

新鲜莲子不同组织涩味成分与关键酶基因差异表达分析

杨银爱, 韩延超, 刘瑞玲, 陈慧芝, 牛 犇, 郜海燕*, 陈杭君*

(浙江省农业科学院食品科学研究所, 农业农村部果品采后处理重点实验室, 农业农村部蔬菜采后保鲜与加工重点实验室(部省共建), 浙江省果蔬保鲜与加工技术研究重点实验室, 中国轻工业果蔬保鲜与加工重点实验室, 浙江 杭州 310021)

摘要: 为探究新鲜莲子不同组织涩味物质的差异及其合成过程中的关键酶基因, 研究了莲子种皮、去种皮后莲肉和莲心中可溶性单宁、不溶性单宁和原花青素含量, 同时对单宁合成途径中关键酶活性和相关基因表达量进行测试, 结合感官评价和电子舌检测, 并采用正交偏最小二乘判别分析和相关性分析。结果表明: 引起莲子涩味的主要物质为可溶性单宁; 蜡熟期莲子中的单宁对其优良风味的形成具有正向作用; 花青素还原酶是影响莲子涩味强度的关键酶, *SnANR9*影响莲子不同组织涩味物质的合成。

关键词: 莲子种皮; 莲肉; 莲心; 涩味

Analysis of Astringent Components and Differential Gene Expression of Related Key Enzymes in Different Tissues of Fresh Lotus Seeds

YANG Yin'ai, HAN Yanchao, LIU Ruiling, CHEN Huizhi, NIU Ben, GAO Haiyan*, CHEN Hangjun*

(Food Science Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Post-Harvest Handling of Fruits, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Postharvest Preservation and Processing of Vegetables (Co-construction by Ministry and Province), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Fruits and Vegetables Postharvest and Processing Technology Research of Zhejiang Province, Key Laboratory of Postharvest Preservation and Processing of Fruits and Vegetables, China National Light Industry, Hangzhou 310021, China)

Abstract: This study was performed to explore the differences in the composition of astringent substances in different tissues of fresh lotus seeds and the expression of key enzyme genes involved in the synthesis of astringent compounds. The contents of soluble tannins, insoluble tannins and proanthocyanidins in lotus seed coat, lotus seed pulp without coat and lotus seed plumule were determined. Meanwhile, the activity and gene expression of key enzymes in the tannin synthesis pathway were detected. Sensory evaluation and electronic tongue analysis were performed on lotus seed samples. The data obtained was analyzed by orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) and correlation analysis. Results showed that the major substance contributing to the astringency of lotus seeds was soluble tannins. Tannins had a positive effect on its excellent flavor at the waxy ripeness stage. Anthocyanin reductase was a key enzyme affecting the astringency intensity of lotus seeds. *SnANR9* played a role in regulating the astringency of different tissues of lotus seeds.

Keywords: lotus seed coat; lotus seed pulp; lotus seed plumule; astringency

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230509-067

中图分类号: TS255.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 02-0120-08

引文格式:

杨银爱, 韩延超, 刘瑞玲, 等. 新鲜莲子不同组织涩味成分与关键酶基因差异表达分析[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 120-127. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230509-067. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-05-09

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-24-E-01); 国家自然科学基金面上项目 (32172283);

浙江省万人计划人才培养项目 (2018R52020)

第一作者简介: 杨银爱 (1997—) (ORCID: 0000-0001-7915-5248), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品物流保鲜与品质调控。

E-mail: 13168518348@163.com

*通信作者简介: 郜海燕 (1958—) (ORCID: 0000-0003-3545-4224), 女, 研究员, 博士, 研究方向为食品物流保鲜与品质调控。E-mail: spsghy@163.com

陈杭君 (1976—) (ORCID: 0000-0003-4331-0458), 男, 研究员, 博士, 研究方向为食品物流与营养品质。

E-mail: spshangjun@sina.com

YANG Yin'ai, HAN Yanchao, LIU Ruiling, et al. Analysis of astringent components and differential gene expression of related key enzymes in different tissues of fresh lotus seeds[J]. Food Science, 2024, 45(2): 120-127. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230509-067. <http://www.spkx.net.cn>

莲子 (*Semen nelumbinis*) 是莲 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) 的主要食用部分, 在我国已有7 000多年的栽培历史^[1]。新鲜莲子作为水果销售已日渐流行, 研究表明低成熟度莲子如乳熟期和蜡熟期莲子适合鲜食^[2]。涩味是鲜食莲子的不良滋味。鲜食莲子可食用部分可细分为莲子种皮、去种皮后莲肉和莲心三部分, 其涩味强度存在差异。

涩味是由多酚类物质与唾液蛋白结合, 使其沉淀和聚集, 在口腔中产生的干燥不愉快感。在大部分水果如柿子、葡萄、石榴和香蕉中, 引起涩味的主要物质是单宁^[3]。单宁是类黄酮类次生代谢产物, 分子质量为500~3 000 u, 可沉淀生物碱、明胶和蛋白质^[4-5]。0.03%~0.1%的单宁不仅能强化果实酸味, 还能赋予果实清凉口感, 但高于1%的单宁则使果实具有强烈的涩味^[6-7]。根据化学结构, 可将单宁分为缩合单宁和水解单宁^[8]。缩合单宁又称原花青素, 由黄烷-3-醇类单体缩合而成, 包括儿茶素、表儿茶素、没食子儿茶素、表没食子儿茶素等, 是水果中涩味的主要来源。Gonzalo-Diago等^[9]认为丝质滑顺感和干燥感受原花青素单位物质的影响。水解单宁由单糖与没食子酸及其衍生物形成, 在酸性、碱性或酶溶液作用下容易被水解^[10], 常见于少数浆果和石榴中^[11-12]。根据在甲醇中的溶解性, 可将单宁分为不溶性单宁和可溶性单宁。不溶性单宁是单宁的高聚物, 可通过调节酸碱度及温度等环境因素使其变为可溶性单宁^[13]。研究表明, 可溶性单宁是植物的主要呈涩物质^[14-16]。花青素还原酶 (anthocyanin reductase, ANR) 和无色花青素还原酶 (leucocyanidin reductase, LAR) 是植物单宁生物合成途径后期的关键酶^[17-18]。目前关于涩味的报道主要停留在物质层面, 较少从分子层面对涩味进行研究, 研究涩味形成相关基因的表达对于探讨其调控机制具有重要意义。

本实验研究新鲜莲子种皮、去种皮后莲肉和莲心中可溶性单宁、不溶性单宁和原花青素含量, 同时对ANR和LAR活性进行测定, 并结合感官评价和电子舌检测, 通过相关性分析、正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 等确定引起莲子涩味的主要物质及其合成途径关键酶基因, 旨在为莲子去涩机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

‘西湖果莲’由杭州莲谊农业开发有限公司提供。

于2022年9月21日采收蜡熟期^[19]鲜莲30个, 采后约5 h送至实验室。从每个莲蓬里挑选10颗饱满且成熟度一致的莲子, 共300颗莲子。将去壳后莲子分为莲子种皮、去种皮后莲肉、莲心三部分。

甲醇、儿茶素、没食子酸、原花青素标准品 (均为色谱级) 上海麦克林生化科技有限公司; 盐酸、浓硫酸 (纯度95%~98%)、磷酸二氢钠 (均为分析纯) 上海凌峰化学试剂有限公司; 佛丹二氏试剂 (分析纯) 上海雅吉生物科技有限公司; *N,N*-二甲基乙酰胺 (分析纯) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; OminiPlant RNA Kit (DNase I)试剂盒 北京索莱宝科技有限公司; HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)试剂盒、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒 南京诺维赞医疗科技有限公司; 无水碳酸钠、无水磷酸氢二钠 (均为分析纯) 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 单宁酸 (分析纯) 国药集团化学试剂有限公司; 植物ANR酶联免疫分析试剂盒、植物LAR酶联免疫分析试剂盒 上海源桔生物科技公司。

1.2 仪器与设备

微量分光光度计 日本Shimadzu公司; 实时荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 美国Applied Biosystems公司; WD9413C凝胶成像分析系统 北京六一生物科技有限公司; 5430 R台式高速离心机 德国Eppendorf生命科学公司; Stratos 64R高速低温冷冻离心机 美国贝克曼库尔特有限公司; DK-S28电热恒温水浴锅 上海启前电子科技有限公司; RE-52AA旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂; ReadMax1900型光吸收全波长酶标仪 上海闪谱生物科技有限公司; CTongue电子舌 上海保圣实业发展有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品前处理

将莲子种皮、去种皮后莲肉、莲心分别用液氮充分研磨, 贮于-80℃冰箱, 用于可溶性单宁、不溶性单宁、原花青素含量的测定。

1.3.2 可溶性单宁含量的测定

参考已有研究方法^[20-21], 称取1 g莲子组织粉末, 加入40 mL 80%甲醇溶液, 均质10 min后于3 200×g离心7 min, 重复提取3次, 过滤, 合并提取液, 旋蒸至15 mL。取0.1 mL提取液, 依次加入9.3 mL蒸馏水、300 μL佛丹二氏试剂。反应3 min后, 加入300 μL饱和Na₂CO₃溶液。室温条件下, 混合物置于暗处1 h, 760 nm

波长处测定吸光度。使用没食子酸制作的标准曲线(0、40、80、120、160、200 $\mu\text{g/mL}$)对可溶性单宁含量进行定量,单位为 mg/g 。

1.3.3 不溶性单宁含量的测定

参考已有研究方法^[22-23],可溶性单宁提取后剩下的固体用于不溶性单宁含量的测定。向固体中加入40 mL酸性甲醇(含1% HCl),60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下搅拌30 min,然后3 200 \times g离心7 min,收集上清液。提取3次,合并上清液并旋蒸至15 mL。使用没食子酸制作的标准曲线(0、40、80、120、160、200 $\mu\text{g/mL}$)对不溶性单宁含量进行定量,单位为 mg/g 。

1.3.4 原花青素含量的测定

参考Prior等^[24]的方法,称取1 g莲子组织粉末,加入20 mL 100%甲醇,室温条件下超声30 min,搅拌1 h后于3 200 \times g离心10 min,收集上清液。取20 μL 样液,加入2 380 μL 甲醇、100 μL 现配的二甲基乙酰胺(dimethylacetamide, DMAC)试剂(3 mol/L H_2SO_4 溶液和甲醇配制的2% DMAC等体积混合),平衡20 min,于640 nm波长处测定吸光度。使用儿茶素制作的标准曲线(0、40、80、120、160、200 $\mu\text{g/mL}$)对原花青素含量进行定量,单位为 mg/g 。

1.3.5 电子舌检测

通过电子舌对新鲜莲子不同组织涩味强度进行测定。称取莲子不同组织粉末各1 g,分别加入50 mL蒸馏水,搅拌均匀,超声15 min后过滤。取15 mL滤液于进样烧杯中。所用智舌系统包含6个传感器,设置灵敏度为 1×10^{-5} ,测定总时长为156 s。每个样品重复测定3次,得不同样品的感官信息。

采用多个质量浓度的单宁酸(0.00、0.05、0.10、0.25、0.40、0.80、1.00、1.50、1.60、1.75、2.00、2.50、2.75、3.00、3.25、3.50 g/L)进行判别因子分析(dynamic factor analysis, DFA)建模,通过将样品感官信息导入模型对样品的涩味强度进行检验。

1.3.6 感官评价

参考王俊魁^[25]的方法。由12名身体健康的评审人员组成感官评审小组,年龄在20~24岁之间。评分采用7点制,0~7(0=没味道,7=味道最强),对莲子种皮、去种皮后莲肉、莲心进行涩味感官评定。各感官评审员独立评定,每评定一个样品,用清水漱口,间隔6 min后再品评下一个样品,每个样品重复3次,最后收集评分结果进行统计分析。

1.3.7 ANR活性的测定

使用植物ANR酶联免疫分析试剂盒对莲子不同组织中ANR活性进行测定。称取0.1 g莲子组织粉末,加入1 mL pH 7.4磷酸盐缓冲液,混匀,3 000 r/min离心20 min,收集上清液用于测定。

1.3.8 LAR活性的测定

使用植物LAR酶联免疫分析试剂盒对莲子不同组织中LAR活性进行测定。样品处理与1.3.7节相同。

1.3.9 总RNA提取及RNA检测

从-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出样品,用液氮研磨成粉末后,称取0.2 g于1.5 mL离心管中,然后按OminiPlant RNA Kit (DNase I)试剂盒说明书提取样品RNA。使用琼脂糖凝胶电泳检测RNA的质量及完整性,同时使用微量分光光度计检测RNA纯度。

1.3.10 cDNA第一链的合成

反转录具体操作流程参考HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)试剂盒说明书。

1.3.11 引物设计与适合性检验

ANR和LAR候选基因的序列分别从不同成熟度莲子转录组数据库和NCBI网站上获得,然后使用NCBI进行Primer-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),以上游引物和下游引物DNA溶解温度在70~90 $^{\circ}\text{C}$ 之间、GC比例55%、自身互补值不高于4、3'互补值不高于2为原则筛选引物,符合要求的引物委托杭州有康生物技术有限公司合成,引物序列见表1。

表1 候选基因引物设计序列信息

引物名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
<i>Actin</i>	TGATCGGAATGGAAGC	CAGCAATACCAGGGAAC
SnANR1	GGGGACAAAACAGACAGCAC	CTTTCAACCGATCACACCG
SnANR2	TCACCGGGTTTCTCATCTCT	ACGACTCTACACATGGGGCA
SnANR3	AATTCCCCAGCAGAGATGCC	CTCCTTTGTCTCGGAACGCT
SnANR4	TAGCCAGCTTACCTCATC	TCTGTCTCCGTCGAACACG
SnANR5	CCCACGAGTTGAATCAGCG	ATGAGACGCCTCACTGTCC
SnANR6	TTCGACGCTGCTATCTCAGG	CCATGACAAGACCTACGCCA
SnANR7	TGCGGGTATTACTGAGAGG	CACAAATGCTCGGACGGAGT
SnANR8	GAAGGAATCAGTGTGGGCA	TGAGGAGTAGATCGCCTTGG
SnANR9	GGTTCGGAAAAATTGACGGC	CGACCTTTCTTCAGTGTCTGC
SnLAR1	TCGGGCTTATCATGTTCGGT	ACGCCTTACCACCCTTCT
SnLAR2	CAGCTTGCTCTAGTTGAGGC	CACTCTCGATCAAGCGTCT
SnLAR3	CGCCGAGTGTACGAGGAAAA	AGTAGGCTTTCGTGTTCGCC

将莲子不同组织的cDNA混合,按照ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒说明书对引物进行验证,选择扩增曲线上升,溶解曲线单峰的引物进行下一步实验。

1.3.12 实时PCR(real-time PCR)扩增

real-time PCR扩增具体操作流程参考ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒说明书。

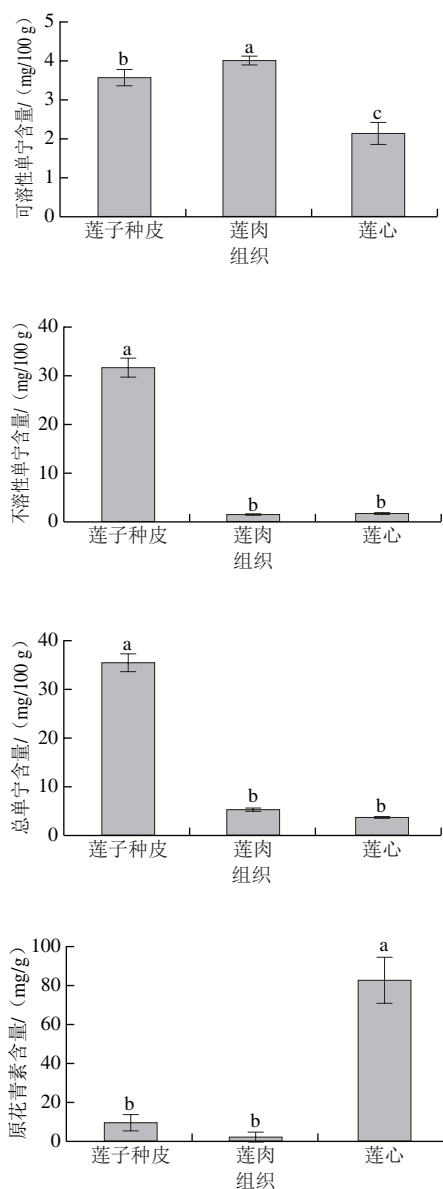
1.4 数据处理及分析

上述实验所得数据除特殊说明外,均重复3次。数据处理采用Excel软件,作图采用Excel、GraphPad Prism 8.0和SIMCA 14.1软件。采用SPSS Statistics 19软件进行单因素方差分析、主成分分析(principal component analysis, PCA)及Pearson相关性分析,采用Duncan检验进行显著性分析, $P<0.05$,差异显著。

2 结果与分析

2.1 莲子不同组织可溶性单宁、不溶性单宁、总单宁和原花青素含量分析

由图1可知, 莲子种皮、莲肉和莲心中可溶性单宁含量均较低, 其中莲心中可溶性单宁含量最低, 约 2 mg/100 g, 而莲肉中可溶性单宁含量较莲子种皮高。莲子种皮中不溶性单宁和总单宁的含量均最高, 超过 30 mg/100 g, 显著高于莲肉和莲心 ($P < 0.05$)。原花青素含量在莲心中最高, 超过 80 mg/g, 显著高于莲子种皮和莲肉 ($P < 0.05$)。

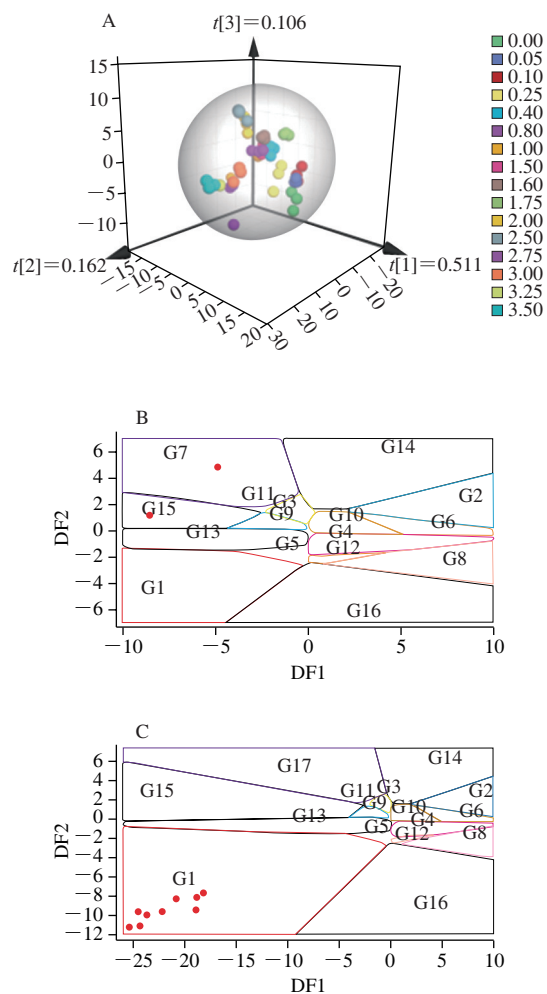


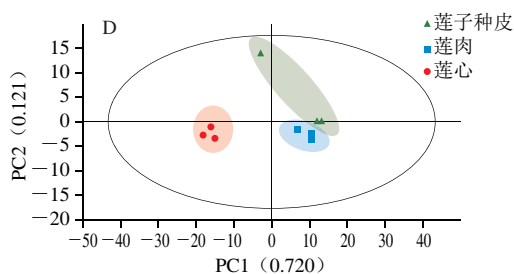
字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。图4、5同。

图1 莲子不同组织可溶性单宁、不溶性单宁、总单宁和原花青素含量
Fig. 1 Contents of soluble tannins, insoluble tannins, total tannins and proanthocyanidins in different tissues of lotus seeds

2.2 电子舌检测莲子不同组织涩味强度

由图2A可知, $t[1]=0.511$, $t[2]=0.162$, $t[3]=0.106$, 前3个PC的累计贡献率为77.9% (介于75%~85%), 区分程度 (discrimination index, DI) = 97.51, 表明电子舌可以有效区分不同质量浓度的单宁酸, 该组数据可用于DFA建模。图2B中不同颜色的区域通过建模得到, 未知样品的点落在哪个区域说明该样品的总体性质接近于所建模型样品。选择质量浓度分别为 1.75 g/L和0.05 g/L的单宁溶液进行模型检验, 发现两种质量浓度单宁溶液均位于对应区域, 表明该模型的准确性较高。由图2C可知, 莲子不同组织涩味强度较集中, 且均位于3.50 g/L单宁标准溶液区域内, 表明莲子不同组织总体性质接近3.50 g/L单宁标准溶液。如图2D所示, PC1和PC2的贡献率分别为72.0%和12.1%, 累计贡献率为84.05% (介于75%~85%), DI = 95.29 (大于80), 因此莲子种皮、莲肉、莲心的滋味具有明显差异, 且莲子种皮和莲心的滋味相近, 而莲肉滋味与其差异较大。





A. 单宁标准液的PCA; B. DFA模型质量检验结果; C. 莲子不同组织涩味强度结果; D. 莲子不同组织滋味差异结果。
G1~G16. 3.50、3.25、3.00、2.75、2.5、2.00、1.75、1.60、1.50、1.00、0.80、0.40、0.25、0.10、0.05、0.00 g/L。

图2 电子舌检测莲子不同组织涩味的PCA

Fig. 2 PCA of astringency in different tissues of lotus seeds detected by electronic tongue

2.3 莲子不同组织涩味强度的感官评价

如表2所示, 莲子种皮、莲肉和莲心的涩味感官评分均低于2.50, 表明莲子种皮、莲肉和莲心的涩味强度均较弱。其中莲肉的感官评分为 2.06 ± 0.31 , 莲子种皮的评分为 1.61 ± 0.19 , 莲心的评分则小于1.00, 表明莲肉的涩味强度较大, 其次为莲子种皮和莲心。

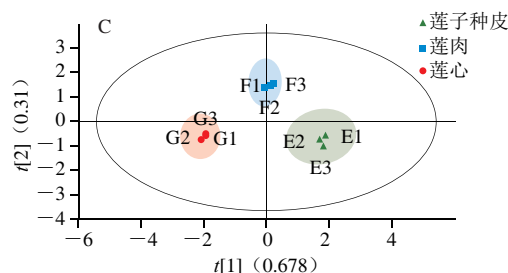
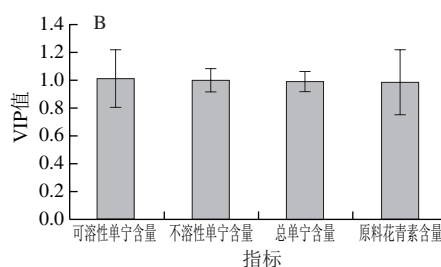
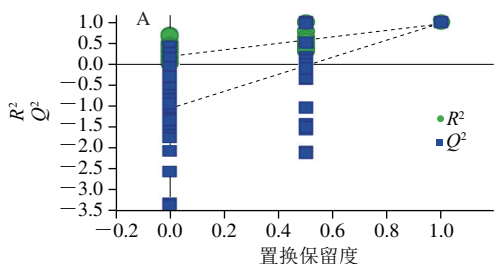
表2 不同莲子组织感官评分

Table 2 Sensory scores for astringency in different tissues of lotus seeds

组织	莲子种皮	莲肉	莲心
涩味强度感官评分	1.61 ± 0.19	2.06 ± 0.31	0.75 ± 0.21

2.4 莲子不同组织涩味关键贡献化合物筛选

以可溶性单宁、不溶性单宁、总单宁、原花青素含量为自变量 X , 以涩味感官评分为因变量 Y , 进行OPLS-DA。本次分析中自变量拟合指数(R_x^2)为1, 因变量拟合指数(R_y^2)为0.993, 模型预测指数(Q^2)为0.981, R^2 和 Q^2 超过0.5表示模型拟合结果可接受。如图3A所示, 经过200次置换检验, Q^2 回归线与纵轴的相交点小于零, 说明模型不存在过拟合, 模型检验有效, 该结果可用于筛选对莲子涩味有贡献的化合物。一般认为VIP值 >1 的化合物对涩味具有贡献, 且值越大贡献越大, 图3B显示, 可溶性单宁、不溶性单宁、总单宁均对莲子涩味有贡献, 其中可溶性单宁的贡献大于不溶性单宁和总单宁。由图3C可知, 两个PC累积贡献率为98.8% (大于75%~85%), 可以解释样品绝大部分信息, 根据可溶性单宁、不溶性单宁、总单宁和原花青素含量, 可将莲子种皮、莲肉和莲心区分开。



A. 判别模型; B. VIP柱状图; C. 得分图。

图3 莲子不同组织涩味物质和涩味强度的OPLS-DA

Fig. 3 OPLS-DA of astringent substances and astringent intensity in different tissues of lotus seeds

2.5 莲子不同组织涩味物质合成关键酶活性分析

ANR和LAR能将无色花青素、花青色素、花色苷、飞燕草素、无色飞燕草素催化形成原花青素。由图4可知, 莲心ANR和LAR活性最高, 分别为 173.50 ng/mL 和 24.70 ng/mL , 其次为莲肉和莲子种皮, 因此莲心中单宁的合成可能最旺盛, 而莲肉和莲子种皮中单宁合成能力次之。

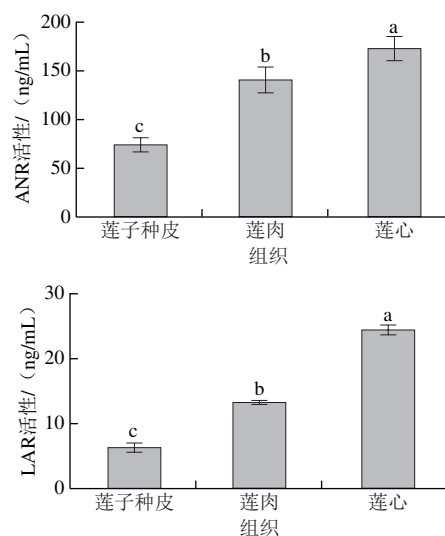


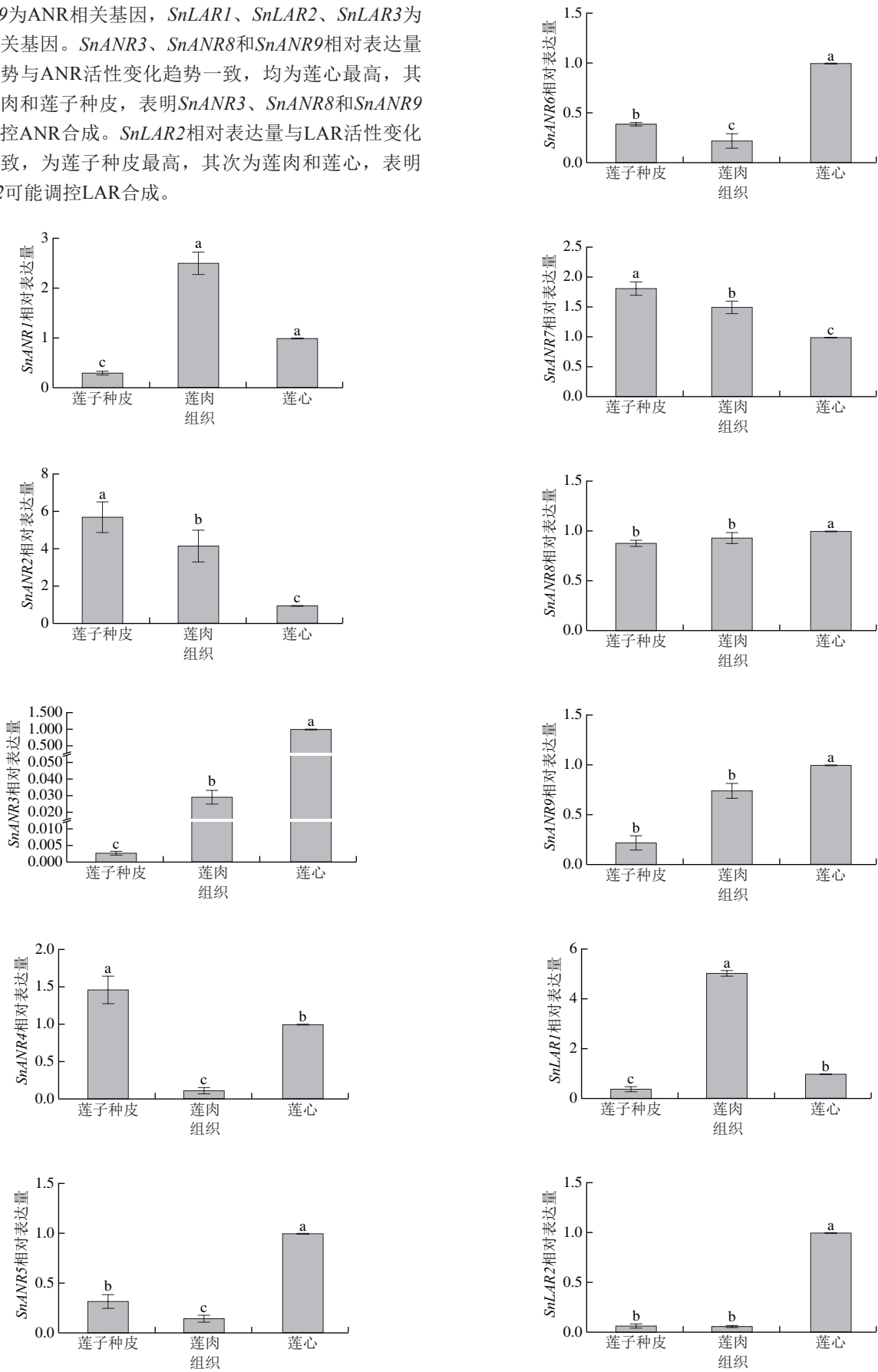
图4 莲子不同组织单宁合成关键酶活性

Fig. 4 Key enzyme activities involved in tannin synthesis in different tissues of lotus seeds

2.6 莲子不同组织涩味物质合成关键酶基因表达分析

如图5所示, $SnANR1$ 、 $SnANR2$ 、 $SnANR3$ 、 $SnANR4$ 、 $SnANR5$ 、 $SnANR6$ 、 $SnANR7$ 、 $SnANR8$ 、

*SnANR9*为ANR相关基因, *SnLAR1*、*SnLAR2*、*SnLAR3*为LAR相关基因。*SnANR3*、*SnANR8*和*SnANR9*相对表达量变化趋势与ANR活性变化趋势一致, 均为莲心最高, 其次为莲肉和莲子种皮, 表明*SnANR3*、*SnANR8*和*SnANR9*可能调控ANR合成。*SnLAR2*相对表达量与LAR活性变化趋势一致, 为莲子种皮最高, 其次为莲肉和莲心, 表明*SnLAR2*可能调控LAR合成。



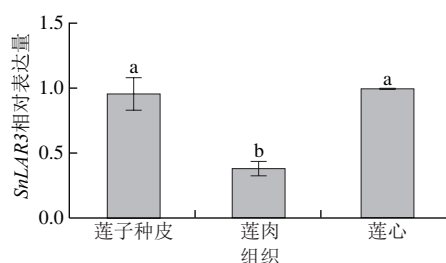


图5 莲子不同组织ANR和LAR相关基因相对表达量

Fig. 5 Relative expression of ANR and LAR genes in different tissues of lotus seeds

2.7 相关性分析

对可溶性单宁、不溶性单宁、总单宁和原花青素含量、ANR和LAR活性、*SnANR3*、*SnANR8*、*SnANR9*和*SnLAR2*的相对表达量进行相关性分析,结果如表3所示,涩味强度与ANR和*SnANR9*相对表达量相关系数为0.999,且呈显著相关,表明ANR是影响莲子涩味强度的关键酶,而*SnANR9*是影响莲子涩味物质合成的重要基因。

表3 涩味物质含量、单宁合成关键酶及基因间Pearson相关系数

Table 3 Pearson correlation coefficients among astringent substance contents, key enzymes and genes associated with tannin synthesis

指标	涩味强度	可溶性单宁	不溶性单宁	总单宁	原花青素	ANR	LAR	<i>SnANR3</i>	<i>SnANR8</i>	<i>SnANR9</i>	<i>SnLAR2</i>
涩味强度	1										
可溶性单宁	-0.619	1									
不溶性单宁	-0.930	0.288	1								
总单宁	-0.948	0.338	0.999*	1							
原花青素	0.724	-0.990	-0.420	-0.467	1						
ANR	0.999*	-0.583	-0.946	-0.962	0.691	1					
LAR	0.958	-0.819	-0.785	-0.816	0.892	0.943	1				
<i>SnANR3</i>	0.793	-0.970	-0.514	-0.558	0.994	0.764	0.935	1			
<i>SnANR8</i>	0.977	-0.774	-0.829	-0.857	0.855	0.966	0.997*	0.905	1		
<i>SnANR9</i>	0.999*	-0.587	-0.944	-0.960	0.695	1.000**	0.945	0.768	0.967	1	
<i>SnLAR2</i>	0.777	-0.976	-0.491	-0.536	0.997	0.747	0.925	1.000*	0.894	0.751	1

注: *在0.05水平(双侧)显著相关; **在0.01水平(双侧)显著相关。

3 讨论

以往对果蔬涩味研究较多^[14,26-30],其中大部分与柿子相关,鲜有莲子涩味的相关报道,涩味是影响消费者对鲜食莲子嗜好性的关键滋味。

本研究中,OPLS-DA表明不溶性单宁、可溶性单宁和总单宁均对莲子涩味有贡献,其中可溶性单宁含量对莲子涩味的贡献大于不溶性单宁和总单宁含量,这与李雪蕾^[6]及章志远^[31]等对麻竹笋的研究结果一致。可溶性单宁是引起涩味的主要物质^[13],其与口腔中的蛋白结合产生沉淀,引起口腔的皱缩和收敛感。莲子种皮中不溶性单宁和总单宁含量最高,但其涩味强度较小,表明不溶性单宁不呈涩味。Chen Wenxing等^[32]发现,不溶性单宁不呈涩味,将可溶性单宁转化为不溶性单宁(凝固效

应),可使柿子实现自然脱涩。罗晓文^[6]、张宝善^[7]等发现,含量为0.03%~0.1%的单宁不仅能使果实具有清凉口感,还能起到强化酸味的作用,而高于1%的单宁具有强烈涩味。本研究表明,莲子不同组织中可溶性单宁含量低于0.03%,而莲子种皮中总单宁含量为0.03%~0.1%,莲肉和莲心中总单宁含量低于0.03%,因此蜡熟期莲子中的单宁对其优良风味具有促进作用。

目前有使用SA402B电子舌检测不同滋味强度的报道^[33],而CTongue电子舌多用于不同样品滋味差异程度的测定^[34],鲜见使用CTongue电子舌对莲子涩味进行定量分析的研究。本研究使用CTongue电子舌对莲子种皮、去种皮后莲肉和莲心的涩味强度进行测定,发现所检测莲子组织信号值远大于不同浓度单宁标准液信号值,检测结果无法对莲子不同组织涩味进行区分,这是因为莲子中其他化学物质的信号值较大,影响莲子涩味物质的检测,表明CTongue电子舌不适用于莲子涩味的测定。

对莲子不同组织中ANR和LAR活性进行分析,发现莲心中这两种酶活性最大,表明莲心中单宁合成较莲子种皮和果肉旺盛,但总单宁则是莲子种皮中含量最高,约占完整莲子籽粒的60%,可能是因为莲心中单宁代谢远旺盛于莲子种皮。这与蚕豆相似,研究发现完整蚕豆籽粒单宁含量的60%~90%集中于种皮^[35]。

4 结论

本研究测定了新鲜莲子种皮、去种皮后莲肉和莲心中可溶性单宁、不溶性单宁和原花青素含量,结合感官评价和电子舌检测,通过OPLS-DA和相关性分析明确了导致莲子涩味的主要物质,以及对莲子涩味有重要影响的酶和基因。结果表明:引起莲子涩味的主要物质为可溶性单宁;蜡熟期莲子中的单宁对其优良风味形成具有正向作用;ANR是影响莲子涩味强度的关键酶,*SnANR9*是影响莲子涩味物质合成的重要基因。

参考文献:

- ZHU F. Structures, properties, and applications of lotus starches[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 63: 332-348. DOI:10.1016/j.foodhyd.2016.08.034.
- 杨银爱,韩延超,牛犇,等.不同成熟度莲子鲜食品质评价[J].食品科学,2022,43(15):44-51. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220301-014.
- ASHOK P K, UPADHYAYA K. Tannins are astringent[J]. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2012, 1(3): 45-50.
- BATE-SMITH E C. Flavonoid compounds in foods[J]. Advances in Food Research, 1954, 5: 261-300. DOI:10.1016/S0065-2628(08)60224-4.
- 张亮亮,汪咏梅,徐曼,等.植物单宁化学结构分析方法研究进展[J].林产化学与工业,2012,32(3):107-116.
- 罗晓文,刘敏,齐晓花,等.果实涩味分子研究进展[J].分子植物育种,2013(5):647-656. DOI:10.3969/mpb.011.000647.

- [7] 张宝善. 水果的涩味研究[J]. 食品研究与开发, 1998(1): 31-34.
- [8] KOLECKAR V, KUBIKOVA K, REHAKOVA Z, et al. Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health[J]. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2008, 8(5): 436-447. DOI:10.2174/138955708784223486.
- [9] GONZALO-DIAGO A, DIZY M, FERNÁNDEZ-ZURBANO P. Taste and mouthfeel properties of red wines proanthocyanidins and their relation to the chemical composition[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(37): 8861-8870. DOI:10.1021/jf401041q.
- [10] HASLAM E. Vegetable tannins-lessons of a phytochemical lifetime[J]. Phytochemistry, 2007, 68: 2713-2721. DOI:10.1016/j.phytochem.2007.09.009.
- [11] MASCI A, COCCIA A, LENDARO E, et al. Evaluation of different extraction methods from pomegranate whole fruit or peels and the antioxidant and antiproliferative activity of the polyphenolic fraction[J]. Food Chemistry, 2016, 202: 59-69. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.01.106.
- [12] TAKUO O, HIDEYUKI I. Tannins of constant structure in medicinal and food plants-hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins[J]. Molecules, 2011, 16(3): 2191-2217. DOI:10.3390/molecules16032191.
- [13] YONEMORI K, MATSUSHIMA J, SUGIURA A. Differences in tannins of non-astringent and astringent type fruits of japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.)[J]. Engei Gakkai Zasshi, 2007, 52(2): 135-144. DOI:10.2503/jjshs.52.135.
- [14] 章志远, 丁兴萃, 崔逢欣, 等. 感官评定方法确定麻竹笋苦涩味物质成分及与口感的关系[J]. 食品科学, 2017, 38(5): 167-173. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201705027.
- [15] 陈锦永, 靳路真, 程大伟, 等. 水果涩味研究进展[J]. 果树学报, 2016, 33(12): 1556-1566. DOI:10.13925/j.cnki.gsxh.20160275.
- [16] 李雪蕾, 丁兴萃, 张闪闪, 等. 不同光强下麻竹笋不同部位苦涩味物质含量的变化[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2015(3): 161-166. DOI:10.3969/j.issn.1000-2006.2015.03.029.
- [17] YUAN L, WANG L J, HAN Z J, et al. Molecular cloning and characterization of *PtrLAR3*, a gene encoding leucoanthocyanidin reductase from *Populus trichocarpa*, and its constitutive expression enhances fungal resistance in transgenic plants[J]. Journal of experimental botany, 2012, 63(7): 2513-2524. DOI:10.1093/jxb/err425.
- [18] 李军, 梁燕梅, 赵爱春, 等. 桑树花青素还原酶基因MaANR的克隆和表达分析[J]. 蚕业科学, 2016, 42(4): 570-575. DOI:10.13441/j.cnki.cykx.2016.04.002.
- [19] 许丽宾. 不同成熟期莲子品质特性的研究与应用[D]. 福州: 福建农林大学, 2015: 9.
- [20] BUBBA M D, GIORDANI E, PIPPUCCI L, et al. Changes in tannins, ascorbic acid and sugar content in astringent persimmons during on-tree growth and ripening and in response to different postharvest treatments[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2009, 22: 668-677. DOI:10.1016/j.jfca.2009.02.015.
- [21] TABIBUL I M, BOK-RYE L, SANG-HYUN P, et al. Cultivar variation in hormonal balance is a significant determinant of disease susceptibility to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica napus*[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 2121-2133. DOI:10.3389/fpls.2017.02121.
- [22] RUTH B A, LILLIAN S. Temperature affects astringency removal and recurrence in persimmon[J]. Journal of Food Science, 1993, 58(6): 1397-1400. DOI:10.1111/j.1365-2621.1993.tb06191.x.
- [23] RONALD L P, ELLEN F, HONGPING J, et al. Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2010, 90(9): 1473-1478. DOI:10.1002/jsfa.3966.
- [24] PRIOR R L, FAN E, JI H P, et al. Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(9): 1473-1478. DOI:10.1002/jsfa.3966.
- [25] 王俊魁. 结合感官评价与指纹图谱技术开发沙葱酱制品[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
- [26] 张初翼, 王明清, 于丽娜, 等. 单宁酶对花生衣提取液涩味脱除及滋味品质改善研究[J]. 花生学报, 2021, 50(2): 50-56. DOI:10.14001/j.issn.1002-4093.2021.02.009.
- [27] 黄海娜, 程大伟, 顾红, 等. GA3和TDZ对‘巨玫瑰’葡萄果皮涩味的影响[J]. 中国农业科技导报, 2019, 21(2): 120-132. DOI:10.13304/j.nykjdb.2018.0210.
- [28] 程大伟, 陈锦永, 顾红, 等. GA3与TDZ组合对巨玫瑰葡萄果实理化指标和苦涩味物质含量的影响[J]. 南方农业学报, 2018, 49(5): 922-929. DOI:10.3969/j.issn.2095-1191.2018.05.14.
- [29] 李露双. 避光对麻竹笋苦涩味物质含量及其关键基因表达的影响[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2018: 10.
- [30] 李雪蕾. 光照强度对三种竹笋不同部位苦涩味物质的影响[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2014. DOI:10.7666/d.Y2630041.
- [31] 章志远, 丁兴萃, 崔逢欣, 等. 感官评定方法确定麻竹笋苦涩味物质成分及与口感的关系[J]. 食品科学, 2017, 38(5): 167-173. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201705027.
- [32] CHEN W X, XIONG Y L, XU L Q, et al. An integrated analysis based on transcriptome and proteome reveals deastringency-related genes in *CPCNA* persimmon[J]. Scientific Report, 2017, 7: 44671. DOI:10.1038/srep44671.
- [33] 邓雯婷, 李加兴, 郑建仙. 具有甜味抑制作用的2-(4-甲氧基苯氧基)丙酸衍生物的构效关系[J]. 食品科学, 2021, 42(23): 11-17. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20201220-226.
- [34] CHEN Z Q, FANG X J, WU W J, et al. Effects of fermentation with *Lactiplantibacillus plantarum* GDM1.191 on the umami compounds in shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*)[J]. Food Chemistry, 2021, 364: 130398. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.130398.
- [35] 赵京音. 蚕豆种皮的发育生物学I.种皮干物质和单宁的动态变化[J]. 上海农学院学报, 1988(3): 199-204; 198.