

柿果成熟过程中总酚和缩合单宁含量的变化

夏宏义, 杨 勇*, 夏乐晗, 杨婷婷, 阮小凤

(西北农林科技大学园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 本实验通过Folin-Ciocalteu法、香草醛-盐酸法测定不同类型12个柿品种果实生长发育进程中总酚和缩合单宁含量的变化, 并运用正交试验法对香草醛-盐酸法进行优化。结果表明: 香草醛-盐酸法优化参数为: 显色液为2.0 g/100 mL香草醛甲醇与15%盐酸甲醇液, 显色0.5 h。柿果实的生长发育进程中, 总酚和缩合单宁含量变化规律相似, 花后35~50 d达到最高水平, 随后逐渐降低, 但不同类型柿间总含量及变化幅度存在着较大的差异; 其中, 日本完全甜柿(J-PCNA)、中国完全甜柿(C-PCNA)、不完全甜柿(PVNA)、不完全涩柿(PVA)、完全涩柿(PCA)同类型各品种间总酚和缩合单宁变化趋势相似, 含量相近, 总酚、缩合单宁含量基本符合规律PCA>C-PCNA>PVA>PVNA>J-PCNA。

关键词: 柿果实; 香草醛-盐酸法; 总酚; 缩合单宁

Variations in Total Phenols and Condensed Tannins Contents in Persimmon Fruits from Different Varieties during Ripening

XIA Hong-yi, YANG Yong*, XIA Le-han, YANG Ting-ting, RUAN Xiao-feng

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: In this study, we examined changes in the contents of total phenols and condensed tannins in persimmon fruits from 12 different varieties during growth and development by using Folin-Ciocalteu assay and vanillin-hydrochloric acid assay, respectively. The experimental conditions for vanillin-hydrochloric acid assay were optimized by orthogonal array design. The results indicated that the optimum conditions for condensed tannins determination by vanillin-hydrochloric acid assay were as follows: the color was developed with 2.0 g/100 mL vanillin and 15% (by volume) concentrated HCl in methanol for 0.5 h. The contents of total phenols and condensed tannins changed in a similar pattern during the growth and development of persimmon fruits, reaching the maximum level at 35~50 d after the bloom stage followed by a gradual reduction. However, the levels of both parameters in persimmon fruits were greatly different and their variation amplitudes varied considerably among varieties. The contents of total phenols and condensed tannins were similar and changed in a similar pattern among different varieties from each of the five groups: Japanese pollination constant nonastringent (J-PCNA), Chinese pollination constant nonastringent (C-PCNA), pollination variant astringent (PVA), pollination variant nonastringent (PVNA), and pollination constant astringent (PCA), and the abundance of both compounds in these five groups followed the decreasing order: PCA, C-PCNA, PVA, PVNA, and J-PCNA.

Key words: persimmon fruit; vanillin-hydrochloric acid assay; total phenols; condensed tannins

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)19-0066-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201419014

世界柿科(Ebenaceae)植物有*Diospyros*、*Euclea*和*Lissocarpa* 3个属、共500多个种, 柿属*Diospyros*植物在全世界约有190个种, 主要分布于热带和亚热带^[1]。据联合国粮食及农业组织2011年统计, 全世界柿栽培面积约81万hm², 中国柿栽培面积约为73万hm², 占世界柿栽培总面积的90.1%; 世界柿年产量约为431.8万t, 中国约为329.0万t, 占世界柿年产量76.2%。根据果实能否自

然脱涩及其与种子数目和果肉褐斑形成的关系, 柿品种一般可分为完全甜柿(pollination constant nonastringent, PCNA)、不完全涩柿(pollination variant astringent, PVA)、不完全甜柿(pollination variant nonastringent, PVNA)和完全涩柿(pollination constant astringent, PCA)四大类, 我国栽培的柿品种以完全涩柿为主^[2]。我国完全甜柿(C-PCNA)和日本完全甜柿(J-PCNA)亲

收稿日期: 2013-11-08

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201203047); 农业部农作物种质资源保护项目(NB2012-2130135-21)

作者简介: 夏宏义(1989—), 男, 硕士研究生, 主要从事柿种质资源与分子生物学研究。E-mail: xiahongyi_1989@163.com

*通信作者: 杨勇(1964—), 男, 副教授, 硕士, 主要从事柿种质资源研究。E-mail: yang.yong521@163.com

缘关系较远,脱涩机制可能不同,关于是否应当归为一类尚存在争议,本实验拟将两者作为两类进行对比。

柿果中含有大量的多酚类物质,其中单宁占绝大部分,在单宁组分中,主要以缩合单宁为主,占总酚含量的70%~75%,而游离的小分子单宁组分较少^[3]。随着对其结构、性质、生理活性及其应用价值的深入研究,单宁已经广泛应用于医学、食品工业、制革工业、日化工业、冶金工业、环境污染治理等领域^[2,4]。单宁根据其结构类型可分为三大类:水解单宁、缩合单宁以及缩合单宁与水解单宁中的葡萄糖以碳键连接而成的复合单宁^[5]。目前,对柿总酚和缩合单宁的研究多集中在提取工艺^[6]或单个类型及品种^[7-8]上,尚未见到对不同类型柿生长发育进程中总酚和缩合单宁变化规律的系统研究报道。

Bate-Smith等^[9]发现香草醛-盐酸法对缩合单宁的测定具有特异性,特别是对于黄烷醇类物质测定效果较好;李绮丽等^[10]采用香草醛-盐酸法对莲皮缩合单宁测定;姚开等^[11]对葡萄籽缩合单宁进行测定,陈洪玉等^[12]对柳树叶中缩合单宁的含量测定进行了研究。香草醛-盐酸法测定缩合单宁,操作步骤简单、快捷,但不同研究者所采用的盐酸浓度、香草醛的浓度、显色时间各不相同,有待于规范统一^[10-15]。本实验通过正交试验对香草醛-盐酸法工艺参数进行了优化,并对国家柿种质资源圃保存较为齐全的5个类型共计12个柿品种生长发育中总酚和缩合单宁的含量变化进行了对比研究,以期探索不同类型柿总酚和缩合单宁的变化规律,从而促进柿总酚和缩合单宁及其副产品的开发利用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

柿果实于2012年5—10月花后不同时期采自陕西杨凌国家柿种质资源圃,包括5个不同类型12个品种柿资源,其中阳丰、大秋为日本完全甜柿,小果甜柿、秋焰为中国完全甜柿,西村早生、禅寺丸为不完全甜柿,刀根早生为不完全涩柿,月柿、黑柿、蓝田水柿、华县帽盔柿和临潼方柿为原产中国完全涩柿。

葡萄籽原花青素标准品(原花青素含量 $\geq 95.0\%$,低聚原花青素 $\geq 60.0\%$) 天津尖峰公司;香草醛、甲醇、盐酸、钨酸钠($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、硫酸锂($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)等试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-2600A紫外可见分光光度计 尤尼柯仪器有限公司; V6-2008组织匀浆机 陕西爱乐工贸有限公司; TIANFU-6246电子天平 金羊砝码仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 柿果总酚的提取

称取30 g柿果肉组织,加入到组织匀浆机中,加30 mL提取液(体积分数为1%的盐酸甲醇),匀浆,取7 g匀浆(相当于4 g果肉组织)转入到蒸馏瓶中,加40 mL提取液(料液比1:10),80℃加热回流40 min,过滤,将残渣转入蒸馏瓶中,加40 mL提取液,加热回流30 min,过滤至同一容量瓶,两次混合滤液定容至100 mL,备用。

1.3.2 总酚含量的测定

Folin-Ciocalteu显色液制备^[16]:取钨酸钠25 g、钼酸钠6.25 g,加水175 mL、85%磷酸12.5 mL、盐酸25 mL,置于磨口圆底烧瓶中,80℃加热回流10 h,冷却,再加硫酸锂37.5 g、蒸馏水12.5 mL和溴水适量,加热煮沸15 min,冷却,加蒸馏水稀释至250 mL,过滤,滤液贮存于棕色瓶中,备用。临用前加水一倍,摇匀,即得。

以没食子酸为标准品,吸取水合没食子酸(1 000 mg/L)溶液0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL,用水定容至100 mL,得到0、20、40、60、80、100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液。分别取1 mL标准溶液,加1 mL F-C显色液,混匀,放置5 min,加3 mL 7.5%碳酸钠溶液、加5 mL双蒸水,充分混匀,显色60 min,以1%盐酸甲醇为对照,在765 nm波长处测定吸光度(A)。以 A 为纵坐标,水合没食子酸溶液质量浓度(mg/mL)为横坐标,绘制标准曲线,得到回归方程 $y=10.148x-0.0002$, $R^2=0.9999$ 。将1 mL样品液用提取液稀释适当倍数后取1 mL稀释液代替标准液进行测定,3次重复。

1.3.3 缩合单宁含量的测定

1.3.3.1 香草醛-盐酸测定方法的优化

显色液浓度设置为0.5 g/100 mL香草醛甲醇和体积分数4%盐酸甲醇溶液、1.0 g/100 mL香草醛甲醇和20%盐酸甲醇溶液及2.0 g/100 mL香草醛甲醇和30%盐酸甲醇溶液3个组合,显色时间采用0.5、1、1.5、15 h 4个水平,以质量浓度0、120、240、360、480、600 $\mu\text{g/mL}$ 的葡萄籽原花青素吸光度为指标,进行显色液浓度和显色时间的初步选择。在初步筛选的基础上,对香草醛甲醇液质量浓度、盐酸甲醇液体积分数、显色时间进行三因素三水平的正交试验,确定最佳香草醛-盐酸测定方法。

1.3.3.2 缩合单宁含量标准曲线的绘制

精确配制质量浓度分别为0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.9 mg/mL的葡萄籽原花青素溶液2 mL,采用优化的香草醛-盐酸法进行显色,于500 nm波长处测吸光度。以吸光度为纵坐标,葡萄籽原花青素溶液质量浓度(mg/mL)为横坐标,绘制标准曲线。将样品液稀释适当倍数后取1 mL稀释液代替葡萄籽原花青素标准液进行测定,做3次重复。

1.4 统计分析

不同类型柿品种各时期果实总酚和缩合单宁含量差异显著性分析采用邓肯氏新复极差检验法, DPS 9.50数据处理系统处理; 缩合单宁占总酚含量百分比采用Excel作图。

2 结果与分析

2.1 香草醛-盐酸测定方法的优化

2.1.1 显色液浓度及显色时间初步筛选

0.5 g/100 mL香草醛甲醇和4%盐酸甲醇溶液: 反应时间0.5 h, 吸光度均小于0.1, 偏小; 分别延长反应时间至1、1.5、15 h, 吸光度变化不大, 可能是因为香草醛和盐酸浓度(酸起催化剂作用)太低。进一步实验, 提高两者浓度, 采用1.0 g/100 mL香草醛甲醇和20%盐酸甲醇溶液及2.0 g/100 mL香草醛甲醇和30%盐酸甲醇溶液作为显色液, 显色0.5、1、1.5、15 h, 测定不同质量浓度葡萄籽原花青素的吸光度。前者显色1 h, 后者显色0.5 h时, 各质量浓度葡萄籽原花青素吸光度最大。

表1 不同质量浓度葡萄籽原花青素吸光度
Table 1 Absorbance of grape seed procyanidin with various mass concentrations

1.0 g/100 mL香草醛甲醇液和20%盐酸甲醇溶液(显色1 h)		2.0 g/100 mL香草醛甲醇液和30%盐酸甲醇溶液(显色0.5 h)	
葡萄籽原花青素质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)	吸光度	葡萄籽原花青素质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)	吸光度
0	0.000	0	0.000
120	0.031	120	0.202
240	0.091	240	0.403
360	0.165	360	0.598
480	0.189	480	0.801
600	0.193	600	1.012

由表1可知, 1.0 g/100 mL香草醛甲醇和20%盐酸甲醇溶液作为显色液, 显色1 h, 480 $\mu\text{g/mL}$ 和600 $\mu\text{g/mL}$ 葡萄籽原花青素吸光度差异不大, 增加量很小, 可能是香草醛质量浓度不够。提高香草醛的质量浓度, 改用2.0 g/100 mL香草醛甲醇和30%盐酸甲醇溶液, 显色0.5 h, 吸光度梯度明显。

2.1.2 正交试验

在显色液浓度及显色时间初步筛选的基础上, 选定香草醛甲醇液质量浓度(A)、盐酸甲醇液体积分数(B)、显色时间(C)进行三因素三水平正交试验, 测定浓度为600 $\mu\text{g/mL}$ 葡萄籽原花青素的吸光度, 试验设计与极差分析结果见表2。

根据极差大小可知各因素对吸光度的影响大小顺序为 $B>A>C$, 最佳显色条件为 $A_3B_3C_1$ 。方差分析结果如表3所示, 因素C不同水平间吸光度没有显著性差异

($P>0.05$), 为节省时间, 提高实验效率, 故选定为0.5 h; 因素A和B不同水平间差异显著($P<0.05$), 因此对因素A和B进行多重比较, 结果见表4。

表2 $L_9(3^3)$ 正交试验及极差分析结果
Table 2 Orthogonal array design $L_9(3^3)$ and range analysis

试验号	A/(g/100 mL)	B/%	C/min	吸光度
1	0.5	4	30	0.465
2	0.5	15	60	0.697
3	0.5	30	120	0.746
4	1.0	4	60	0.503
5	1.0	15	120	0.850
6	1.0	30	30	1.043
7	2.0	4	120	0.503
8	2.0	15	30	1.059
9	2.0	30	60	1.088
k_1	0.636	0.490	0.856	
k_2	0.799	0.869	0.753	
k_3	0.883	0.959	0.700	
R	0.247	0.469	0.156	

表3 $L_9(3^3)$ 正交试验方差分析结果
Table 3 Analysis of variance for the experimental results of orthogonal array design $L_9(3^3)$

变异来源	平方和	自由度	均方	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
A	0.09	2	0.05	22.05*	19.00	99.00
B	0.37	2	0.19	86.26*	19.00	99.00
C	0.04	2	0.02	8.60	19.00	99.00
误差	0.00	2	0.00			
总变异	0.51	8				

注: *, 差异显著($P<0.05$)。

表4 香草醛甲醇液质量浓度和盐酸甲醇体积分数对吸光度的影响
Table 4 Effects of vanillin and hydrochloric acid concentrations in methanol on the absorbance

香草醛甲醇液质量浓度/(g/100 mL)	吸光度	差异显著性		盐酸甲醇体积分数/%	吸光度	差异显著性	
		$P=0.05$	$P=0.01$			$P=0.05$	$P=0.01$
A_3	0.883	a	A	B_3	0.959	a	A
A_2	0.799	a	A	B_2	0.869	a	A
A_1	0.636	b	A	B_1	0.490	b	B

注: 同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。表5、6同。

由表4可知, A_3 水平香草醛甲醇溶液和 B_3 水平盐酸甲醇溶液吸光度最大, A_3 和 A_2 水平以及 B_3 和 B_2 水平对吸光度影响差异不显著。考虑到30%的盐酸对实验人员健康不利, 因此选用15%的盐酸甲醇液。综上, 香草醛-盐酸法最佳工艺参数为: 2.0 g/100 mL香草醛甲醇、体积分数15%盐酸甲醇液, 显色0.5 h。

2.1.3 缩合单宁含量标准曲线

以吸光度为纵坐标, 葡萄籽原花青素溶液质量浓度(mg/mL)为横坐标, 绘制标准曲线, 得到回归方程为 $y=1.6728x-0.0014$, $R^2=0.994$ 。

2.2 柿生长发育中总酚及缩合单宁含量的变化

通过Folin-Ciocalteu法、优化的香草醛-盐酸法对不

同类型12个柿品种的总酚和缩合单宁的含量进行了测定,结果如表5、6所示。各柿品种在生长发育过程中,总酚和缩合单宁含量在花后35 d或50 d处于或接近最高水平,随后逐渐降低,直至成熟,达到最低水平。阳丰和大秋果实生长发育过程中,总酚和缩合单宁含量均显著低于其他柿品种($P<0.05$)。对比同一发育期不同柿品种间总酚和缩合单宁含量发现,花后35 d,小果甜柿和黑柿总酚含量最高,华县帽盔柿次之;缩合单宁含量以黑柿最高,月柿和小果甜柿次之,临潼方柿稍低。花后50 d,月柿总酚和缩合单宁含量均为最高,临潼方柿总酚含量次之,黑柿和小果甜柿总酚含量稍低;黑柿和临潼方柿缩合单宁显著低于月柿($P<0.05$),但两者间差异不显著($P>0.05$),小果甜柿缩合单宁含量稍低。花后65 d,月柿和黑柿总酚含量最高,差异不显著,临潼方柿次之,小果甜柿总酚含量稍低;缩合单宁以小果甜柿、月柿、黑柿含量最高,三者间无显著差异($P>0.05$),临潼方柿次之,西村早生和禅寺丸稍低。花后80、110、130 d,月柿总酚和缩合单宁均为最高,黑柿总酚含量次之,黑柿总酚含量除花后130 d和小果甜柿差异不显著外($P>0.05$),显著高于同时期其他柿品种($P<0.05$)。花后80 d,黑柿和小果甜柿缩合单宁含量次之且无显著差异($P>0.05$);花后110 d和130 d,小果甜柿缩合单宁稍低于月柿但显著高于黑柿($P<0.05$)。花后150 d,月柿总酚含量最高,小果甜柿次之且显著高于黑柿;缩合单宁含量以小果甜柿最高,月柿次之且显著高于黑柿,秋焰缩合单宁含量相对较高。西村早生和禅寺丸花后35、50、65、80 d,总酚含量差异不显著,花后110、130、150 d,西村早生总酚含量显著低于禅寺丸。

表5 不同类型柿品种总酚含量的变化
Table 5 Change in total phenols content in persimmon fruits from different varieties

柿品种	采样时期(花后)/d						
	35	50	65	80	110	130	150
J-PCNA	阳丰	18.49±0.24 ^f	12.33±0.38 ^f	9.66±0.25 ^f	5.63±0.22 ^f	3.21±0.04 ^f	2.01±0.06 ^f
	大秋	19.16±0.57 ^f	12.42±0.21 ^f	9.53±0.09 ^f	4.94±0.37 ^f	2.57±0.17 ^f	1.61±0.16 ^f
C-PCNA	小果甜柿	45.88±0.98 ^a	39.43±0.43 ^d	36.96±0.76 ^c	33.29±0.52 ^c	25.67±0.64 ^d	19.87±0.24 ^b
	秋焰	34.45±0.59 ^d	28.14±0.44 ^d	23.54±0.37 ^f	18.98±0.41 ^b	15.06±0.42 ^f	13.25±0.27 ^f
PVNA	西村早生	29.64±1.60 ^e	32.26±0.29 ^e	30.12±0.36 ^d	24.14±0.73 ^c	8.73±0.09 ^b	5.98±0.29 ^b
	禅寺丸	29.08±0.67 ^e	31.94±0.34 ^e	28.74±0.68 ^d	23.30±0.27 ^f	12.49±0.88 ^e	7.30±0.19 ^e
PVA	刀根早生	29.47±0.58 ^e	33.29±0.30 ^f	26.52±0.46 ^e	21.89±0.35 ^e	15.90±0.45 ^f	8.43±0.16 ^f
	月柿	41.15±0.90 ^e	49.28±0.35 ^a	44.60±0.62 ^a	41.63±0.78 ^a	42.83±0.84 ^a	28.93±0.66 ^a
PCA	黑柿	45.91±0.58 ^a	40.71±0.61 ^e	42.85±1.45 ^a	35.17±1.20 ^b	34.46±1.17 ^b	20.51±0.74 ^b
	蓝田水柿	35.68±0.48 ^d	35.53±0.80 ^f	29.79±1.26 ^d	25.47±0.74 ^c	22.37±0.39 ^f	16.67±0.76 ^c
临潼方柿	华县帽盔	44.01±0.59 ^b	35.19±1.06 ^e	26.40±3.28 ^e	29.94±0.51 ^d	24.55±1.35 ^f	17.32±0.11 ^f
	临潼方柿	40.02±1.51 ^c	41.79±0.78 ^e	39.63±0.55 ^d	30.20±0.60 ^d	27.47±1.64 ^d	15.05±0.72 ^d

日本完全甜柿、中国完全甜柿、不完全甜柿、完全涩柿同类型各品种间总酚和缩合单宁变化趋势相似,含

量相近,总酚、缩合单宁含量基本符合完全涩柿最高,中国完全甜柿相当或微低,不完全涩柿次之,不完全甜柿偏低,日本完全甜柿最低。中国完全甜柿和日本完全甜柿总酚和缩合单宁含量差异较大,含量高于日本完全甜柿,和完全涩柿类似。

表6 不同类型柿品种缩合单宁含量的变化
Table 6 Change in condensed tannins content in persimmon fruits from different varieties

柿品种	采样时期(花后)/d						
	35	50	65	80	110	130	150
J-PCNA	阳丰	13.74±0.01 ⁱ	7.45±0.23 ⁱ	2.80±0.20 ^f	2.73±0.13 ^f	2.18±0.07 ^f	1.91±0.15 ^b
	大秋	14.86±0.11 ⁱ	7.97±0.38 ^f	2.67±0.13 ^f	2.44±0.09 ^f	1.84±0.08 ^f	1.81±0.09 ^b
C-PCNA	小果甜柿	40.30±1.20 ^{bc}	38.41±1.11 ^f	35.03±1.23 ^e	31.28±0.91 ^b	20.74±0.62 ^a	17.43±0.53 ^b
	秋焰	30.37±0.55 ^f	26.48±0.63 ^f	22.12±0.08 ^f	16.28±0.17 ^f	13.05±0.44 ^d	10.18±0.22 ^d
PVNA	西村早生	28.24±0.06 ^{ab}	28.45±0.58 ^f	28.66±0.31 ^f	17.51±0.51 ^f	4.58±0.06 ^b	3.94±0.18 ^e
	禅寺丸	28.76±0.19 ^f	26.55±0.30 ^b	26.45±1.14 ^d	17.51±0.44 ^f	4.58±0.46 ^b	3.94±0.34 ^e
PVA	刀根早生	27.54±0.28 ^b	31.36±0.40 ^f	24.79±0.35 ^f	21.15±0.29 ^f	7.13±0.73 ^f	5.06±0.13 ^f
	月柿	40.80±0.92 ^b	46.59±0.13 ^a	34.50±0.74 ^d	33.75±0.97 ^a	32.71±0.48 ^a	25.69±0.99 ^a
PCA	黑柿	44.52±0.53 ^a	39.58±0.39 ^b	34.20±0.40 ^d	31.24±0.66 ^b	15.41±0.24 ^a	14.32±1.32 ^e
	蓝田水柿	34.57±0.52 ^e	34.83±0.52 ^d	26.65±0.68 ^d	23.03±0.85 ^d	7.01±0.11 ^f	6.55±0.76 ^c
临潼方柿	华县帽盔	37.56±0.64 ^d	33.66±1.33 ^e	25.80±1.05 ^{ab}	22.61±0.28 ^d	8.85±0.31 ^f	7.36±0.26 ^c
	临潼方柿	39.23±1.34 ^c	40.45±0.79 ^b	32.40±0.35 ^b	24.71±0.65 ^c	11.14±1.31 ^f	9.87±0.33 ^d

2.3 缩合单宁与总酚含量变化关系

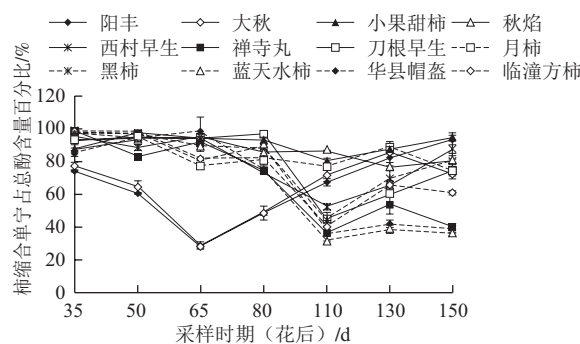


图1 柿缩合单宁占总酚含量百分比

Fig.1 Ratio between condensed tannins and total phenols in persimmon fruits

用缩合单宁占总酚含量的百分比阐释柿果实发育进程中缩合单宁和总酚的关系,结果见图1。阳丰和大秋缩合单宁占总酚含量百分比变化趋势一致,花后35 d约为75%;随后逐渐降低,花后65 d达到最低值,为28%~29%;之后随着果实的发育,所占比例逐渐增大,花后150 d,两者含量之比高达93%。小果甜柿和秋焰缩合单宁占总酚含量百分比走势相似,各个发育阶段均处于较高的水平,为76%~95%,尤其是花后150 d时,分别和阳丰及大秋相近,明显高于其他柿品种。其他柿品种缩合单宁占总酚含量百分比均在花后35 d和50 d

最高,随后逐渐降低,花后110 d降低到最低水平,为31%~76%;之后随着果实的发育成熟,缩合单宁占总酚含量百分比相持平或有所升高,其中,西村早生、刀根早生、月柿、黑柿、临潼方柿缩合单宁占总酚含量百分比在进后130 d和150 d相对较高,禅寺丸、蓝田水柿和华县帽盔相当,处于较低水平,36%~40%。

3 讨论

本实验通过Folin-Ciocalteu法和香草醛-盐酸法对5个类型12个品种柿生长发育进程中总酚和缩合单宁含量进行了测定,结果发现,在花后35~50 d不同柿品种总酚和缩合单宁含量均达到最高水平,随着生长发育的进程,总酚和缩合单宁含量成降低走势或略有波动。周舟等^[8]研究发现,不同品种甜柿和涩柿的总酚含量及缩合单宁含量从7月份开始持续下降;长沙牛心柿在6月9日—7月19日总酚含量均处于较高水平,6月中旬达到最大值后呈缓慢下降趋势,涩柿总酚变化趋势基本和长沙牛心柿相符。关于不同类型多品种果实总酚和缩合单宁含量在果实成熟过程中的变化规律,葡萄果实有着相似的报道。Amerine等^[17]对葡萄的研究表明,多数品种葡萄单宁的含量在成熟期间持续下降,与本实验中阳丰、大秋、秋焰、小果甜柿、黑柿、蓝田水柿、华县帽盔柿总酚和缩合单宁含量的变化规律一致;Da-Silva等^[18]研究发现,在赤霞珠和西拉两个品种的种子中,单宁含量在刚过始熟期有个峰,然后下降直到采收,果皮中单宁含量从始熟期到采收期除有小的波动外,基本保持稳定,与本实验中刀根早生、月柿和临潼方柿总酚和单宁含量变化规律一致。

日本完全甜柿阳丰和大秋果实中总酚和缩合单宁均花后35 d最高,之后随着果实的发育迅速减少,同时果实的质量和体积不断地增大,到花后110 d单位质量果肉组织内总酚和缩合单宁的含量已分别降到0.32%、0.22%和0.26%、0.18%以下,食用已无明显涩感。这与宿福园^[19]研究的前川次郎“稀释效应”脱涩机制一致。中国甜柿小果甜柿和秋焰总酚和缩合单宁显著高于日本完全甜柿,在花后150 d两者含量分别为1.55%、1.47%和1.16%、0.94%,处于较高的水平,与完全涩柿含量相当或略低。小果甜柿和秋焰存在“稀释效应”,但最终缩合单宁含量较高,和日本甜柿不同,推测可能是由于可溶性多酚转化为不溶性的缩合单宁所致。胡倩妮^[20]对柿单宁聚合相关基因进行克隆、表达分析及功能验证,证实中国原产完全甜柿自然脱涩与柿可溶性单宁向不溶性单宁聚合转化过程密切相关。宿福园^[19]探索罗田甜柿脱涩机制发现,罗田甜柿单宁变化受温度和气候的影响较大。杨勇等^[21]研究发现,日本完全甜柿果实成熟时存在着分散于果肉中的凝固型和凝聚型两种单宁细胞,但中

国甜柿只有凝固型单宁细胞且成串出现在果肉中,而不存在凝聚型单宁细胞。结合本实验测定总酚和缩合单宁结果,推测中国甜柿成熟后总酚和缩合单宁高于日本甜柿的主要原因可能是单宁含量细胞形态及发育差异所致。日本甜柿阳丰和大秋缩合单宁占总酚含量百分比变化趋势一致,中国甜柿小果甜柿和秋焰变化趋势一致,但两者间差异较大,进一步说明日本甜柿和中国甜柿脱涩机制不同,两者不是同一起源。

本研究发现不完全甜柿西村早生和禅寺丸总酚及缩合单宁含量水平和完全涩柿存在着一定差异,低于或略低于完全涩柿;而周舟等^[8]研究发现完全涩柿三代斤柿和中国完全甜柿罗田甜柿与涩柿的变化趋势基本一致,可能是因为不完全甜柿品种间存在差异,或者是由于不同地域、气候及栽培管理措施影响所致。杨勇等^[22]研究表明,西村早生和禅寺丸等不完全甜柿成熟果肉中,长形单宁细胞紧密聚集成单宁细胞束形成褐色斑点;费学谦等^[23]研究发现,不完全甜柿由“凝固效应”即果实内由可溶性单宁向不溶性单宁转变而完成脱涩,说明不完全甜柿果实“凝固效应”脱涩机制和单宁细胞束的形成有关。

完全涩柿总酚含量在整个生育期内处于较高水平,缩合单宁因品种差异较大,卫永乐^[24]发现完全涩柿果肉的总酚和可溶性酚含量在整个生长季都维持在较高的水平上,说明完全涩柿脱涩“凝固效应”影响很小;杨勇等^[21]对柿单宁细胞形态特征及发育动态研究发现,完全涩柿果实整个生育期内,单宁细胞没有明显生长停滞现象,持续增大至成熟,故一般不能在树上完成脱涩。完全涩柿不同品种可能脱涩机理不同,有待进一步研究。

柿总酚一般为水解单宁和缩合单宁的总和^[19,25]。阳丰和大秋缩合单宁占总酚含量百分比在花后65 d达到最低水平,随着果实发育成熟又升到较高水平。Yonemori等^[26]研究发现,甜柿果实发育进程中,小分子质量组分占优势,且花后65 d为果实快速生长期,果实的生长伴随着由小分子质量的单宁物质转化为以高分子质量为主的缩合单宁类物质,所以两者之比呈现先降低再升高的趋势。小果甜柿和秋焰属于中国完全甜柿,未成熟时其缩合单宁占总酚的比例变化和完全涩柿相近与日本完全甜柿阳丰和大秋差别较大,但成熟时与阳丰和大秋相近,高于其他类型柿品种,可能是由于中国完全甜柿在生长发育后期可以较好地进行自然脱涩,而完全涩柿脱涩效率低甚至不能进行脱涩所致。不完全甜柿、不完全涩柿和完全涩柿缩合单宁占总酚含量百分比由高降低到一定水平后,随着果实的发育成熟,缩合单宁占总酚之比相持平或有所升高,和周舟等^[8]对涩柿果实总酚变化规律的探究结果基本一致。日本学者远藤融郎^[27]提出甜柿是由完全涩柿突变为不完全涩柿,再变异为不完全甜柿,再经过芽变、杂交育种或长期人工选择得到完全甜柿品种。本

研究发现,不完全涩柿、不完全甜柿与部分涩柿缩合单宁占总酚比例变化走势相近,进一步验证了远藤融郎提出的假设。缩合单宁与总酚含量变化的关系能较好地间接反映出不同类型柿品种特性与亲缘关系。

4 结 论

本实验通过正交试验确定香草醛-盐酸法测定缩合单宁含量的最佳工艺参数为:显色液为2.0 g/100 mL香草醛甲醇与体积分数15%盐酸甲醇液,显色0.5 h。柿总酚及缩合单宁测定结果表明,在柿果实的生长发育进程中,总酚和缩合单宁含量呈现相似的变化规律,花后35~50 d达到最高水平,随后逐渐降低,但不同类型柿间总酚和缩合单宁含量及变化幅度存在着较大的差异;日本完全甜柿、中国完全甜柿、不完全甜柿、完全涩柿同类型各品种间总酚和缩合单宁变化趋势相似、含量相近,总酚、缩合单宁含量基本符合规律PCA>C-PCNA>PVA>PVNA>J-PCNA;中国甜柿总酚及缩合单宁含量均高于日本甜柿,差异较大,两者脱涩机制不同,进一步验证了两者亲缘关系可能较远,不应归为同一类型。完全涩柿不同品种可能存在不同脱涩机制,有待进行深入研究。

参考文献:

- [1] 王仁梓. 柿[M]. 北京: 中国林业出版社, 1982: 1-19.
- [2] 谢枫, 樊在军, 张青林, 等. 柿单宁在重金属吸附中的应用研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(3): 391-396.
- [3] 顾海峰, 李春美, 钟慧臻, 等. 柿子单宁优化提取工艺探讨[J]. 食品科技, 2007, 32(2): 133-136.
- [4] 石闪闪, 何国庆. 单宁酸及其应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(4): 410-412.
- [5] 尹胜利, 浦益琼, 杨骏, 等. 中药鞣质成分的研究进展[J]. 中国医药导刊, 2009, 12(1): 165-167.
- [6] 周舟, 曾建国, 彭淼, 等. 柿果多酚提取工艺优化[J]. 食品科学, 2011, 32(16): 117-120.
- [7] 陈佩, 李平, 郝艳宾, 等. 柿果成熟过程中可溶性果胶和单宁含量的变化[J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(1): 88-92.
- [8] 周舟, 钟晓红, 曾建国, 等. 柿果实多酚含量变化规律研究[J]. 湖南农业科学, 2011, 3(2): 137-140.
- [9] BATE-SMITH E C, LERNER N H. Leuco-anthocyanin 2. systematic distribution of leuc-anthocyanins in leaves[J]. Biochemical Journal, 1954, 58(1): 126-132.
- [10] 李绮丽, 吴卫国, 彭芳刚. 莲子皮原花青素测定方法的研究[J]. 现代食品科技, 2012, 28(2): 241-245.
- [11] 姚开, 何强, 吕远平, 等. 葡萄籽提取物中原花青素含量的测定[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(3): 17-19.
- [12] 陈洪玉, 迟彩霞, 王德新. 柳树叶中原花青素含量测定[J]. 应用化工, 2012, 41(8): 1456-1461.
- [13] PRICE M L, SCOYOC S V, BUTLER L G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1978, 26(5): 1214-1218.
- [14] 李春阳, 许时婴, 王璋. 香草醛-盐酸法测定葡萄籽、梗中原花青素含量的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 157-160.
- [15] SUN Baoshan, DA-SILVA J M, SPRANGER I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(10): 4267-4274.
- [16] 吴晓青, 陈丹, 邱红鑫. 芙蓉李中总多酚含量测定方法的优选[J]. 中国中医药科技, 2011, 18(2): 131-133.
- [17] AMERINE M A, OUGH C S. Methods for analysis of musts and wines[M]. New York: A Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons, 1980: 175-197.
- [18] DA-SILVA J M, RIGAUD J, CHEYNIER V, et al. Procyanidin dimmers and trimers from grape seeds[J]. Phytochemistry, 1991, 30(4): 1259-1264.
- [19] 宿福园. 参与柿单宁代谢调控的MYB、bHLH、WD40转录因子的克隆及分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012: 34-41.
- [20] 胡倩妮. 柿单宁聚合相关基因的克隆、表达分析及功能验证[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011: 55-58.
- [21] 杨勇, 阮小凤, 王仁梓, 等. 单宁细胞形态与部分柿属种及品种相关性研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(8): 1524-1530.
- [22] 杨勇, 阮小凤, 王仁梓, 等. 柿单宁细胞形态特征及发育动态研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2003, 31(6): 93-99.
- [23] 费学谦, 周立红, 王劲风. 柿自然脱涩能力与单宁细胞发育规律的研究[J]. 林业科学研究, 1996, 9(1): 27-31.
- [24] 卫永乐. 甜、涩柿酚类物质的差异性研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2006: 24.
- [25] SUGIURA A. Retrospects and prospects on persimmon research[J]. Acta Horticulturae, 2005, 685: 177-186.
- [26] YONEMORI K, MATSUMOTO J. Difference in tannin of non-astringent and astringent type fruits of Japanese persimmon (*Diospyros Kaki* Thunb)[J]. Japanese Society for Horticultural Science, 1983, 52(2): 135-144.
- [27] 远藤融郎. 柿树起源的探讨[J]. 梁若英, 译. 国外农学: 果树, 1989 (1): 31-33.