

3 种石榴果皮褐变与活性氧及膜脂代谢关系分析

刘倩婷, 郭晓宏, 杜佳铭, 王彩莲, 侯德华, 寇莉萍*

(西北农林科技大学食品科学与工程学院 陕西杨凌 712100)

摘要 石榴冷藏过程中果皮易发生褐变,使贮藏品质下降。不同品种的石榴耐贮性不同。本文以“突尼斯软籽”“净皮甜”和“骊山红”3 种石榴作为原材料,探究其在(4±0.5)℃,相对湿度 85%~90%贮藏条件下的果皮活性氧代谢、膜脂代谢相关指标变化及差异,并分析上述指标与褐变之间的关系。结果表明:随着贮藏时间的变化,褐变指数升高,“突尼斯软籽”石榴果皮维持较低的褐变指数,贮藏第 90 天仅达到 1.25,而“净皮甜”果皮褐变指数高达 3.85;果皮的 O₂⁻和·OH 清除率下降,其中“净皮甜”和“骊山红”果皮的·OH 清除率在贮藏第 90 天为 0.97%和 4.12%;活性氧水平提高,“突尼斯软籽”石榴果皮 O₂⁻生成速率在贮藏结束时为 25.31 μmol/min·g;超氧化物歧化酶(SOD)活性降低,过氧化物酶(CAT)活性变化不明显;内源性抗氧化物质还原型谷胱甘肽(GSH)、类胡萝卜素、叶绿素等含量显著减少,贮藏第 60 天后,突尼斯软籽石榴 GSH 含量维持在 252.9~273.7 μmol/g,高于其余 2 个品种,“骊山红”石榴果皮 ASA 含量在 108.0~121.8 μg/g 之间,处于最高水平。3 种石榴果皮的细胞膜透率增加,丙二醛(MDA)不断累积,可溶性蛋白含量变化不明显。相关性分析结果显示石榴果皮褐变与活性氧代谢中 O₂⁻和·OH 的清除率、过氧化氢含量、SOD 活性、还原型谷胱甘肽和叶绿素含量呈负相关关系,与 O₂⁻生成速率呈正相关关系;与膜脂代谢中细胞膜透率和丙二醛含量呈正相关关系。主成分分析结果证实石榴果皮褐变与活性氧代谢及膜脂代谢密切相关,且“突尼斯软籽”石榴的贮藏品质与“净皮甜”和“骊山红”存在明显区别。

关键词 石榴; 果皮褐变; 活性氧及膜脂代谢; 相关性分析; 主成分分析

文章编号 1009-7848(2024)05-0333-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.05.028

石榴(*Punica granatum* L.)是典型非呼吸跃变型果实,石榴科石榴属植物,广泛分布于热带与亚热带地区,在我国南北均有种植,种植地区海拔最低至 50 m,最高至 1 800 m^[1]。经过不断地育种与变种栽培,我国的石榴种质资源已达 200 余种,逐渐形成陕西临潼、云南蒙自、四川会理等八大石榴栽种主产区^[1]。其中,陕西临潼作为主栽种区之一,已育有净皮甜、三百甜、鲁峪蛋、天红蛋、御石榴等优良品种;此外,临潼石榴已列为国家地理标志保护产品^[2]。除传统品种的育种和变种外,陕西潼关还种植有国外引入品种——“突尼斯软籽”石榴,此品种皮薄籽红,汁多籽软,在陕西也具有一定的种植规模^[3]。鲜食石榴的广泛种植使得石榴果实的贮藏成为重点关注问题,而在贮藏过程中不同品种石榴表现出的贮藏特性有所不同。

在冷藏过程中,因石榴容易遭遇低温胁迫而使果面发生褐变,进而软烂腐败,故冷害所致褐变是石榴贮藏过程中面临的重大威胁^[4]。石榴果皮的褐变已被证明与酶促褐变有关,多酚氧化酶与过氧化物酶作用于酚类物质,最终形成深褐色物质,是导致果面发生褐变主要原因之一^[5]。除此之外,果蔬贮藏过程遭遇逆境胁迫时,组织内自由基代谢失衡,累积过量后能引发并加剧细胞脂质过氧化反应,致细胞膜脂代谢受损^[4,6]。超氧阴离子自由基(O₂⁻)衍生生成过氧化氢(H₂O₂),羟自由基(·OH)引发的不饱和脂肪酸脂质过氧化反应都会加速果实的衰老,导致石榴果实褐变腐败^[6-7]。因此,自由基及其衍生物含量,活性氧清除酶活性(超氧化物歧化酶和过氧化氢酶)以及抗坏血酸、谷胱甘肽等自身抗氧化剂含量指标是探究石榴果实活性氧代谢与果皮褐变衰老关系的重要依据。本文以陕西当地 3 个品种石榴(“突尼斯软籽”“净皮甜”“骊山红”)为试验材料,通过测定果皮活性氧及膜脂代谢相关物质含量及酶活性,探究不同品种石榴冷藏过程中果皮褐变与活性氧及膜脂代谢之间可能存在的关系,并比较品种间差异,旨在

收稿日期: 2023-05-30

基金项目: 陕西省石榴产业技术体系岗位专家项目(K3330218021);陕西省重点研发计划项目(2019NY-116)

第一作者: 刘倩婷,女,硕士生

通信作者: 寇莉萍 E-mail: kouliping@nwsuaf.edu.cn

阐明冷藏石榴果皮的褐变衰老机理,为不同品种石榴贮藏差异研究提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 原材料与试剂

1.1.1 主要材料 3种石榴中“净皮甜”“骊山红”石榴采自陕西省西安市临潼区,“突尼斯软籽”石榴采自陕西省渭南市潼关县。采收时挑选果实表面完好有光泽,无明显机械损伤,无裂纹、病斑,且无病菌、病虫侵害的果实,选择“净皮甜”石榴质量在380~430 g范围,“骊山红”石榴在420~480 g范围,“突尼斯软籽”石榴在330~380 g范围的果实作为试验材料,于2021年10月包装并运至西北农林科技大学食品科学与工程学院果蔬贮藏与加工实验室备用。

1.1.2 主要试剂 二硫苏糖醇(DTT)、红菲罗啉、盐酸羟胺、2-硝基苯甲酸、硫代巴比妥酸溶液,上海源叶生物科技有限公司;三氯乙酸(TCA)、乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)、水杨酸、聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)、L-蛋氨酸、核黄素、邻苯三酚、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾,国药集团化学试剂有限公司,以上试剂均为分析纯级。

1.2 仪器与设备

UV-1990紫外分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司;Spark酶标仪,Tecan Austria GmbH公司;DDS-307A电导率仪,上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 原料处理 采摘好的石榴原材料用0.015 mm的聚乙烯薄膜袋和发泡网包装后,贮藏于(4±0.5)℃,85%~90%相对湿度冷库中。每隔15 d进行取样测定,每次测定使用5枚果实,进行3次重复试验。试验过程中剥离石榴皮,并保存于密封袋中,置于-80℃冰箱以备后续测定。

1.3.2 褐变指数的测定 褐变指数测定参考寇莉萍等^[8]的方法,并稍作改动。每次随机测定15个果实,分为3组,按果皮外表面褐变程度分为6级:0级(无褐变,褐变面积为0)、1级(轻微褐变,0<褐变面积≤5%)、2级(轻度褐变,5%<褐变面积≤10%)、3级(中度褐变,10%<褐变面积≤30%)、4

级(重度褐变,30%<褐变面积≤60%)、5级(极度褐变,褐变面积>60%)。

1.3.3 自由基清除能力

1.3.3.1 超氧阴离子自由基(O₂⁻)清除率的测定 参考马兰芳等^[9]的方法测定O₂⁻的清除率。称取1 g石榴皮样品,用80%乙醇研磨提取过夜,4℃、8 000×g离心10 min,上清液冷冻备用。反应体系为:0.5 mL提取液和2 mL Tris-HCl缓冲液(pH=8.2),25℃,水浴15 min后,加入100 μL邻苯三酚(2 mmol/L),再次25℃水浴5 min,最后加入100 μL HCl(8 mmol/L)终止反应。在波长320 nm处测定OD值(A₁),以蒸馏水替代邻苯三酚测定OD值(A₂);以蒸馏水代替样品提取液测定OD值(A₀),VC作阳性对照,清除率按式(1)计算。

$$\text{超氧阴离子自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad (1)$$

1.3.3.2 羟自由基(·OH)清除率的测定 参考马兰芳等^[9]的方法测定·OH清除率,提取液与O₂⁻清除率相同。反应体系为:0.6 mL FeSO₄溶液,0.6 mL H₂O₂溶液,0.6 mL水杨酸溶液和2 mL提取液,37℃,水浴30 min后,测定吸光度值。上述试剂均为7.5 mmol/L。在波长510 nm处测定OD值(A_i),以蒸馏水替代H₂O₂测定OD值(A_j),以蒸馏水替代样品提取液测定OD值(A_c),VC作阳性对照,按式(2)计算。

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_c}\right) \times 100 \quad (2)$$

1.3.4 活性氧代谢的测定

1.3.4.1 活性氧水平测定 活性氧水平测定包括O₂⁻产生速率与过氧化氢(H₂O₂)含量测定。测定方法分别参考林艺芬^[10]与Lotfi等^[11]的方法,且略有改动。

1) O₂⁻产生速率测定 称取0.5 g石榴皮,5 mL提取液(0.05 mol/L pH=7.8磷酸盐缓冲液,内含1 mmol/L EDTA,0.3% Triton X-100和2% PVPP)研磨提取4℃、8 000×g离心,上清液冷藏备用,反应体系:1 mL提取液,1 mL PBS(0.05 mol/L)和1 mL盐酸羟胺溶液在25℃,保温1 h后,加入1 mL对羟基苯磺酸溶液(17 mmol/L)和1 mL α-萘胺溶液(7 mmol/L),再次于25℃保温20 min,于波长530 nm处测定OD值。

2) H_2O_2 含量测定 称取 0.5 g 石榴皮, 5 mL 预冷丙酮研磨成匀浆, 4 °C、8 000×g 离心, 上清液冷藏备用。反应体系: 1 mL 提取液, 100 μL 10% 四氯化钛-盐酸溶液和 100 μL 浓氨水混匀反应 5 min 后, 8 000×g 离心后取沉淀, 用冷丙酮反复洗去色素再加入 3 mL 2 mol/L 硫酸于波长 412 nm 处测定 OD 值。

1.3.4.2 活性氧清除酶活性 活性氧清除酶包括超氧化物歧化酶(SOD)与过氧化氢酶(CAT), 参考 Lotfi 等^[11]的方法进行测定。

1) SOD 活性测定 称取 0.5 g 石榴皮, 5 mL 提取液(0.1 mol/L pH=7.5 磷酸盐缓冲液, 内含 5% PVPP 和 5 mmol/L DTT)冰浴研磨提取, 4 °C、8 000×g 离心 10 min, 上清液冷藏备用, 试验前适度稀释。反应体系为: 1.7 mL PBS(0.05 mol/L), 0.3 mL 蛋氨酸溶液(130 mmol/L), 0.3 mL 氮蓝四唑溶液(750 μmol/L), 0.3 mL EDTA- Na_2 溶液(10 μmol/L), 0.3 mL 核黄素溶液(2 μmol/L)和 100 μL 酶液, 按上述顺序添加后立即于波长 560 nm 处测定吸光度值。

2) CAT 活性测定 提取液成分同与测定 SOD 活性测定方法。反应体系为: 20 μL 酶稀释液和 2 980 μL H_2O_2 (20 mmol/L, 0.05 mol/L pH=7.5 磷酸盐缓冲液配制)。在波长 240 nm 处测定 OD 值, 反应开始 15 s 后每隔 30 s 记录 1 次, 共 180 s, 进行 3 次重复, 以蒸馏水作空白对照。

1.3.4.3 内源抗氧化物质含量的测定 还原型谷胱甘肽(GSH)与还原型抗坏血酸(ASA)含量测定参考周鹤^[12]的方法, 并略作改动。叶绿素、类胡萝卜素含量测定参考 Guo 等^[13]的方法。

1) GSH 含量测定 称取 0.5 g 石榴皮, 5 mL 5%三氯乙酸提取液(内含 5 mmol/L EDTA- Na_2)研磨提取, 4 °C、8 000×g 离心 10 min, 上清液冷藏备用。反应体系: 1 mL 提取液, 1 mL 磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH=7.7) 和 0.5 mL 2-硝基苯甲酸(4 mmol/L)于 25 °C, 水浴 10 min 后取出测定。以 0.1 mol/L PBS 作对照, 在波长 412 nm 处测定 OD 值。

2) ASA 含量测定 提取液成分同 GSH 含量测定方法。反应体系为: 1 mL 提取液, 3 mL 5% TCA 溶液, 1 mL 无水乙醇, 1 mL 0.4% H_3PO_4 -乙

醇溶液, 1 mL 0.5%红菲罗啉-乙醇溶液和 0.5 mL 0.03% $FeCl_3$ -乙醇溶液于 30 °C水浴 60 min。以 5% TCA 溶液作对照, 于波长 534 nm 处测定 OD 值。

3) 叶绿素及类胡萝卜素含量测定 称取 0.5 g 石榴皮, 5 mL 预冷丙酮研磨, 4 °C浸提 3 h 后, 8 000×g 离心 10 min, 上清液冷藏备用。反应体系: 1 mL 色素提取液和 1 mL 80%丙酮。分别在波长 470, 645, 665 nm 处测定 OD 值, 参考 Guo 等^[13]的计算方法计算叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素及类胡萝卜素含量。

1.3.5 膜脂代谢的测定

1.3.5.1 细胞膜透率、丙二醛(MDA)含量的测定

1) 膜脂代谢相关指标 细胞膜透率和 MDA 含量测定参考 Chen 等^[14]的方法。

2) 细胞膜透率测定 使用打孔器在果皮表面打孔直径 1 cm 圆片, 刀片修整为 1~2 mm 厚度。烧杯装蒸馏水测定电导率记为 γ_0 , 放入 10 个圆片静置 30 min 后测定活组织电导率记为 γ_1 , 然后煮沸 15 min, 冷却至室温, 加水至 50 mL 后再次测定组织电导率记为 γ_2 。细胞膜透率按式(3)计算。

$$\text{细胞膜透率}(\%) = \frac{\gamma_1 - \gamma_0}{\gamma_2 - \gamma_0} \times 100 \quad (3)$$

3) MDA 含量 称取 0.5 g 石榴皮, 5 mL 10% TCA 研磨提取, 8 000×g 离心 10 min, 上清液冷藏备用。反应体系: 2 mL 提取液和 2 mL 0.67%硫代巴比妥酸溶液(0.05 mol/L NaOH 溶解)于沸水浴煮沸 20 min 后冷却离心, 上清液于波长 450, 532, 600 nm 处测定 OD 值。

1.3.5.2 可溶性蛋白含量的测定 可溶性蛋白含量参考林艺芬^[10]的方法, 利用考马斯亮蓝 G-250 染色法比色测定。

1.4 数据分析

本文所有试验指标均重复测定 3 次, 试验结果使用 Excel 2016 进行数据统计与计算, 使用 Origin 2022 进行图形绘制。数据分析使用 Minitab 18.0, 利用 One-way Anova 分析数据显著性, 图中不同小写字母表示同一品种石榴在不同贮藏时间的差异具有显著性, 不同大写字母表示同一贮藏时间不同品种之间的差异具有显著性, $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 冷藏过程中不同品种石榴果皮褐变指数变化

图1展示了石榴在冷藏过程中果皮褐变指数变化。由图中可知,3种石榴果皮褐变指数均随贮藏时间的延长而升高($P < 0.05$),其中“净皮甜”果

皮褐变指数始终显著高于“突尼斯软籽”与“骊山红”($P < 0.05$)。第0,15天时,“突尼斯软籽”与“骊山红”石榴果皮褐变指数无明显差异。自第30天起到贮藏结束,“骊山红”果皮褐变指数显著高于“突尼斯软籽”($P < 0.05$)。

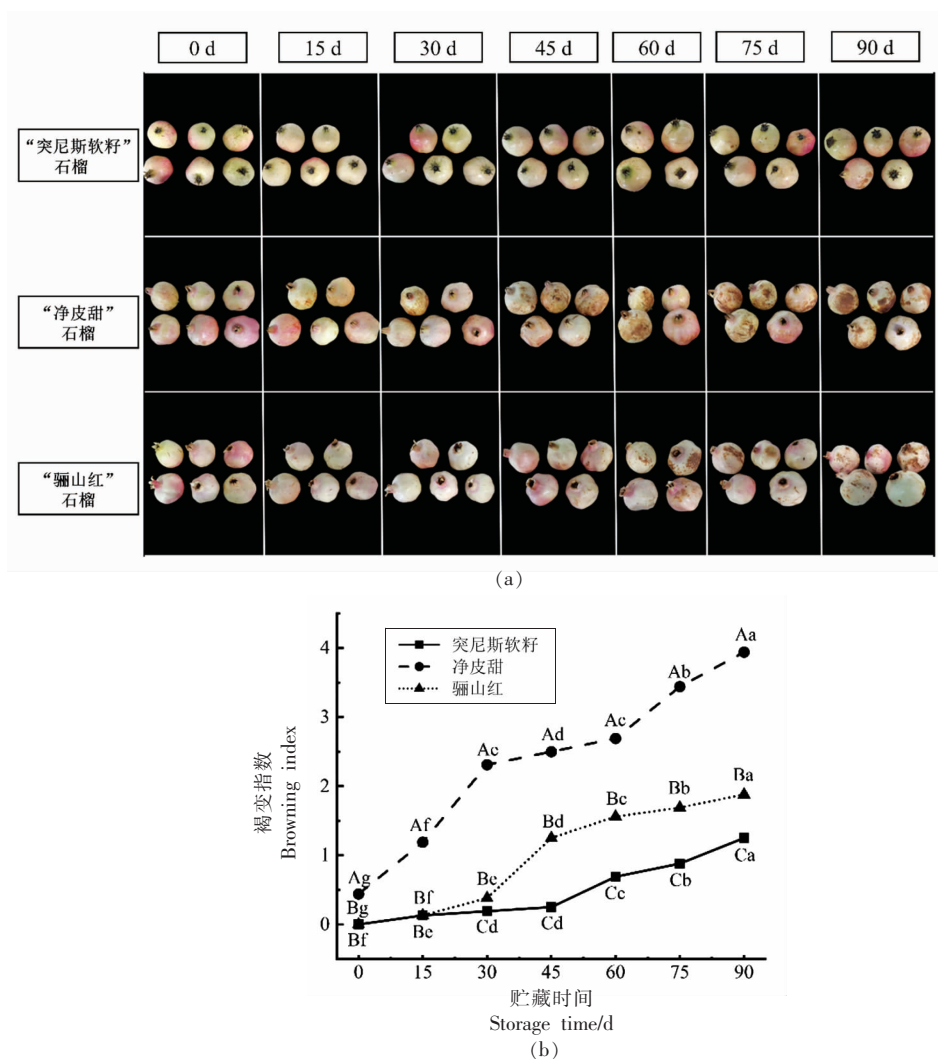


图1 不同品种石榴冷藏过程中褐变记录图(a)与褐变指数(b)变化趋势

Fig.1 Changes of browning records (a) and browning index (b) of pomegranate husk in different cultivars during cold storage

2.2 冷藏过程中不同石榴果皮自由基清除率能力变化

由图2可知,“突尼斯软籽”与“净皮甜”石榴果皮 O_2^- 清除能力随冷藏时间的延长明显减弱($P < 0.05$),而“骊山红”石榴果皮清除能力无显著变化。其中“净皮甜”石榴果皮 O_2^- 清除能力最弱

($P < 0.05$)。·OH清除率展示出了更为明显的差异,“突尼斯软籽”石榴与“骊山红”石榴果皮·OH清除率随时间延长而显著降低($P < 0.05$),“净皮甜”石榴果皮自由基清除能力并无明显变化,其中“突尼斯软籽”石榴果皮·OH清除能力显著高于“净皮甜”与“骊山红”($P < 0.05$)。综上所述,“突尼斯软

籽”石榴果皮虽然表现出较强的自由基清除能力,但在贮藏过程中明显降低;“骊山红”和“净皮甜”

石榴果皮自由基清除能力虽弱于“突尼斯软籽”石榴,但在贮藏过程中降幅更小。

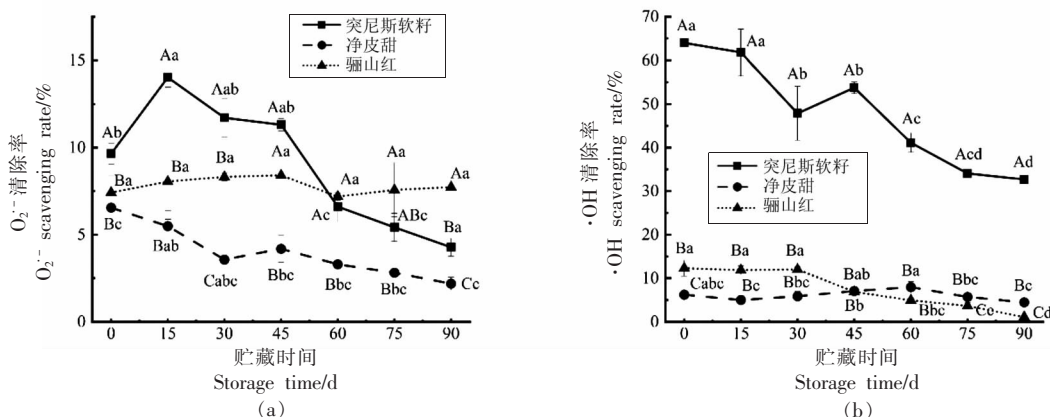


图 2 不同品种石榴果皮冷藏过程中 $O_2^{\cdot-}$ 与 $\cdot OH$ 清除率变化趋势

Fig.2 Changes of $O_2^{\cdot-}$ and $\cdot OH$ scavenging rate of pomegranate husk in different cultivars during cold storage

2.3 冷藏过程中不同品种石榴果皮活性氧代谢的变化

2.3.1 冷藏过程中不同品种石榴果皮 $O_2^{\cdot-}$ 生成速率和 H_2O_2 含量的变化 由图 3 可知,在 0~45 d,“净皮甜”石榴果皮 $O_2^{\cdot-}$ 生成速率显著低于“突尼斯软籽”与“骊山红” ($P < 0.05$),而在 60~90 d,“突尼斯软籽”石榴果皮的 $O_2^{\cdot-}$ 生成速率呈现显著下降趋

势 ($P < 0.05$)。3 种石榴果皮 H_2O_2 含量差异显著,其中“突尼斯软籽”石榴果皮 H_2O_2 含量始终显著高于“净皮甜”与“骊山红” ($P < 0.05$)。综上所述,“突尼斯软籽”石榴果皮虽保持了较低的 $O_2^{\cdot-}$ 生成速率但始终积累较高水平 H_2O_2 ,而其余 2 个品种活性氧 (ROS) 水平变化相似,都保持了较平稳的 H_2O_2 含量和整体呈升高态势的 $O_2^{\cdot-}$ 生成速率。

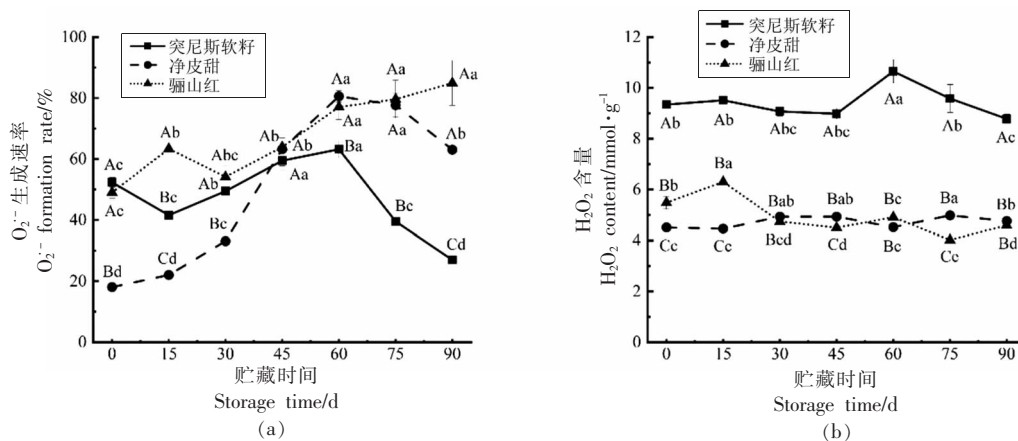


图 3 不同品种石榴冷藏过程中 $O_2^{\cdot-}$ 生成速率与 H_2O_2 含量的变化趋势

Fig.3 Changes of $O_2^{\cdot-}$ production rate and H_2O_2 content of pomegranate husk in different cultivars during cold storage

2.3.2 冷藏过程中不同品种石榴果皮超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性变化 图 4 展示了与活性氧代谢相关酶的活性变化。3 个品种石榴果皮 CAT 活性 (图 4a) 变化趋势各有不同,“净皮甜”石榴果皮 CAT 活性呈现先升后降趋势,“骊山红”石榴果皮 CAT 活性在贮藏 45~90 d 显著下降 ($P <$

0.05),“突尼斯软籽”CAT 活性在后期 (45~90 d) 显著上升 ($P < 0.05$)。其中,在贮藏 60 d 后,“净皮甜”石榴果皮 CAT 活性显著低于“突尼斯软籽”与“骊山红” ($P < 0.05$)。SOD 活性在贮藏 30 d 后,3 个品种展现出明显差异,“突尼斯软籽”石榴果皮 SOD 始终保持较高活性,而“净皮甜”与“骊山红”石榴

果皮 SOD 活性有显著下降趋势 ($P<0.05$), 且显著低于“突尼斯软籽” ($P<0.05$)。综上所述, “突尼斯软籽”石榴果皮活性氧代谢相关酶保持了较高活

性, 而“净皮甜”石榴果皮相关酶活性在冷藏过程中活性较低, “骊山红”石榴果皮酶活性虽次于“突尼斯软籽”但高于“净皮甜”, 处于中等水平。

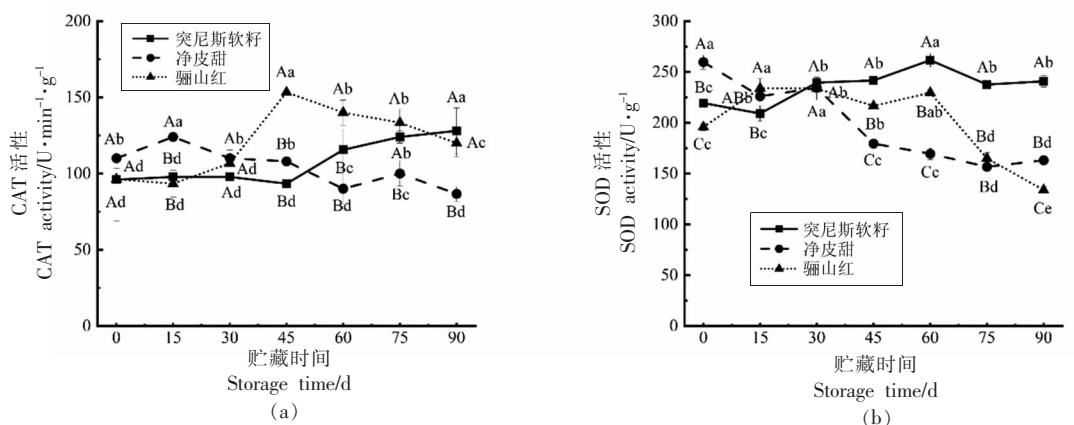


图4 不同品种石榴果皮冷藏过程中 SOD 与 CAT 活性变化趋势

Fig.4 Changes of SOD and CAT activity of pomegranate husk in different cultivars during cold storage

2.3.3 冷藏过程中不同品种石榴果皮还原型谷胱甘肽和抗坏血酸含量变化 由图 5 可知, “突尼斯软籽”与“净皮甜”石榴果皮 GSH 含量随冷藏时间延长呈现显著下降趋势 ($P<0.05$), “骊山红”石榴果皮 GSH 含量呈现先升后降的趋势, 其中“净皮甜”GSH 含量除第 90 天外始终保持最低。贮藏第 60 天后, “突尼斯软籽”石榴果皮 GSH 含量维持在 252.9~273.7 $\mu\text{mol/g}$ 范围, 高于其余 2 个品种。在

贮藏 0~45 d, “突尼斯软籽”石榴果皮 ASA 含量显著高于其余 2 个品种 ($P<0.05$), 在 88.7~130.2 $\mu\text{g/g}$ 范围。然而, 在贮藏 60 d 后, “净皮甜”与“骊山红”石榴果皮 ASA 含量有所上升, “骊山红”石榴果皮 ASA 含量在 108.0~121.8 $\mu\text{g/g}$ 范围, 处于最高水平。综上所述, 较“净皮甜”石榴果皮而言, “突尼斯软籽”和“骊山红”石榴果皮的 GSH 和 ASA 含量在冷藏过程中维持较高水平。

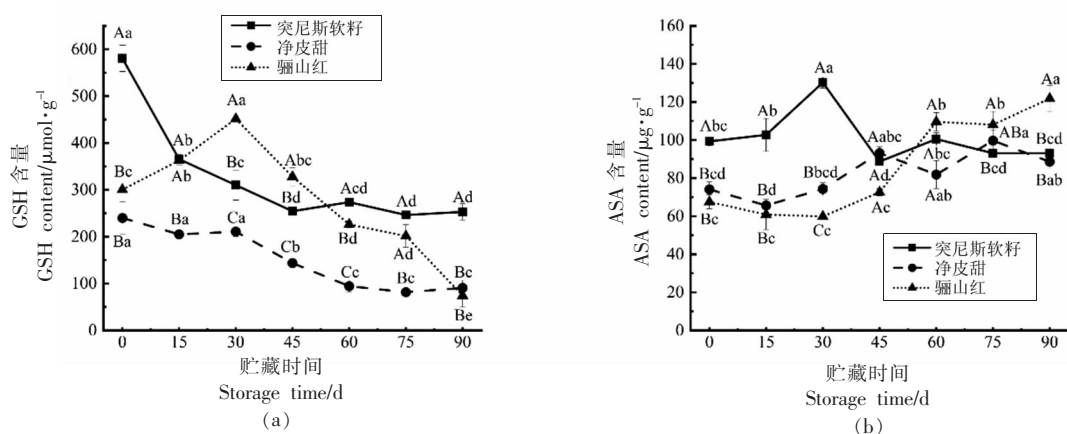


图5 不同品种石榴果皮冷藏过程中 GSH 与 ASA 含量变化趋势

Fig.5 Changes of GSH and ASA content of pomegranate husk in different cultivars during cold storage

2.3.4 冷藏过程中不同品种石榴果皮叶绿素和类胡萝卜素含量变化 图 6 分别反映了不同品种石榴果皮叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素总含量与类

胡萝卜素含量在冷藏过程中的变化。3 个品种石榴果皮叶绿素 a、b 和总叶绿素含量总体变化趋势相似, 呈现显著下降趋势 ($P<0.05$)。其中, “突尼斯软

籽”石榴果皮的叶绿素含量始终显著高于“净皮甜”与“骊山红”($P<0.05$)。3 个品种石榴果皮类胡萝卜素含量呈现显著差异,“突尼斯软籽”石榴果皮类胡萝卜素含量显著高于“净皮甜”石榴果皮($P<0.05$),“净皮甜”石榴果皮类胡萝卜素含量显著高于“骊山红”石榴果皮($P<0.05$)。其中,“突尼斯软籽”石榴果皮类胡萝卜素含量随贮藏时间变

化呈现显著的先升后降趋势($P<0.05$),其余 2 个品种类胡萝卜素含量轻微波动,变化不大。综上所述,“突尼斯软籽”石榴果皮叶绿素和类胡萝卜素含量较其余 2 个品种有明显优势,而随贮藏时间延长物质丢失较明显。其余两个品种的果皮叶绿素和类胡萝卜素虽然含量不如“突尼斯软籽”石榴果皮,但能在贮藏过程中保持含量稳定。

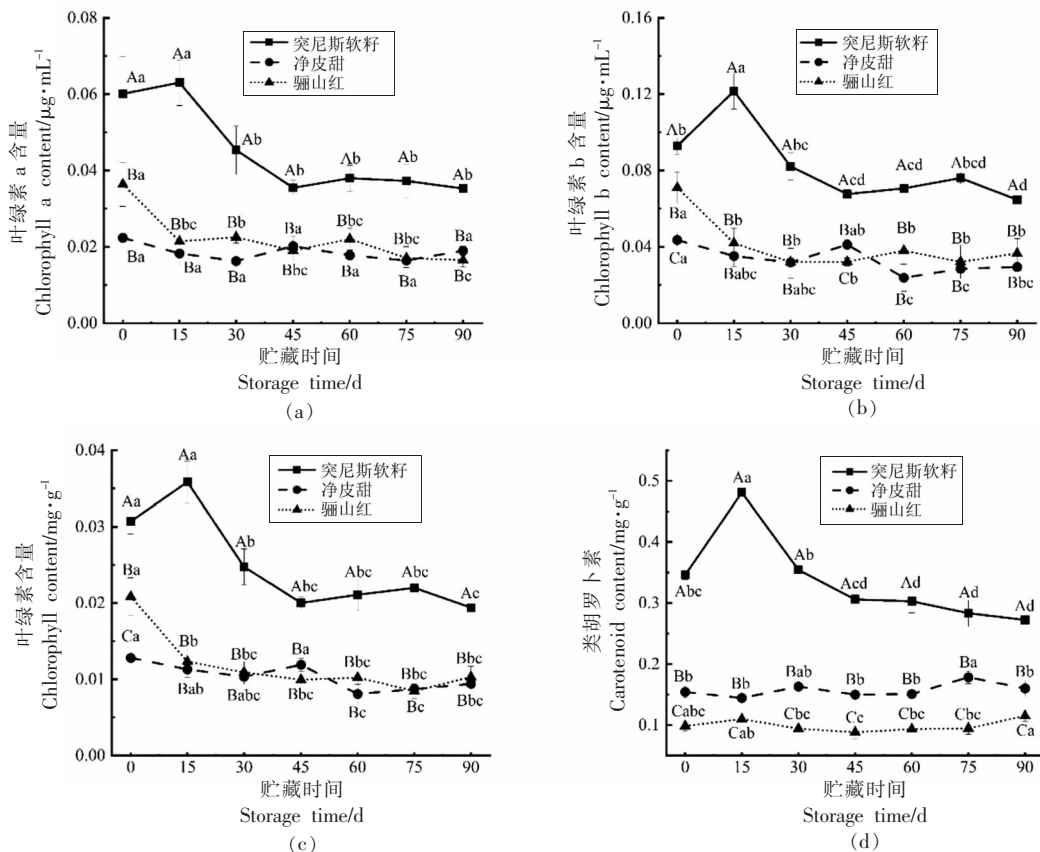


图 6 不同品种石榴果皮冷藏过程中叶绿素与类胡萝卜素含量变化趋势

Fig.6 Changes of chlorophyll and carotenoid content of pomegranate husk in different cultivars during cold storage

2.4 冷藏过程中不同品种石榴果皮膜脂代谢变化

图 7 分别反映不同品种石榴果皮细胞膜透率、MDA 含量及可溶性蛋白含量在冷藏过程中的变化。3 个品种石榴果皮细胞膜透率随冷藏时间的延长均呈显著增长趋势 ($P<0.05$),“突尼斯软籽”石榴果皮细胞膜透率在 0~60 d 冷藏时间范围内显著低于其余 2 个品种 ($P<0.05$),“净皮甜”与“骊山红”石榴果皮细胞膜透率值相近。3 个品种石榴果皮的 MDA 含量变化与细胞膜透率变化趋势相似,均呈现显著增强趋势,且“突尼斯软籽”石

榴果皮 MDA 含量始终处于较低水平,在贮藏结束时 MDA 累积量为 $0.0446 \mu\text{mol/g}$ 。其余 2 个品种石榴果皮 MDA 累积量基本高于“突尼斯软籽”石榴果皮,“净皮甜”石榴果皮在贮藏结束时 MDA 累积量为 $0.0565 \mu\text{mol/g}$,“骊山红”石榴果皮为 $0.0516 \mu\text{mol/g}$ 。“突尼斯软籽”与“净皮甜”石榴果皮可溶性蛋白含量在贮藏中后期(60~90 d)略有上升,而“骊山红”果皮可溶性蛋白含量中后期却略有下降。3 个品种石榴果皮可溶性蛋白含量并无显著差异 ($P>0.05$)。综上所述,“突尼斯软籽”石榴果皮

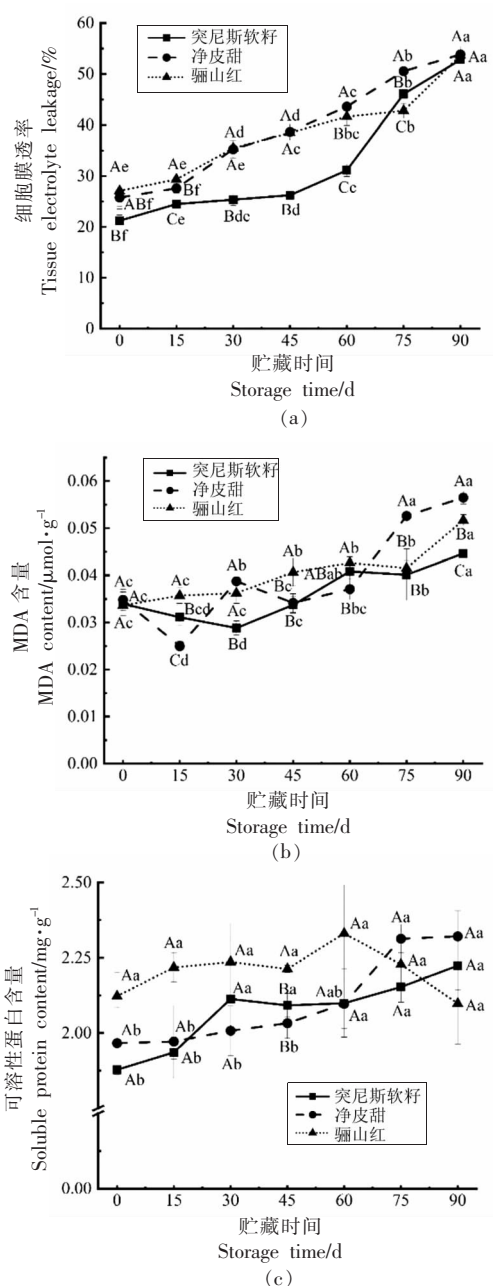


图7 不同品种石榴果皮冷藏过程中细胞膜透率、MDA与可溶性蛋白含量变化趋势

Fig.7 Changes of tissue electrolyte leakage, MDA and soluble protein content of pomegranate husk in different cultivars during cold storage

在贮藏过程中膜脂损伤程度较“净皮甜”与“骊山红”更小,表现出较强的膜脂代谢能。此外,“净皮甜”与“骊山红”石榴果皮在膜脂代谢能力上表现相似。

2.5 不同品种石榴果皮褐变与活性氧及膜脂代谢相关性分析

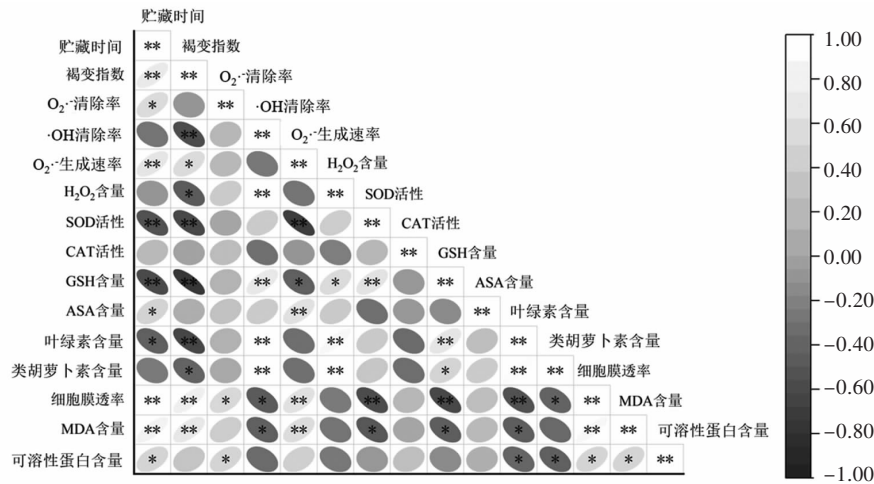
图8展示了果皮褐变指数与活性氧代谢及膜脂代谢指标之间存在的相关性。值得关注的是,果皮褐变指数与 O_2^- 清除率、 $\cdot\text{OH}$ 清除率、SOD活性、GSH含量、叶绿素含量呈极显著负相关关系($P < 0.01$),与 H_2O_2 含量呈显著负相关关系($P < 0.05$),与细胞膜透率、MDA含量呈极显著正相关关系($P < 0.01$),与 O_2^- 生成速率呈显著正相关关系($P < 0.05$),说明石榴果皮的褐变与贮藏过程中果皮的活性氧代谢与膜脂代谢密切相关。

2.6 不同品种石榴果皮活性氧及膜脂代谢相关指标主成分分析

表1是不同品种石榴果皮活性氧及膜脂代谢相关指标经主成分分析后得到的相关矩阵特征值与贡献率。主成分分析得到特征值大于1的主成分因子共3个,其中主成分1特征值为7.173,贡献率为51.236%,主成分2特征值为2.371,贡献率为16.933%,主成分3特征值为1.318,贡献率为9.413%。3个主成分累积贡献率达77.582%,而前两个主成分贡献率累积达68.169%,可反应各指标间的基本信息。

图9是各指标通过主成分分析所得的得分图与载荷图,可进一步分析指标间的相关性。图9a为载荷图,分析可得这些指标对果皮褐变与品质的贡献。PC1主要由ASA含量、GSH含量、叶绿素、类胡萝卜素、 $\cdot\text{OH}$ 清除率、 O_2^- 清除率、 H_2O_2 含量与SOD活性决定,与褐变指数呈现显著负相关关系,其中叶绿素、类胡萝卜素、 $\cdot\text{OH}$ 清除率、 H_2O_2 含量之间存在显著正相关关系。PC2主要由褐变指数、细胞膜透率、MDA含量、 O_2^- 生成率等指标决定,其中褐变指数与膜脂代谢相关指标呈显著正相关关系,与CAT活性、 O_2^- 生成速率等活性氧代谢相关指标呈正相关关系,与SOD活性、GSH含量等内源性物质呈负相关关系。

图9b为得分图,3个品种石榴贮藏品质可通过果皮的活性氧与膜脂代谢等指标进行区分。通过PC1可以看到“突尼斯软籽”石榴的果实品质和“净皮甜”与“骊山红”有明显区分,“净皮甜”与“骊山红”石榴贮藏品质则较为相似。



注: * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$ 。

图 8 石榴果皮褐变与活性氧及膜脂代谢相关性分析

Fig.8 Correlation analysis of pomegranate husk browning with reactive oxygen species and membrane lipid metabolism

表 1 解释的总方差

Table 1 The total variance of explained

主成分	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%
1	7.173	51.236	51.236
2	2.371	16.933	68.169
3	1.318	9.413	77.582

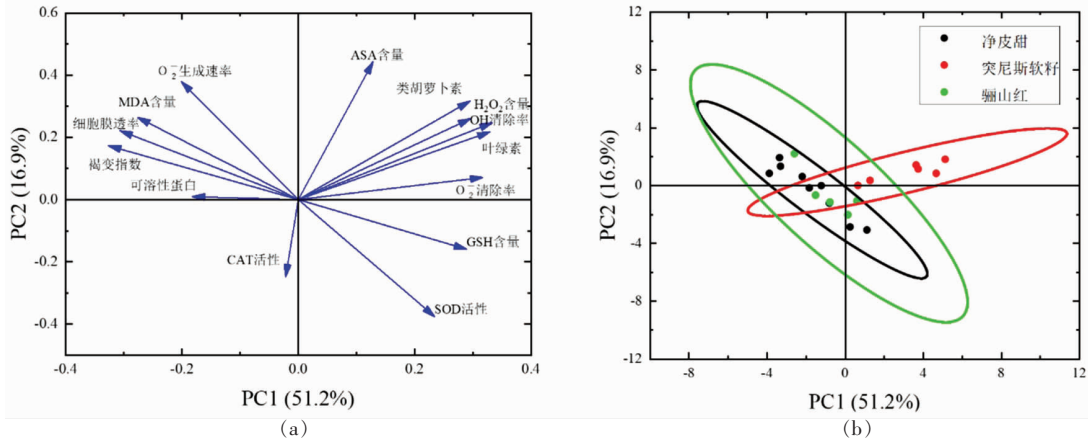


图 9 石榴果皮活性氧及膜脂代谢相关指标主成分分析

Fig.9 Principal component analysis of reactive oxygen species and membrane lipid metabolism in pomegranate husk

3 讨论

石榴作为陕西最主要的经济作物之一，在陕西达到一定种植规模且种类繁多。近年来，随着消费者需求的上升，石榴果实的市场需求量不断上升。然而，石榴作为季节性水果，其供应时间受到限制，因此石榴贮藏保鲜始终是解决石榴季节性短缺的主要手段。现存研究表明，物理手段如：高

压静电场结合自发气调处理^[15]，化学手段如茉莉酸甲酯^[8]、1-MCP(1-甲基-环丙烯)^[16]处理等均能有效延长石榴贮藏时间。然而，石榴果实相对较大，各种方法处理均较为繁琐。冷藏作为最基础且有效的方法，在石榴果实的贮藏保鲜占据重要地位。本试验在石榴冷藏研究过程中发现石榴贮藏品质与果皮褐变密切相关，且果皮的褐变与活性

氧代谢之间存在显著相关性。

石榴果皮本身含有丰富的多酚类物质,使其具有较高的抗氧化能力^[17]。此外,张丽君等^[18]的研究表明石榴果皮具有较强的 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除能力,其抗氧化活性高于VC。自由基是影响果实采收后贮藏的关键因子, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 衍生成 H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$ 可引发不饱和脂肪酸脂质过氧化,加速果实衰老褐变^[6-7]。本研究发现3个品种石榴果皮在冷藏过程中褐变程度均加重,果皮的 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除能力下降,同时 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 生成速率上升, H_2O_2 含量累积。ROS水平与果蔬采收后衰老褐变密切相关, H_2O_2 含量与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 生成速率是衡量ROS水平的关键因素^[18]。研究表明当细胞内活性氧的产生和清除失衡,细胞活性氧水平提高,过多的自由基累积会进一步导致细胞膜脂氧化过度,从而使组织膜渗透率提高,影响果实的正常生理功能^[7,19]。

MDA是膜脂过氧化的重要产物之一,细胞膜透性能反映果皮抗逆性强弱,可用于判断果实的衰老程度^[18]。本试验结果表明石榴果皮的细胞膜渗透率增大,MDA含量增多,破坏了细胞的膜脂代谢,进一步加速了果皮的衰老褐变,并且果皮活性氧代谢与膜脂代谢存在相关性。细胞膜透率增大与MDA积累是采后果实活性氧代谢失衡导致果实机体ROS物质累积,酶活性下降而引起细胞膜结构受损的具体表现^[19],在采后甜瓜^[20]、软枣猕猴桃^[21]、水蜜桃^[22]、荔枝^[23]等的贮藏中均有体现。

石榴果实在冷藏过程中可通过自身的酶促反应联合内源性抗氧化物质作用,来改善活性氧水平变化引起的果实褐变衰老。CAT与SOD是重要的ROS清除酶,CAT作用于 H_2O_2 使其分解产生水和氧气,SOD能清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$,与CAT协同抵御活性氧对果实机体伤害^[24]。本文研究结果显示褐变更严重的“净皮甜”和“骊山红”石榴的果皮CAT与SOD活性均在贮藏后期明显下降。因此,保持高的ROS酶活性有利于石榴果实的贮藏^[25]。内源性抗氧化物质在抗氧化系统中具有重要作用,GSH能还原脱氢抗坏血酸生成ASA,ASA可氧化自身来达到清除 H_2O_2 的目的^[10,26]。本研究发现褐变程度更小的“突尼斯软籽”石榴的果皮含有相对更高含量的内源性抗氧化物质。Islam等^[25]的研究也证明,维持高的GSH与ASA含量有助于缓解石榴果实

的冷害,维持较好品质。类胡萝卜素与ASA、维生素C、维生素E等在活性氧代谢中作用相似,它们作用于ROS物质与自由基,有助于维持膜脂代谢平衡,从而保护细胞膜脂结构^[27]。

4 结论

研究结果表明,石榴果皮的体外抗氧化能力随贮藏时间有所减弱,而活性氧物质(H_2O_2 与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 生成速率)含量却有所增加,SOD与CAT活性在贮藏中后期降低,内源性抗氧化物质GSH、类胡萝卜素、叶绿素等明显减少,ASA含量变化不明显。与膜脂代谢相关的细胞膜透率、MDA含量随贮藏时间延长明显增加,可溶性蛋白含量无明显变化。3个品种中,“突尼斯软籽”石榴果皮褐变程度最低,其自由基清除能力、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 生成速率、SOD活性、叶绿素含量、类胡萝卜素含量、细胞膜透率与MDA含量均在活性氧代谢过程中表现得优于“骊山红”与“净皮甜”。“净皮甜”与“骊山红”石榴果皮活性氧代谢变化较相似,其品质特征也较为相近。

相关性分析结果表明,果皮的褐变与活性氧代谢具有显著相关性。膜脂代谢的相关指标与活性氧代谢指标间存在相关性,且褐变指数与细胞膜透率、MDA含量存在显著相关性。同时主成分分析结果表明,“突尼斯软籽”石榴与“净皮甜”“骊山红”果皮的活性氧代谢能力明显区分(图9a PC1),并进一步证实褐变指数与膜脂代谢相关指标呈显著正相关关系,与活性氧代谢中与CAT活性、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 生成速率呈正相关关系,与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除率、SOD活性、GSH含量等呈负相关关系。

参 考 文 献

- [1] 刘春,方锡佳,李锦锦.中国石榴种质资源研究进展[J].安徽农业科学,2022,50(12):34-36,40. LIU C, FANG X J, LI J J. Research progress of pomegranate germplasm resources in China[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2022, 50(12): 34-36, 40.
- [2] 吴帅,张岩,邹琴艳,等.石榴种质资源果实重要性状的统计分析[J].落叶果树,2020,52(5):15-18. WU S, ZHANG Y, ZOU Q Y, et al. Statistical

- analysis of important fruit traits of pomegranate germplasm resources[J]. *Deciduous Fruits*, 2020, 52(5): 15–18.
- [3] 陈延惠, 史江莉, 万然, 等. 中国软籽石榴产业发展现状与发展建议[J]. *落叶果树*, 2020, 52(3): 1–4, 79–80.
- CHEN Y H, SHI J L, WAN R, et al. Development status and suggestions of soft seed pomegranate industry in China[J]. *Deciduous Fruits*, 2020, 52(3): 1–4, 79–80.
- [4] 王旭琳, 张润光, 吴倩, 等. 石榴采后病害及贮藏保鲜技术研究进展[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(2): 389–393.
- WANG X L, ZHANG R G, WU Q, et al. Research advances on post-harvest diseases and storage technology of pomegranate fruit [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(2): 389–393.
- [5] 冯立娟, 尹燕雷, 杨雪梅, 等. 石榴果实发育期果皮褐变及相关酶活性变化[J]. *核农学报*, 2017, 31(4): 821–827.
- FENG L J, YIN Y L, YANG X M, et al. Changes of browning and its related enzyme activities in pomegranate peel during fruit development period[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2017, 31(4): 821–827.
- [6] 董建梅, 刘翠玉, 赵玉洁, 等. 盐胁迫对石榴生长与生理生化特性的影响[J]. *西南林业大学学报(自然科学)*, 2021, 41(1): 47–54.
- DONG J M, LIU C Y, ZHAO Y J, et al. Effects of salt stress on growth and physiological and biochemical characteristics of pomegranate[J]. *Journal of Southwest Forestry University (Natural Sciences)*, 2021, 41(1): 47–54.
- [7] ZHANG R G, GUO X C, ZHANG Y L, et al. Influence of modified atmosphere treatment on post-harvest reactive oxygen metabolism of pomegranate peels[J]. *Natural Product Research*, 2020, 34(5): 740–744.
- [8] 寇莉萍, 张萌, 郭晓成, 等. 茉莉酸甲酯处理对石榴贮藏品质及相关酶活性的影响[J]. *包装工程*, 2021, 42(9): 64–71.
- KOU L P, ZHANG M, GUO X C, et al. Effects of methyl jasmonate treatment on storage quality and enzymes activities of pomegranate[J]. *Packaging Engineering*, 2021, 42(9): 64–71.
- [9] 马兰芳, 李海峰, 马丽娜, 等. 响应面优化黄花菜总黄酮提取工艺及体外抗氧化分析[J]. *分子植物育种*, 2022, 8(1): 1–18.
- MA L F, LI H F, MA L N, et al. Optimization of process and antioxidant activity of total flavonoids from daylily lily by response surface methodology[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2022, 8(1): 1–18.
- [10] 林艺芬. 活性氧引起采后龙眼果实果皮褐变的生理生化机制研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2013.
- LIN Y F. Physiological and biochemical mechanism of browning development caused by active oxygen in pericarp of harvested longan fruits[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2013.
- [11] LOTFI M, HAMDAMI N, DALVI-ISFAHAN M, et al. Effects of high voltage electric field on storage life and antioxidant capacity of whole pomegranate fruit[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2022, 75: 102888.
- [12] 周鹤. 冷敏型橄榄果实成熟度与抗冷性的关系及其机理研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2015.
- ZHOU H. Dissertation for master degree of Fujian agriculture and forestry university[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2015.
- [13] GUO X H, LIU Q T, DU J M, et al. X-rays irradiation affects flavonoid synthesis and delays reddening of winter jujube (*Zizyphus jujuba* Mill. cv. *Dalidongzao*) during cold storage[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2022, 193: 112048.
- [14] CHEN L, PAN Y F, LI H D, et al. Methyl jasmonate alleviates chilling injury and keeps intact pericarp structure of pomegranate during low temperature storage[J]. *Food Science and Technology International*, 2020, 27(1): 22–31.
- [15] 樊爱萍, 曾丽萍, 孟金明, 等. 高压静电场结合自发气调对低温冷藏下蒙自石榴的保鲜效果研究[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(8): 56–61.
- FAN A P, ZENG L P, MENG J M, et al. Effect of high-voltage electrostatic combined with modified atmosphere conditions on preservation of Mengzi pomegranate under cold storage[J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(8): 56–61.
- [16] 闫欣鹏, 张润光, 梁琪琪, 等. 低温结1-MCP处理对突尼斯软籽石榴采后品质的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(5): 147–155.
- YAN X P, ZHANG R G, LIANG Q Q, et al. Effects of temperature combined with 1-MCP on postharvest quality of Tunisia soft-seed pomegranate

- [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(5): 147-155.
- [17] DERAKHSHAN Z, FERRANTE M, TADI M, et al. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds [J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 114: 108-111.
- [18] 张丽君, 李敏, 王静, 等. 石榴皮中黄酮类物质的提取及抗氧化研究[J]. 化学工程师, 2021, 35(9): 65-68.
ZHANG L J, LI M, WANG J, et al. Study on extraction and antioxidant activity of flavones from pomegranate[J]. Chemical Engineer, 2021, 35(9): 65-68.
- [19] LIN Y X, LIN H T, CHEN Y H, et al. Hydrogen peroxide-induced changes in activities of membrane lipids-degrading enzymes and contents of membrane lipids composition in relation to pulp breakdown of longan fruit during storage [J]. Food Chemistry, 2019, 297: 124955.
- [20] 徐斌, 安路明, 孟新涛, 等. 外源腐胺(Put)处理对黄皮甜瓜果实采后冷害及活性氧代谢的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 8(2): 1-15.
XU B, AN L M, MENG X T, et al. Effect of exogenous putrescine (Put) treatments on postharvest chilling injury and reactive oxygen metabolism of yellow melon fruits [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 8(2): 1-15.
- [21] 陈曦冉, 张鹏, 贾晓昱, 等. 1-MCP处理维持软枣猕猴桃活性氧的代谢平衡[J]. 现代食品科技, 2022, 38(4): 83-91.
CHEN X R, ZHANG P, JIA X Y, et al. Reactive oxygen metabolism balance in actinidia arguta by 1-MCP treatments[J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(4): 83-91.
- [22] 凌建刚, 段玉权, 安晟民, 等. 外源一氧化氮协同1-甲基环丙烯处理对水蜜桃常温贮藏品质及活性氧代谢的影响研究[J]. 核农学报, 2022, 36(2): 362-368.
LIN J G, DUAN Y Q, AN S M, et al. Effects of exogenous nitric oxide combined with 1-MCP treatment on the quality and reactive oxygen metabolism of juicy peaches during storage at room temperature [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2022, 36(2): 362-368.
- [23] 谢晶, 覃子倚, 潘家丽, 等. 基于主成分分析的硝普钠处理对采后荔枝活性氧代谢的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(9): 192-198.
XIE J, TAN Z Y, PAN J L, et al. Effect of sodium nitroprusside treatment on reactive oxygen species metabolism of postharvest Lichi as investigated by principal component [J]. Food Science, 2022, 43(9): 192-198.
- [24] SHI J L, GAO H F, WANG S, et al. Exogenous arginine treatment maintains the appearance and nutraceutical properties of hard - and soft -seed pomegranates in cold storage[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9(3): 103389.
- [25] ISLAM M, ALI S, NAWAZ A, et al. Postharvest 24-epibrassinolide treatment alleviates pomegranate fruit chilling injury by regulating proline metabolism and antioxidant activities[J]. Postharvest Biology and Technology, 2022, 188: 111906.
- [26] 王雪, 李乾, 刘彩红, 等. NO熏蒸调控冷藏枸杞鲜果活性氧代谢减轻褐变[J]. 现代食品科技, 2022, 8(2): 1-10.
WANG X, LI Q, LIU C H, et al. NO fumigation regulates active oxygen metabolism and mitigates browning in fresh *Lycium barbarum* fruit during cold storage [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 8(2): 1-10.
- [27] 徐松华. 逆境条件下植物体内活性氧代谢研究进展[J]. 安徽农学通报, 2021, 27(21): 29-32.
XU S H. Research advances of reactive oxygen species in plants under environmental stress[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2021, 27(21): 29-32.

Analysis of Browning and Reactive Oxygen Species and Membrane Lipid Metabolism in Husk of Three Pomegranate Cultivars

Liu Qianting, Guo Xiaohong, Du Jiaming, Wang Cailian, Hou Dehua, Kou Liping*
(College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi)

Abstract Pomegranate (*Punica granatum* L.) husk is prone to browning which would decrease the storage quality during

cold storage. Different pomegranate cultivars have different storability. In the present study, three pomegranate cultivars ('Tunisia soft seed', 'Jingpitian' and 'Lishanhong') were used as raw material to explore the relation between husk browning and active oxygen species and membrane lipid metabolism, and further to compare the differences among three cultivars. The results showed that the browning index increased during storage time. The browning index of 'Tunisia soft seed' husk was relatively lower, reaching 1.25 on the 90th day of storage, while the browning index of 'Jingpitian' husk was as high as 3.85. The scavenging rates of $O_2^{\cdot-}$ and $\cdot OH$ radicals of three pomegranate husks decreased. The scavenging rates of $\cdot OH$ radicals of 'Jingpitian' and 'Lishan red' husks were 0.97% and 4.12% on the 90th day of storage. The $O_2^{\cdot-}$ generation rate of 'Tunisia soft seed' pomegranate husk was $25.31 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$ at the end of storage. The activity of superoxide dismutase (SOD) decreased, and the activity of peroxidase (CAT) did not change significantly. The contents of endogenous antioxidant substances such as glutathione (GSH), carotenoids and chlorophyll were significantly reduced. After 60 days of storage, the GSH content of 'Tunisia soft seed' pomegranate was maintained at $252.9\text{--}273.7 \mu\text{mol}/\text{g}$, which was higher than that of the other two cultivars. The content of ASA in 'Lishanhong' pomegranate husk was between $108.0\text{--}121.8 \mu\text{g}/\text{g}$, which was at the highest level. Cell membrane permeability of three pomegranate husks increased, malondialdehyde (MDA) accumulated, and soluble protein content did not change significantly. The results of correlation analysis showed that the browning of pomegranate husk was negatively correlated with $O_2^{\cdot-}$ and $\cdot OH$ free radical scavenging rate, hydrogen peroxide content, SOD activity, glutathione content and chlorophyll content of active oxygen metabolism and positively correlated with the $O_2^{\cdot-}$ production rate; positively correlated with tissue electrolyte leakage and malondialdehyde content of membrane lipid metabolism. Additionally, the results of principal component analysis further confirmed that the browning of pomegranate husk was closely related to the metabolism of reactive oxygen species and membrane lipid, and the storage quality of 'Tunisia soft seed' pomegranate was obviously different from those of 'Jingpitian' and 'Lishanhong'.

Keywords pomegranate; husk browning; reactive oxygen species and membrane lipid metabolism; correlation analysis; principal component analysis