groups of samples in positive ion mode

2.6 差异代谢物聚类分析

采用聚类分析方法对黄桃果肉贮藏过程中的差异代谢物进行分析, 图中颜色表示果肉中代谢物的相对含量, 颜色越红则表示果肉中代谢物的相对含量越高, 越蓝则表示果肉中代谢物的相对含量越低。图 5 和图 6 形象说明了代谢物在黄桃果肉褐变过程中的变化规律。在 CK 12 d vs CK 0 d 样品中, 在 232 种显著差异代谢物中, 果肉褐变严重的 (CK 12 d) 相对无褐变的果肉样品 (CK 0 d) 有 206 种代谢物显著上调, 显著上调代谢物占 232 种差异代谢物的 88.79%, 包括紫杉醇 A、纳

地西酮、4-苯基丁酸、2-苯基苯酚等 206 种代谢物含量显著上调, 然而儿茶素、表儿茶素、原花青素 B2、黄芩素 B、烟酸等 26 种代谢物的含量呈显著下调, 仅为显著代谢物总数的 11.21% (图 5)。而在 PE 12 d vs CK 0 d 果肉样品中, 共筛选出显著代谢物 203 种, 褐变程度中等的果肉样品 (PE 12 d) 相比无褐变的果肉样品 (CK 0 d), 有春日霉素、蝶呤 B、青蒿素、脱落酸葡萄糖酯等 145 种代谢物含量显著上调, 占显著代谢物总数的 71.43%, 而哌可酸、醌、黄嘌呤酸等 58 种化合物的含量呈显著下调, 占总显著代谢化合物的 28.57% (图 6)。

2.7 差异代谢物通路分析

2.7.1 HMDB 通路分析 利用 Human Metabolome Database 数据库对黄桃果肉褐变过程中的显著代谢物进行 HMDB 通路分析(图 7)。黄桃果肉褐变进程中的显著代谢物主要注释到 13 条 HMDB 通路中,其中显著代谢物数量分布排名前 6 条代谢途径分别为:①苯丙烷和聚酮化合物代谢通路(Phenylpropanoids and polyketides),包括香豆素、槲皮素、芦丁、儿茶素、三甲氧基肉桂酸等 75 种化合物;②脂质和类脂质分子(Lipids and lipid-like molecules),包括 *D*-泛醇、皮质醇、香芹酮、十六酰胺、麦芽糖醇、硬脂酰胺等 71 种化合物;③有机杂环化合物(Organoheterocyclic compounds),主要包括间苯三酚、烟酸、烟酰胺、鸟嘌呤、1-甲基腺嘌呤、3-吡啶丙酸、维生素 B₂、甾胆素等 53 种化合物;④有机酸及其衍生物(Organic acids and derivatives),主要包括 *L*-苯丙氨酸、脯氨酸、*L*-焦谷氨酸、哌啶酸、*L*-酪氨酸、*L*-苏氨酸、胱硫醚、肌酸、精氨酸琥珀酸等 50 种化合物;⑤苯甲酸酯类

(Benzenoids),主要包括香兰素、丁香酸、没食子酸、丁香酚、4-乙基苯酚、原儿茶酸等 40 种化合物。⑥有机氧化合物(Organic oxygen compounds),主要包括葡萄糖 1-磷酸、*L*-艾多醇、*N*-乙酰-*D*-半乳糖胺、胞壁酸、苯乙酮等 25 种化合物。

2.7.2 KEGG 通路分析 利用 KEGG 数据库对黄桃果肉褐变中的差异代谢物进行通路注释分析结果(图 8)显示,将黄桃果肉褐变代谢物分为 3 大类:1)环境信息加工(Environmental information processing),包括信号转导(Signal transduction)和跨膜运输(Membrane transport)两个亚类,其中水杨酸、吡啶-3-乙酸、肌醇参与信号转导途径,维生素 B₁、*L*-苏氨酸、*L*-苯丙氨酸等 10 种化合物参与跨膜运输代谢通路;2)遗传信息加工(Genetic information processing),包括翻译(Translation)和折叠、分类及降解(Folding, sorting and degradation)两个亚类,其中 *L*-天冬酰胺、*L*-酪氨酸、*L*-谷氨酸等 7 种化合物参与翻译通路,*S*-腺苷甲硫氨酸、维

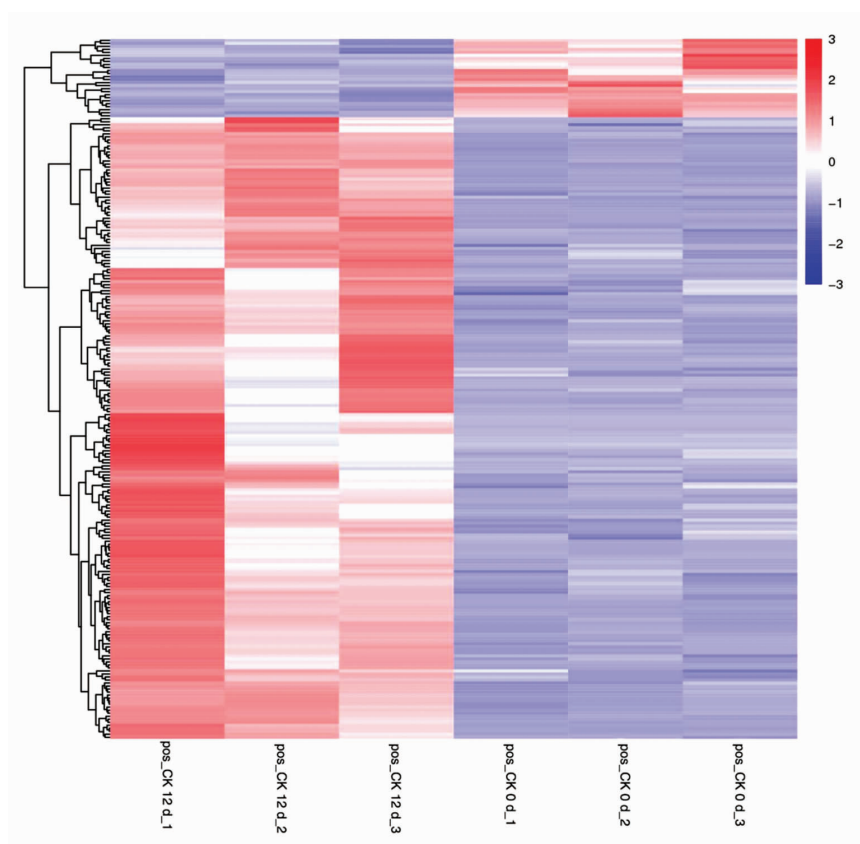


图 5 正离子模式 CK 12 d 与 CK 0 d 差异代谢物聚类分析热图

Fig.5 The differential metabolites between CK 12 d and CK 0 d in positive ion mode performed in heat map

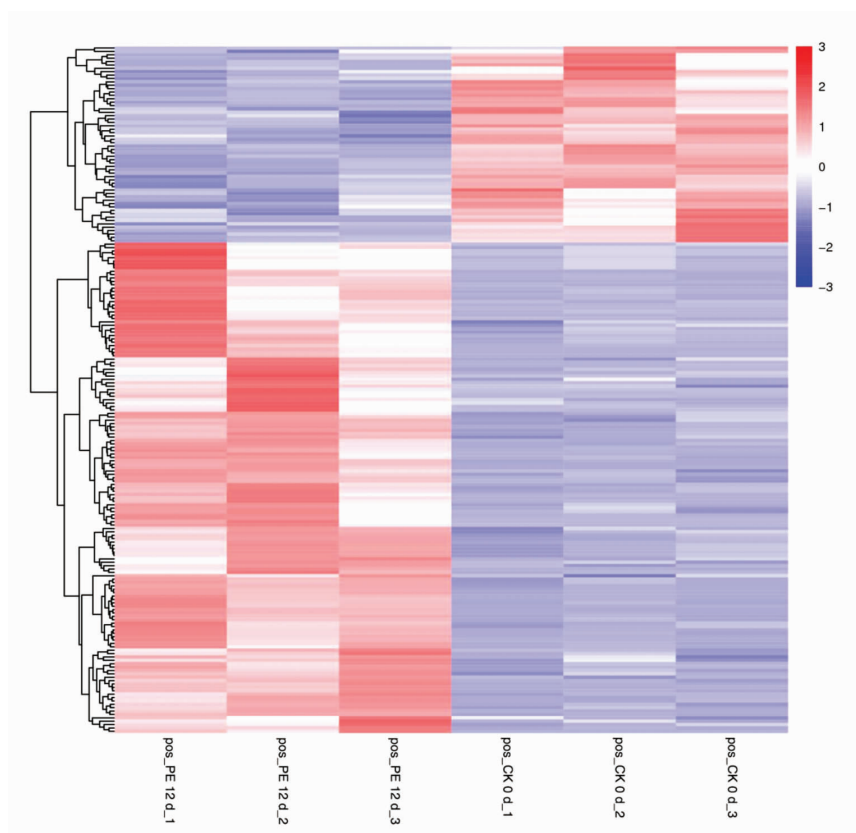


图 6 正离子模式 PE 12 d 与 CK 0 d 差异代谢物聚类分析热图

Fig.6 The differential metabolites between PE 12 d and CK 0 d in positive ion mode performed in heat map

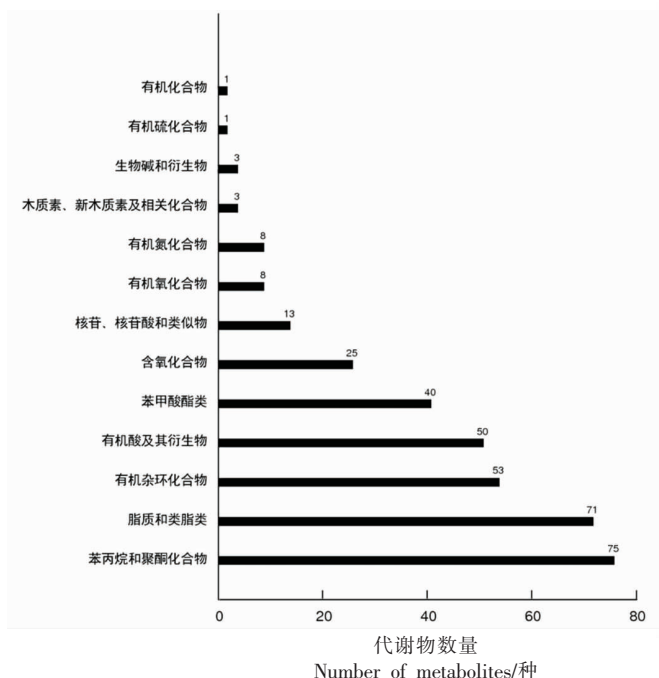


图 7 黄桃果肉中差异代谢物的 HMDB 富集分析
Fig.7 Differential metabolites of yellow pulp in HMDB enrichment map

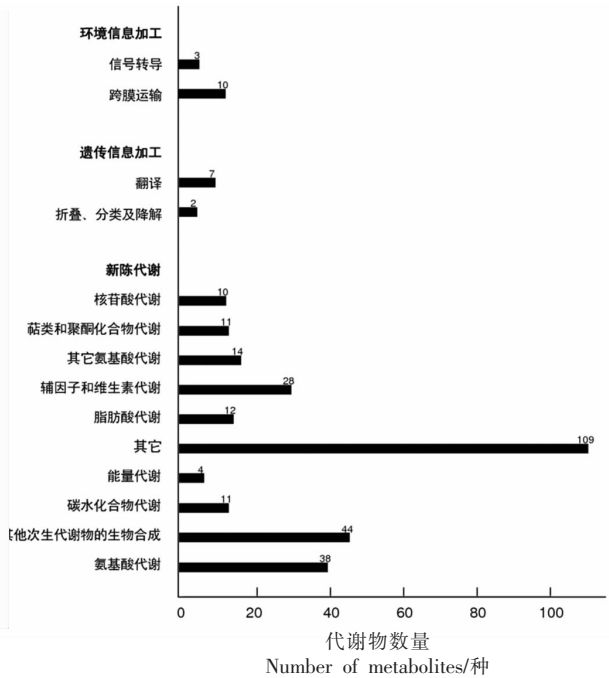


图 8 黄桃果肉中差异代谢产物的 KEGG 富集分析
Fig.8 Differential metabolites of yellow pulp in KEGG enrichment map

生素 B₁ 参与折叠、分类及降解通路;3) 新陈代谢 (Metabolism), 包括其它次生代谢物的生物合成通路 (Biosynthesis of other secondary metabolites)、氨基酸代谢通路 (Amino acid metabolism)、辅因子和维生素的代谢通路 (Metabolism of cofactors and vitamins)、其它氨基酸的代谢通路 (Metabolism of other amino acids)、脂肪酸代谢 (Lipid metabolism) 等 10 个二级分类, 其中绿原酸、酪胺、羽扇豆碱等 44 种化合物参与其它次生代谢物的生物合成通路, 原儿茶酸、D-脯氨酸、酪胺香兰素等 38 种化合物参与氨基酸代谢途径, 泛酸、烟酰胺、生物素等 28 种化合物参与辅因子和维生素代谢途径, L-焦谷氨酸、亚精胺、精胺等 14 种化合物参与其它氨基酸的代谢途径, 花生四烯酸、亚油酸、磷胆碱等 12 种化合物参与脂肪酸代谢途径。

3 讨论

近年来, 国内外学者利用 HPLC 技术对桃果实中的酚类物质鉴定进行了大量的研究, 发现桃果肉中存在大量的酚类化合物, 且种类较多^[18-19]。Zhang 等^[20]利用 HPLC 技术鉴定出表儿茶素、芦丁、绿原酸、儿茶素、根皮苷等化合物是组成桃果肉主要的酚类物质。不同色泽桃果肉中富含酚类物质的种类和含量有较大的差别。表儿茶素、绿原酸、儿茶素和新绿原酸是红肉桃主要富含的酚类成分, 表儿茶素、绿原酸和儿茶素是黄肉桃主要富含的酚类成分, 芦丁、新绿原酸和儿茶素则组成了白肉桃主要的酚类成分^[21-22]。这些研究表明, 利用 HPLC 鉴定果实中代谢化合物种类有限。本研究主要利用非靶向代谢组学技术对采后黄桃果肉褐变发生过程中的代谢物进行了分析, 共在黄桃果肉中鉴定出 991 种代谢物质, 大多数代谢物的相对含量在果肉褐变过程中没有显著变化, 只有少数代谢物的相对含量显著上调或下调。例如共在 CK 12 d vs CK 0 d 样本中确定 232 种显著代谢物, 有 206 种化合物显著上调和 26 种化合物显著下调。方贤胜等^[23]利用广靶代谢组学技术在浅黄色和紫色核桃内种皮中检测出 680 种次生代谢物。Gong 等^[13]利用非靶向代谢组学技术在蛇果和科特兰苹果虎皮病发生过程中共鉴定出 833 种代

谢化合物, 共筛选出 59 种差异代谢物。Doppler 等^[24]利用非靶向代谢组学方法分别在小麦穗、茎、叶、根组织中检测出 871, 785, 733, 517 种代谢物。这些结果说明, 非靶向代谢组学技术相比 HPLC 技术具有鉴定代谢物种类多、准确度、高效等优势。

果蔬褐变与组织中酚类底物种类及其相对丰度关系密切。目前大多数学者认为, 果实酚类底物的含量随着果实褐变症状的严重而表现出降低的趋势, 是因为这些酚类底物被 PPO 催化氧化聚合形成褐色物质, 从而使得果实褐变的症状表现出来。本研究非靶向代谢组学技术在黄桃果肉褐变过程中发现儿茶素、表儿茶素、绿原酸、原花青素 B₂、黄芩素 B、烟酸等 26 种代谢物的相对含量显著下调, 暗示这些物质可能作为黄桃果肉褐变的底物, 被 PPO 催化氧化消耗, 加速了黄桃果肉褐变的进程。武倩^[25]在深州蜜桃果肉中发现褐变指数与酚类物质的含量变化呈显著对应关系。有学者发现儿茶素、表儿茶素、绿原酸的含量均随着桃果肉褐变症状的加深而表现出不断下降的趋势^[26-27]。Duan 等^[28]提取和纯化了桃果肉中部分 PPO, 并利用 HPLC 技术分离出 PPO 的天然底物, 将 PPO 与底物混合后立即形成褐色, 结果表明了 PPO 能催化氧化酚类物质导致果肉褐变的发生。这些研究表明, 引起黄桃果肉褐变的因素很多且复杂, 跟果肉中代谢物的种类、相对含量、酶促褐变等因素密切相关。

4 结论

本文建立了基于 LC-MS/MS 对黄桃果肉褐变过程中差异次生代谢物的非靶向代谢组学分析方法。在黄桃果肉中共鉴定出 991 种代谢物, 在 CK 12 d vs CK 0 d 样品中, 共有 206 种代谢物显著上调, 包括紫杉醇 A、纳地西酮、4-苯基丁酸、2-苯基苯酚等 206 种代谢物含量显著上调, 而儿茶素、表儿茶素、原花青素 B₁、黄芩素 B、烟酸等 26 种代谢物的含量显著下调, 这些代谢物质可能作为果肉褐变的底物, 被逐渐氧化消耗, 暗示这些代谢物可能参与黄桃果肉的褐变进程。本研究在黄桃果肉褐变过程中所鉴定的关键代谢物可为果肉褐变控制技术的研发提供理论支撑。

参 考 文 献

- [1] ROBERTSON J A, HORVAT R J, LYON B G, et al. Comparison of quality characteristics of selected yellow and white-fleshed peach cultivars[J]. *Journal of Food Science*, 2010, 55(5): 1308-1311.
- [2] 何双, 李高阳, 蒋成, 等. 气调贮藏对黄桃风味和软化及褐变相关酶的影响[J]. *现代农业科技*, 2019 (7): 202-205.
HE S, LI G Y, JIANG C, et al. Effect of controlled atmosphere storage on flavor, softening, browning related enzymes of yellow peach[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2019 (7): 202-205.
- [3] HOLMES E, NICHOLSON J K, NICHOLLS A W, et al. The identification of novel biomarkers of renal toxicity using automatic data reduction techniques and PCA of proton NMR spectra of urine [J]. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 1998, 44(1/2): 245-255.
- [4] JIANG N H, ZHU H L, LIU W, et al. Metabolite differences of polyphenols in different litchi cultivars (*Litchi chinensis* Sonn.) based on extensive targeted metabolomics[J]. *Molecules*, 2021, 26(4): 1181.
- [5] RUBERT J, RIGHETTI L, STRANSKA-ZACHARIASOVA M, et al. Untargeted metabolomics based on ultra-high-performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry merged with chemometrics: A new predictable tool for an early detection of mycotoxins[J]. *Food Chemistry*, 2016, 224 (1): 423-431.
- [6] PARK S, SEO Y S, HEGEMAN A D. Plant metabolomics for plant chemical responses to below-ground community change by climate change [J]. *Journal of Plant Biology*, 2014, 57(3): 137-149.
- [7] TEBANI A, BEKRI S. Paving the way to precision nutrition through metabolomics[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2019, 6: 41.
- [8] GOWDA N, ZHANG S, GU H, et al. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics[J]. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2008, 8(5): 617-633.
- [9] WANG H J, CAO X L, YUAN Z F, et al. Untargeted metabolomics coupled with chemometrics approach for Xinyang Maojian green tea with cultivar, elevation and processing variations[J]. *Food Chemistry*, 2021, 352(8): 129359.
- [10] BUSATTO N, FARNETI B, TADIELLO A, et al. Target metabolite and gene transcription profiling during the development of superficial scald in apple (*Malus x domestica* Borkh)[J]. *Bmc Plant Biology*, 2014, 14(1): 193-193.
- [11] LEE J, MATTHEIS J P, RUDELL D R. Antioxidant treatment alters metabolism associated with internal browning in 'Braeburn' apples during controlled atmosphere storage[J]. *Postharvest Biology & Technology*, 2012, 68: 32-42.
- [12] PEDRESCHI R, FRANCK C, LAMMERTYN J, et al. Metabolic profiling of 'Conference' pears under low oxygen stress[J]. *Postharvest Biology & Technology*, 2009, 51(2): 123-130.
- [13] GONG Y H, SONG J, PALMER L C, et al. Tracking the development of the superficial scald disorder and effects of treatments with diphenylamine and 1-MCP using an untargeted metabolomic approach in apple fruit[J]. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 2021, 2: 100022.
- [14] 张洪礼, 马玉华, 王宇, 等. 锦绣黄桃品质的影响因素及贮藏保鲜技术研究进展[J]. *贵州农业科学*, 2019, 47(7): 91-95.
ZHANG H L, MA Y H, WANG Y, et al. Advances in quality influencing factors and storage and preservation technology of Jinxiu yellow peach [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2019, 47(7): 91-95.
- [15] TECHAKANON C, GRADZIEL T M, BARRETT D M. Effects of peach cultivar on enzymatic browning following cell damage from high-pressure processing [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(40): 7606-7614.
- [16] 李丽梅, 关军锋, 冯云霄, 等. 包装和乙烯吸收剂对大久保桃贮藏品质的影响[J]. *保鲜与加工*, 2010, 10(1): 27-29.
LI L M, GUAN J F, FENG Y X, et al. Effects of packaging and ethylene absorbent on storage quality of okubo peach[J]. *Storage and Process*, 2010, 10 (1): 27-29.
- [17] WANT E J, MASSON P, MICHOPoulos F, et al. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS[J]. *Nature Protocols*, 2012, 8 (1): 17-32.

- [18] ANDREOTTI C, RAVAGLIA D, RAGAINI A, et al. Phenolic compounds in peach (*Prunus persica*) cultivars at harvest and during fruit maturation[J]. *Annals of Applied Biology*, 2008, 153(1): 11–23.
- [19] LIAO X, GREENSPAN P, PEGG R B. Characterizing the phenolic constituents and antioxidant capacity of Georgia peaches[J]. *Food Chemistry*, 2019, 271: 345–353.
- [20] ZHANG X N, SU M S, DU J H, et al. Comparison of phytochemical differences of the pulp of different peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] cultivars with alpha-glucosidase inhibitory activity variations in China using UPLC-Q-TOF/MS[J]. *Molecules*, 2019, 24(10): 1968.
- [21] 严娟, 蔡志翔, 沈志军, 等. 桃3种颜色果肉中10种酚类物质的测定及比较[J]. *园艺学报*, 2014, 41(2): 319–328.
- YAN J, CAI Z X, SHEN Z J, et al. Determination and comparison of 10 phenolic compounds in peach with three types of flesh color[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, 41(2): 319–328.
- [22] CECCARELLI D, SIMEONE A M, NOTA P, et al. Phenolic compounds (hydroxycinnamic acids, flavan-3-ols, flavonols) profile in fruit of Italian peach varieties[J]. *Plant Biosystems—An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 2016, 150(6): 1370–1375.
- [23] 方贤胜, 吴涛, 肖良俊. 基于广泛靶向代谢组学的浅黄色和紫色核桃内种皮成分差异分析[J]. *食品科学*, 2021, 42(12): 215–221.
- FANG X S, WU T, XIAO L J. Broadly targeted metabolomics analysis of differential metabolites between light yellow and purple walnut endocarps[J]. *Food Science*, 2021, 42(12): 215–221.
- [24] DOPPLER M, KLUGER B, BUESCHL C, et al. Stable isotope-assisted evaluation of different extraction solvents for untargeted metabolomics of plants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(7): 1017.
- [25] 武倩. 深州蜜桃采后衰老褐变的生理生化机制与调控[D]. 石家庄: 河北师范大学, 2016.
- WU Q. The biochemical mechanism and regulation of senescence, browning in the postharvest Shenzhou honey peach[D]. Shijiazhuang: Hebei Normal University, 2016.
- [26] BRANDELLI A, LOPES C H G L. Polyphenoloxidase activity, browning potential and phenolic content of peaches during postharvest ripening[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2005, 29(6): 624–637.
- [27] INFANTE R, CONTADOR L, RUBIO P, et al. Postharvest sensory and phenolic characterization of ‘Elegant Lady’ and ‘Carson’ peaches[J]. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 2011, 71(3): 445.
- [28] DUAN Y Q, DONG W, ZHANG M J, et al. Properties of polyphenol oxidase extracted from Zhonghuashoutao peach flesh[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 41(3): 795–799.

Analysis of Metabolite Differences during the Browning Process of Yellow Peach Based on Untargeted Metabolomics

Gong Yihui¹, Li Limei¹, Huang Hua², Li Lun¹, Tian Zongqiong¹, Zhang Juan¹, Zeng Yongxian¹, Chen Zhiyin^{1*}
 (¹School of Agriculture and Biotechnology, Hunan University of Humanities, Science and Technology,
 Loudi 417000, Hunan

²Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of South Subtropical Fruit Biology and Genetic Resource Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Provincial Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fruit Tree Research, Guangzhou 510640)

Abstract In this study, untargeted metabolomics method was used to identify and analysis the differences of metabolites during the browning of yellow peach. Yellow peach fruit were taken as experimental materials, and their metabolites were analyzed by principal component analysis (PCA), cluster analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). The results indicated that pulp browning was significantly inhibited by PE packaging treatment. A total of 991 metabolites were detected in yellow peach fruit. 206 significantly up-regulated metabolites and 26 significantly

down-regulated compounds were identified in the CK 12 d vs CK 0 d samples. While 145 significantly up-regulated metabolites and 58 significantly down-regulated compounds were identified in the PE 12 d vs CK 0 d samples. There were 13 HMDB metabolic pathways by using HMDB database. The first top 6 pathways were phenylpropanoids and polyketides, lipids and lipid-like molecules, organoheterocyclic, organic acids and derivatives, benzenoids and organic oxygen compounds. KEGG results showed that differential metabolites mainly distributed in 10 KEGG metabolic pathways, the first top 4 pathways were biosynthesis of other secondary metabolites, amino acid metabolism, metabolism of cofactors and vitamins and metabolism of other amino acids. This study revealed differential metabolites during the browning process of yellow peach, which could provide a theoretical reference for improving the quality of yellow peach fruit.

Keywords yellow peach; browning; packaging; untargeted metabolomics; differential metabolites; pathway analysis