

Original article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2020-43-10>

УДК 535.372:577.336

ФЛУОРЕСЦЕНТНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОВЕРХНЕВИХ ТКАНИН ЯБЛУК РІЗНИХ СОРТІВ В ЗЕЛЕНІЙ ОБЛАСТІ СПЕКТРУ

С.В. Кривець, Я.П. Лазоренко, В.П. Мицай, С.О. Мамілов

*Інститут прикладних проблем фізики і біофізики Національної академії наук України,
вул. Василя Степанченка, 3, м. Київ, 03142, Україна*

e-mail: resega@ukr.net

Надійшла до редакції 6 вересня 2019 р.

Прийнята до друку 10 лютого 2020 р.

Актуальність. Традиційні методики визначення вмісту та складу корисних речовин у плодах досить трудомісткі та матеріалоемні, потребують подрібнення та спеціальної обробки біологічного матеріалу. Флуоресцентний метод є одним із найбільш сучасних і перспективних, він дозволяє визначати важливі фізіологічні та метаболічні параметри, не порушуючи цілісність рослинних тканин. Тому виявлення закономірностей та причин відмінностей флуоресцентних властивостей плодів яблуні різних сортів є актуальною задачею, яка дозволить вирішити проблему неінвазивного визначення складу і вмісту корисних речовин у плодах.

Мета роботи — визначення флуоресцентних характеристик поверхневих тканин яблук сортів з різним забарвленням екзокарпії у зеленій області спектру флуоресценції.

Матеріали і методи. Об'єкт дослідження — яблука чотирьох популярних зимових сортів, близьких за строками дозрівання, що мають різне забарвлення екзокарпії. Застосовано метод флуоресцентної спектроскопії поверхневих тканин яблук при збудженні напівпровідниковим лазером з довжиною хвилі 405 нм та потужністю 36 мВт, що працював у безперервному режимі. Забарвлення яблук визначено як координата *a* системи відображення кольорів CIELAB.

Результати. Виявлено, що у зеленій області спектру флуоресценції поверхневих тканин у різних сортів яблук довжина хвилі максимуму відрізняється приблизно на 8–18 нм. В той же час різниця довжин хвиль максимуму в червоній області спектру для різних сортів яблук не перевищує 5 нм. Виявлено, що довжина хвилі максимуму флуоресценції в зеленій області спектру відрізняється у різних сортів відповідно до забарвлення екзокарпії. Якщо у забарвленні екзокарпії переважає зелений колір, то максимум флуоресценції в зеленій області має більшу довжину хвилі, а якщо у забарвленні екзокарпії переважає червоний — меншу. Довжина хвилі у яблук з жовтим забарвленням екзокарпії займає проміжну позицію.

Висновки. Пігментний склад поверхневих тканин яблук впливає на їх флуоресценцію в зеленій області спектру. Причинами відмінностей довжини хвилі максимуму флуоресценції у зеленій області спектру можуть бути варіативність складу флавонолів в залежності від сорту яблук та поглинання флуоресцентного випромінювання червоними пігментами.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: флуоресценція; екзокарпій; яблука; флавоноли.

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ПОВЕРХНОСТНЫХ ТКАНЕЙ ЯБЛОК РАЗНЫХ СОРТОВ В ЗЕЛЕННОЙ ОБЛАСТИ СПЕКТРА

С.В. Кривец, Я.П. Лазоренко, В.П. Мицай, С.А. Мамілов

*Інститут прикладних проблем фізики і біофізики Національної академії наук України,
ул. Василя Степанченка, 3, г. Киев, 03142, Украина*

Актуальность. Традиционные методики определения содержания и состава полезных веществ в плодах достаточно трудоемкие и материалоемкие, требуют измельчения и специальной обработки биологического материала. Флуоресцентный метод является одним из самых современных и перспективных, он позволяет определять важные физиологические и метаболические параметры, не нарушая целостность растительных тканей. Поэтому выявление закономерностей и причин различий флуоресцентных свойств плодов яблони разных сортов является актуальной задачей, которая позволит решить проблему неинвазивного определения состава и содержания полезных веществ в плодах.

Цель работы — определение флуоресцентных характеристик поверхностных тканей яблок сортов с разной окраской экзокарпия в зеленой области спектра флуоресценции.

Материалы и методы. Объект исследования — яблоки четырех популярных зимних сортов, близких по срокам созревания, имеющих различную окраску экзокарпия. Применен метод флуоресцентной спектроскопии поверхностных тканей яблок при возбуждении полупроводниковым лазером с длиной волны 405 нм и мощностью 36 мВт, работавшим в непрерывном режиме. Окраска яблок определена как координата *a* системы отображения цветов CIELAB.

Результаты. Обнаружено, что длина волны максимума в зеленой области спектра флуоресценции поверхностных тканей у разных сортов яблок отличается примерно на 8–18 нм. В то же время разница длин волн максимума в красной области спектра для разных сортов яблок не превышает 5 нм. Обнаружено, что длина волны максимума флуоресценции в зеленой области спектра отличается у разных сортов в соответствии с окраской экзокарпия. Если в окраске экзокарпия преобладает зеленый цвет, то максимум флуоресценции в зеленой области имеет большую длину волны, а если в окраске экзокарпия преобладает красный — меньшую. Длина волны у яблок с желтой окраской экзокарпия занимает промежуточную позицию.

Выводы. Пигментный состав поверхностных тканей яблок влияет на их флуоресценцию в зеленой области спектра. Причинами отличий длины волны максимума флуоресценции в зеленой области спектра может быть вариативность состава флавонолов в зависимости от сорта яблок и влияние красных пигментов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: флуоресценция; экзокарпий; яблоки; флавонолы.

FLUORESCENT PROPERTIES OF SURFACE TISSUES OF APPLES OF DIFFERENT VARIETIES IN THE GREEN AREA OF SPECTRUM

S.V. Kryvets, Ya.P. Lazorenko, V.P. Mitsai, S.O. Mamilov

*Institute of Applied Problems of Physics and Biophysics of the National Academy of Science of Ukraine,
3 Vasilya Stepanchenka Str., Kyiv, 03142, Ukraine*

Background: Traditional methods of the content and composition of fruits nutrients determining are labor-intensive and material-intensive, require grinding and special processing of biological material. The fluorescent method is one of the most modern and promising. It allows determining physiological and metabolic parameters without plant tissues destruction. Therefore, the patterns and causes of differences identification of the different apple varieties fluorescent properties is an important task, which will solve the problem of non-invasive determination of the composition and content of useful substances in fruits.

Objectives: The determination of the surface tissues fluorescent properties in the green area of the fluorescence spectrum of apple varieties with different coloring of exocarp is the purpose of the work.

Materials and methods: The object of the study is apples of four popular winter varieties, close in maturity, with different coloring of exocarp. The method of fluorescence spectroscopy of the apples surface tissues was used. The excitation was made by a semiconductor laser with a wavelength of 405 nm and a power of 36 mW, operating in a continuous mode. The apples coloring is defined as the coordinate *a* of the CIELAB color mapping system.

Results: It was found that the wavelength of the maximum in the green area of the fluorescence spectrum of different apple varieties surface tissues differs by approximately 8–18 nm. At the same time, the difference of wavelengths of the maximum in the red area for different apple varieties does not exceed 5 nm. It was found that wavelength of the maximum in the green area of the fluorescence spectrum differs in different varieties in accordance with the coloring of the exocarp. If green color prevails in the exocarp coloring the fluorescence maximum in the green area has a longer wavelength, and if red prevails it has a shorter wavelength, while if yellow prevails, the wavelength occupies an intermediate position.

Conclusions: The pigment composition of the surface tissues of apples affects on their fluorescence in the green area of the spectrum. Possible reasons for the differences of the maximum wavelength in the green area of the fluorescence spectrum are the variability of flavonols composition depending on the apple variety and the influence of red pigments.

KEY WORDS: fluorescence; exocarp; apples; flavonols.

Традиційні методики визначення вмісту та складу корисних речовин у плодах досить трудомісткі та матеріалоємні, потребують подрібнення та спеціальної обробки біологічного матеріалу [1]. Дослідження флуоресценції рослин є однією із найбільш

сучасних і перспективних методик, яка дозволяє не порушуючи цілісність рослинних тканин визначати важливі фізіологічні та метаболічні параметри.

Досить широке застосування знайшли показники флуоресценції рослин з максимумами у червоній (~680 нм) та дальній червоній (~730 нм) областях спектру, які відповідають хлорофілу *a* фотосистеми II та фотосистеми I відповідно [2]. Ці показники використовують для оцінки кількості хлорофілу в тканинах та його фотохімічної активності, що дозволяє оцінити стан рослин та вплив на них різних стресових факторів [3].

Дослідження останніх десятиліть показали, що для тканин багатьох видів рослин, окрім максимумів в червоній та дальній червоній області, характерні також максимуми у синій (~440 нм) та зеленій (~520 нм) областях спектру флуоресценції [4, 5]. З флуоресценцією в зеленій області спектру пов'язують флавоноли [5]. Зокрема в роботі Е.А. Ягольник з співавторами [6] показано, що кверцетин при збудженні на 370 нм має максимум інтенсивності у спектрі флуоресценції на 545 нм, проте довжина хвилі його максимуму може бути зміщена в залежності від властивостей середовища. Флавоноли мають виражені антиоксидантні, антирадикальні, ангіопротекторні властивості [7]. Тому визначення складу та вмісту флавонолів у рослинних плодах має значне практичне значення. Крім флавонолів за даними Н.К. Lichtenthaler з співавторами [8] значний вклад у синьо-зелену флуоресценцію рослин можуть вносити коричні кислоти, які містяться в клітинних стінках. На флуоресценцію плодів в даній області спектру можуть впливати також антоціани, які формують червоний рум'янець на стороні плодів, що була більше освітлена сонцем, вони мають смуги поглинання як в ультрафіолетовій, так і у видимій області спектру, і частково поглинають як збуджуюче випромінювання, так і флуоресцентний сигнал синьо-зеленої області спектру [9].

Яблука є одним із найбільш популярних рослинних продуктів як в Україні, так і у багатьох країнах Європи та США. Харчова цінність яблук визначається високим вмістом у тканинах плодів, насамперед у екзокарпії, поліфенолів, яких нараховують більше двадцяти, при чому в недозрілих плодах переважають катехіни, лейкоантоціаніди та хлорогенова кислота, а в дозрілих плодах переважають більш окислені форми — флавоноли [10]. За даними Е.И. Тарун з співавторами [11] до складу яблучного соку входять такі флавоноли як рутин, кверцетин та епікатехін. За даними О.В. Перфілової з співавторами [12] тканини яблук містять до 7,2 мг кверцетину та до 10 мг антоціанідів на 100 г.

Оскільки за складом і вмістом флавонолів, антоціанів та коричних кислот різні сорти яблук можуть відрізнятися [13], це може впливати на флуоресцентні характеристики плодів. Дослідження оптичних властивостей тканин яблук останніх років показали наявність флуоресценції в синьо-зеленій області. С.А. Родіковим з співавторами [14] при збудженні на довжині хвилі ~350 нм поверхневих тканин яблук сорту Антонівка звичайна отримано максимум флуоресценції в області 400–410 нм з плавним зниженням до 670 нм. При цьому виявлено, що плоди флуоресціюють у більшій мірі на тіньовому боці. Пізніше в інших дослідженнях авторами було отримано два максимуми на 550 нм і 630 нм [14]. Н.К. Lichtenthaler з співавторами [9] при дослідженні сорту яблук Бребурн показали, що при збудженні ксеноновою лампою в області 280–400 нм в поверхневих тканинах яблук спостерігаються максимуми флуоресценції на 440 нм та 520 нм. При цьому інтенсивність флуоресценції на цих довжинах хвиль збільшується при зберіганні яблук протягом шести місяців. М.С. Kim з співавторами [15] також виявили флуоресценцію яблук сорту Голден Делішес у синьо-зеленій області спектру на довжинах хвиль 460 нм та 530 нм. При цьому у дозрілих плодів максимуми у синій і червоній області по відношенню до максимуму у зеленій

області є нижчими ніж у недозрілих. Таким чином у різних дослідженнях отримано дещо відмінні результати щодо довжини хвилі максимуму флуоресценції яблук в зеленій області спектру. Закономірності та причини відмінностей флуоресценції яблук різних сортів у зеленій області спектру потребують подальшого вивчення.

Метою роботи є визначення флуоресцентних характеристик поверхневих тканин у зеленій області спектру флуоресценції для сортів яблук з різним забарвленням екзокарпю. Використання оптичних вимірювань має на меті розробку неінвазивного методу моніторингу деградації корисних речовин у плодах рослин при тривалому зберіганні.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Об'єктом дослідження були яблука чотирьох популярних зимових сортів, що мали різне забарвлення екзокарпю. Сорт Ренет Симиренко мав зелене забарвлення, Голден Делішес — жовте, Айдаред — світло-зелене з малиновим рум'янцем, Флоріна — зеленувато-жовте з вираженим малиновим рум'янцем. Для дослідження відбиралось по 7–8 яблук кожного сорту. Всі яблука мали щільну гладку поверхню і однакову ступінь стиглості. Для характеристики забарвлення яблук кожного сорту з поверхні кожного плода було зроблено по дванадцять цифрових фотографій за допомогою веб-камери Mustek Wcam 300 при незмінних налаштуваннях камери та незмінному освітленні поверхні зразків. Після цього колір на кожній фотографії усереднювався за допомогою фільтру Average програми Adobe Photoshop CS4 і визначалась координата a системи відображення кольорів CIELAB, яка показує положення кольору в діапазоні від зеленого до червоного. Отримані дані усереднювались для кожного сорту, визначалось середнє арифметичне та довірчий інтервал з рівнем значимості $p \leq 0,05$.

Спектри флуоресценції поверхневих тканин яблук реєструвались за допомогою установки на основі флуоресцентного спектрометра SL40-2 з оптоволоконним входом та світлочутливою матрицею TCD1304, яка дозволяла реєструвати спектр в діапазоні 450–800 нм (Рис. 1). Промінь напівпровідникового лазера (1) з довжиною хвилі 405 нм та

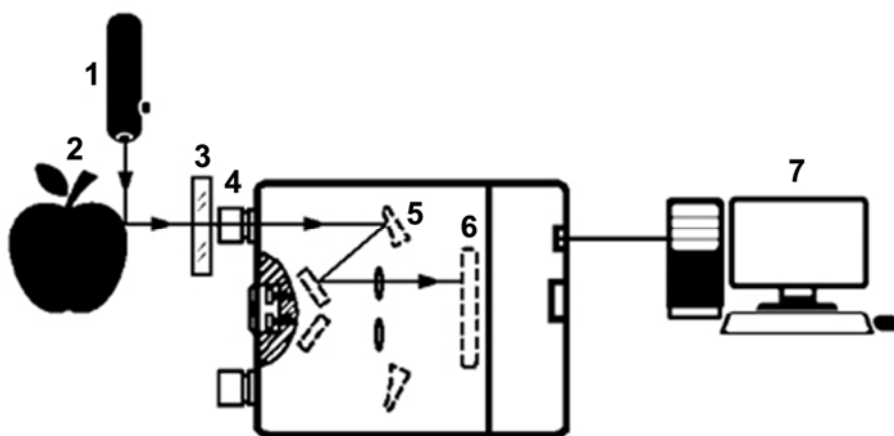


Рис. 1. Схема установки на основі флуоресцентного спектрометра SL40-2: 1 — напівпровідниковий лазер 405 нм, 2 — зразок яблука, 3 — світлофільтр GVK48, 4 — оптоволоконний вхід SL40-2, 5 — монохроматор, 6 — світлочутлива матриця TCD1304, 7 — персональний комп'ютер.

потужністю 36 мВт, що працював у безперервному режимі, направлявся на поверхню зразка яблука (2) по дотичній. Для відсікання збуджуючого випромінювання між оптоволоконним входом та поверхнею яблука розміщувався світлофільтр GVK48 (3) з областю пропускання 455 нм і вище. Флуоресцентний сигнал від зразка яблука через оптоволоконний вхід (4) флуоресцентного спектрометра SL40-2 передавався на

монохроматор (5), а потім на світлочутливу матрицю (6). Отримані спектри передавалися на персональний комп'ютер (7) для подальшої обробки. Спектри флуоресценції реєструвалися по чергово у дев'яти точках поверхні кожного яблука по колу, через кожні 40° , з кількаразовим повторенням.

Для згладжування стохастичних шумів у спектрах використовувався фільтр Савіцького-Голея з поліномом шостого степеня та усереднюючим інтервалом у 199 значень, який дозволяв мінімізувати викривлення амплітуд спектральних піків при згладжуванні. Після цього визначались довжини хвиль максимумів флуоресценції у зеленій (500–565 нм) та червоній (625–710 нм) областях спектрів у нанометрах. Для усунення із вибірки можливих артефактів застосовувався критерій трьох σ для набору значень кожного окремого зразка яблук. Отримані значення усереднювались для кожного сорту, визначалось середнє арифметичне та довірчий інтервал з рівнем значимості $p \leq 0,05$. Для обробки результатів використано програми OriginPro 8 та Microsoft Office Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

На рисунку наведено типові спектри флуоресценції поверхневих тканин яблук чотирьох сортів при збудженні напівпровідниковим лазером на 405 нм (Рис. 2). На спектрах усіх зразків яблук простежувалось два більш виражені піки з максимумами у зеленій (max 1) та у червоній області (max 2), а також менш виражений пік з максимумом у далекій червоній області (max 3).

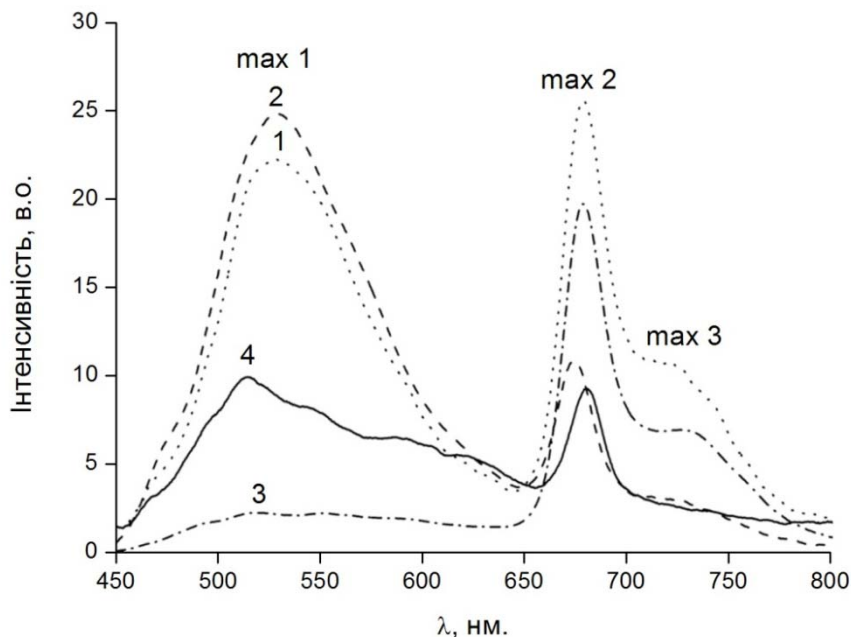


Рис. 2. Типові спектри флуоресценції поверхневих тканин яблук чотирьох сортів при збудженні напівпровідниковим лазером на 405 нм: 1 — Ренет Симиренко, 2 — Голден Делішес, 3 — Айдаред, 4 — Флоріна, max 1 — максимум у зеленій області спектру, max 2 — максимум у червоній області спектру, max 3 — максимум у далекій червоній області спектру.

Статистичний аналіз набору спектрів показав, що довжини хвиль максимумів флуоресценції поверхневих тканин у різних сортів яблук відрізняються. Різниця довжин хвиль максимуму флуоресценції в зеленій області спектру мала різні значення, від ~ 8 нм для сортів Айдаред і Флоріна до ~ 18 нм для сортів Ренет Симиренко і Флоріна. В той же час різниця довжин хвиль максимуму в червоній області спектру для різних сортів яблук не перевищувала 5 нм.

Виявлено, що довжина хвилі максимуму флуоресценції в зеленій області спектру відрізняється у різних сортів відповідно до забарвлення екзокарпію. Якщо у забарвленні екзокарпія переважав зелений колір, то максимум флуоресценції в зеленій

області мав більшу довжину хвилі, а якщо у кольорі екзокарпії переважав червоний — меншу, у яблук з жовтим кольором екзокарпії довжина хвилі займала проміжну позицію (Рис. 3).

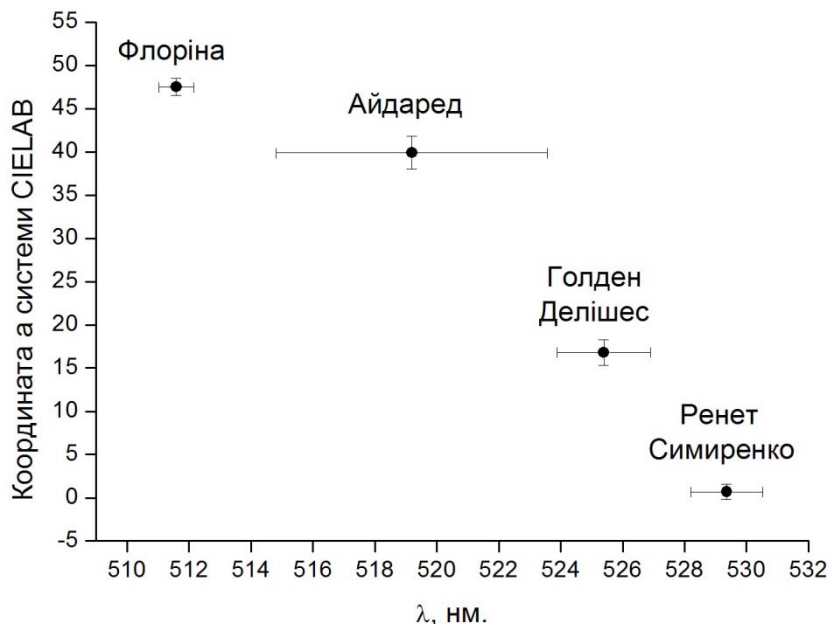


Рис. 3. Довжини хвиль флуоресценції у зеленій області спектру поверхневих тканин яблук чотирьох сортів різного кольору при збудженні лазером на 405 нм ($p \leq 0,05$).

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що пігменти, які формують забарвлення яблук, впливають на довжину хвилі максимуму флуоресценції поверхневих тканин яблук в зеленій області. За літературними даними серед пігментів джерелом зеленої флуоресценції можуть бути деякі флавоноли, а також можливий вплив ряду пігментів на флуоресценцію інших речовин у зеленій області спектру. Зокрема, частина флуоресцентного сигналу може поглинатися червоними пігментами, які мають смуги поглинання в синьо-зеленій області спектру, що також може призвести до зміщення довжини хвилі максимуму в зеленій області спектру флуоресценції. Тому вірогідною причиною відмінності довжини хвилі максимуму в зеленій області флуоресценції може бути різний склад флавонолів та інших пігментів у різних сортів яблук. З'ясування більш точних причин знайденої закономірності потребує подальших досліджень.

ВИСНОВКИ

В результаті проведених досліджень виявлено залежність між забарвленням екзокарпії яблук та довжиною хвилі максимуму в зеленій області спектру флуоресценції, що дозволяє зробити висновок про вплив пігментного складу плодів на їх флуоресценцію в зеленій області спектру. Вірогідними причинами знайденої залежності є варіативність складу флавонолів в залежності від сорту яблук та поглинання флуоресцентного випромінювання червоними пігментами.


ПОДЯКА

Робота виконана в рамках НДР Національної академії наук України «Дослідження спектрально залежних процесів та засобів візуалізації і морфометрії поверхні біологічних об'єктів».

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

Authors' ORCID ID

S.V. Kryvets  <https://orcid.org/0000-0002-1511-7995>
 Ya.P. Lazorenko  <https://orcid.org/0000-0003-2925-3338>
 V.P. Mitsai  <https://orcid.org/0000-0002-0730-0853>
 S.O. Mamilov  <https://orcid.org/0000-0002-0175-7019>

REFERENCES

1. Sinyutina SE, Romantsova SV, Savelyeva VYu. Extraction of flavonoides from plant material and study of their antioxidant properties. Tambov University Reports. Series: Natural and Technical Sciences. 2011;16(1):345–7. Available from: <http://journals.tsutmb.ru/a8/upload/2018-december/temp.aed4b5ec6fb6a11c593eac7166b89c5a.pdf> (In Russian)
2. Lysenko VS, Varduni TV, Soier VG, Krasnov VP. Plant chlorophyll fluorescence as an environmental stress characteristic: a theoretical basis of the method application. Fundamental research. 2013;(4):112–20. Available from: <https://www.fundamental-research.ru/en/article/view?id=31109> (In Russian)
3. Fedotov YuV, Bullo OA, Belov ML, Gorodnichev VA. Experimental research into laser method for detecting plant stress. Herald of the Bauman Moscow State Technical University. Series Instrument Engineering. 2017;(2):21–32. <http://doi.org/10.18698/0236-3933-2017-2-21-32> (In Russian)
4. Buschmann C, Langsdorf G, Lichtenthaler HK. Imaging of the blue green and red fluorescence emission of plants: An overview. Photosynthetica. 2000;38(4):483–91. <https://doi.org/10.1023/A:1012440903014>
5. Lideker W, Ginther K, Dahn HG, inventors; Deutsches Zentrum fur Luft-und Raumfahrt E.V., assignee. Fluorescence detection assembly for determination of significant vegetation parameters. United States patent US 6563122. 2003 May 13. <https://doi.org/10.1023/A:1012440903014>
6. Yagolnik EA, Muzafarov EN, Kim YuA, Tarahovsky YuS. The interaction of flavonol quercetin with collagen. Izvestiya TulGU. 2015;(2):121–32. Available from: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2000025114> (In Russian)
7. Bondariuk EV, Senchuk VV. The study of flavonols and their interaction with serum albumin by fluorescence analysis. Vestnik of Belarusian State University. Ser. 2, Chemistry. Biology. Geography. 2006;2(1):27–30. Available from: <https://elib.bsu.by/bitstream/123456789/22406/1/27-30.pdf> (In Russian)
8. Lichtenthaler HK, Schweiger J. Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. Journal of Plant Physiology. 1998;152(2-3):272–82. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(98\)80142-9](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(98)80142-9)
9. Lichtenthaler HK, Langsdorf G, Buschmann C. Multicolor fluorescence images and fluorescence ratio images of green apples at harvest and during storage. Israel Journal of Plant Sciences. 2012;60:97–106. <https://doi.org/10.1560/ijps.60.1-2.97>
10. Moskaliuk IV. The determination of jellying capacity of pectin substances of active peroxidase. Odes'kyi Politechnichnyi Universytet. Pratsi. 2009;1(31):177–9. Available from: <http://pratsi.opu.ua/app/webroot/articles/1312459824.pdf> (In Russian)
11. Tarun EI, Chudnovskaia EV. Inhibition of reactions of free radicals in the fenton system under the influence of flavonoids. Proceedings of Belarusian State University Physiological, biochemical and molecular basis for the functioning of biosystems. 2014;9(1):114–21. Available from: <https://elib.bsu.by/bitstream/123456789/121737/1/114-121.pdf> (In Russian)
12. Perfilova OV, Skripnikov YuG. Powder from fruit and vegetable cakes. Bulletin of Michurinsk State Agrarian University. 2006;(2):61–63. Available from: http://www.mgau.ru/sciense/journal/PDF_files/Vestnik_2_2006.pdf (In Russian)
13. Makarova NV, Valiulina DF, Bakharev VV. Use of summer varieties of apples as an antioxidant. Food Processing: Techniques and Technology. 2012;(2):70–5. Available from: <http://fptt.ru/stories/archive/25/16.pdf> (In Russian)
14. Rodikov SA. Chlorophyll fluorescence of fruit skin in blue and red ranges of spectrum. Bulletin of Michurinsk State Agrarian University. 2011;2(2):66–72. Available from: http://www.mgau.ru/sciense/journal/PDF_files/Vestnik_2_2011_2.pdf (In Russian)
15. Kim MS, Chen Y-R, Cho B-K, Chao K, Yang C-C, Lefcourt AM, et al. Hyperspectral reflectance and fluorescence line-scan imaging for online defect and fecal contamination inspection of apples. Sensing and instrumentation for food quality and safety. 2007;(1):151–9. <https://doi.org/doi:10.1007/s11694-007-9017-x>