

桃果实采后脂氧合酶活性和膜脂脂肪酸组分的变化

吴敏^{1,2} 陈昆松^{1,2*} 张上隆² 吴平¹

(¹ 浙江大学生命科学学院植物分子生理与生物技术实验室, 杭州 310029; ² 浙江大學园艺系, 杭州 310029)

摘要: 以‘湖景蜜露’桃果实为试材, 分析了果实后熟软化进程中的乙烯释放、脂氧合酶 (LOX) 活性和细胞膜脂脂肪酸组分的变化, 探讨其与果实软化的关系。结果表明, 细胞膜脂脂肪酸组分主要有棕榈酸 (16:0)、硬脂酸 (18:0)、油酸 (18:1)、亚油酸 (18:2) 和亚麻酸 (18:3)。在果实采后 20 后熟过程中, 三种不饱和脂肪酸组分比例变化较大 (尤其是亚油酸和亚麻酸), 而两种饱和脂肪酸的变化很小。在 LOX 自我活化之前, 亚麻酸可能是 LOX 催化反应的主要底物。果实组织的后熟软化与 LOX 参与的细胞膜脂过氧化作用有关, 乙烯跃变可能是桃果实成熟启动后的伴随因子, 参与后熟软化进程。

关键词: 桃; 果实; 后熟; 软化; 脂肪酸; 脂氧合酶; 乙烯

中图分类号: S 662.1; Q 945 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2001) 03-0218-05

许多研究已证明植物组织的衰老与生物膜的降解密切相关。细胞膜衰败过程包括膜磷脂水解生成游离脂肪酸, 脂肪酸组分中的不饱和脂肪酸发生过氧化作用, 产生氢过氧化物和游离自由基^[1,2]。这些脂质过氧化产物和自由基进一步毒害细胞膜系统、蛋白质和 DNA, 导致细胞膜功能丧失及降解死亡, 促使果实成熟衰老和品质下降^[3,4]。植物组织膜脂过氧化的启动需要脂氧合酶 (LOX), LOX 及其过氧化产物直接参与组织的衰老进程^[5]。脂肪酸组分中的不饱和脂肪酸比例与膜脂过氧化程度有关, 不同果实采后成熟过程中, 膜脂脂肪酸组分的变化规律不尽相同^[6~9]。作者以‘湖景蜜露’桃果实为试材, 研究采后果实膜脂脂肪酸组分变化及其与 LOX 活性、乙烯生成和果实后熟软化的关系, 进一步探讨桃果实采后成熟衰老机制, 为改进和完善相关贮藏技术体系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与处置

供试材料为‘湖景蜜露’ [*Prunus persica* (L.) Batsch. cv. Hujingmilu] 软溶质桃果实, 采自浙江省杭州市大观山果园。果实采收成熟度为底色转白 (约 7~8 成熟), 于采收当天运抵实验室, 挑选后置于 (20 ± 1) °C、相对湿度大于 95 % 条件下贮藏, 用以随机取

收稿日期: 2000-09-25; 修回日期: 2001-02-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870507); 浙江省自然科学基金重点资助项目 (ZD0004); 农业部“九五”重点资助项目 (95-17-01-04)

*通讯作者。

样测定有关生理指标。

1.2 检测方法

LOX 活性测定: 参照 Axelrod 等^[10]的方法, 加以改进。从 3 个果实中取 2 g 果肉组织置于研钵内, 加入 10 mL 经 4 ℃ 预冷的 50 mmol L⁻¹ (pH 7.0) 磷酸缓冲液, 冰浴匀浆, 4 15 000 ×g 离心 15 min, 上清液用于 LOX 活性的测定。3 mL 反应体系中含亚油酸钠 (100 mmol L⁻¹) 母液 25 μL, 醋酸缓冲液 (100 mmol L⁻¹, pH 6.0) 2.775 mL, 酶液 0.2 mL, 反应温度 30 ℃, 于 234 nm 处测定 LOX 活性。加酶液后 15 s 开始计时, 记录 1 min 内的 OD₂₃₄ 值的变化, 酶活性以 OD₂₃₄ min⁻¹ g⁻¹ 表示。重复 3 次。

果实乙烯释放量测定: 单个果实放入一个密封容器中, 20 ℃ 放置 1 h 后抽取 1 mL 气样, 用 SP6800 气相色谱仪 (山东鲁南华工仪器厂) 测定乙烯含量。气谱条件: 氢焰离子化检测器, QDX502 填充柱, 载气、燃气、助燃气分别为 N₂、H₂ 和空气, 柱温 90 ℃, 检测室温度 150 ℃。重复 3 次。

膜脂脂肪酸组分测定: 取中果皮组织按苏维埃等^[11]的方法进行测定。重复 3 次。

果实硬度及可溶性固形物 (TSS) 含量测定: 分别用 GY-1 型果实硬度计 (测头直径为 3.5 mm) 和手持折光仪测定果实硬度和 TSS 含量。单果重复 10 次。

2 结果与分析

2.1 桃果实采后硬度、TSS 含量和乙烯释放量的变化

将湖景蜜露果实置于 20 ℃ 下后熟软化, 并分析该过程中果实硬度、TSS 和乙烯释放量的变化。从图 1 可见, 果实硬度变化可分为明显的两个阶段, 即采后初期迅速下降阶段和采后 5 d 以后的平缓变化阶段; TSS 含量变化平缓, 在 9.44 ~ 11.18 brix 之间; 乙烯释放量逐渐上升并于采后 9 d 达到最高峰 (38.66 ± 7.67) nL · g⁻¹ · h⁻¹, 随后下降。

2.2 桃果实采后 LOX 活性的变化

桃果实在 20 ℃ 下后熟软化过程中, 组织内 LOX 活性在采后初期维持在一个较高的水平, 之后略有下降, 至采后 5 d, 活性呈现增加变化, 并于采后 7 d 达到最高, 峰值为 (6.175 ± 0.675) OD₂₃₄ min⁻¹ g⁻¹, 随后呈下降趋势 (图 1)。

2.3 桃果实采后膜脂脂肪酸组分的变化

LOX 的主要作用底物是细胞膜膜脂组分中的亚油酸和亚麻酸。为了进一步探讨 LOX 活性与细胞膜膜脂脂肪酸组分变化的关系,

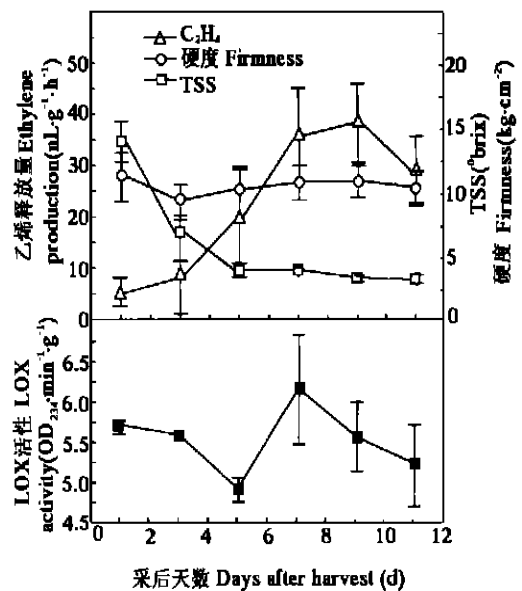


图 1 ‘湖景蜜露’ 桃果实采后在 20 ℃ 下后熟进程中果实硬度、TSS 含量、乙烯释放量和 LOX 活性的变化

Fig. 1 Changes in fruit firmness, TSS content, ethylene production and LOX during postharvest peach fruit ripening at 20

测定了湖景蜜露桃果实后熟过程中细胞膜脂肪酸组分的变化。结果表明,成熟桃果实组织中的细胞膜脂脂肪酸组分主要有棕榈酸(16:0)、硬脂酸(18:0)、油酸(18:1)、亚油酸(18:2)和亚麻酸(18:3)。采后果实在20℃下后熟过程中,饱和脂肪酸棕榈酸和硬脂酸组分的变化很小(图2)。但对于三种细胞膜不饱和脂肪酸(油酸、亚油酸和亚麻酸)而言,则变幅较大。在采后的前3 d,油酸由 $(13.12 \pm 1.11)\%$ 下降到 $(4.74 \pm 1.05)\%$,而后变化平缓,贮藏结束时为 $(3.29 \pm 0.08)\%$;亚油酸在前3 d 趋于增加,由初始的 $(40.08 \pm 0.64)\%$ 上升到 $(52.81 \pm 1.07)\%$,之后急剧降低,贮藏末期为 $(17.14 \pm 3.3)\%$;亚麻酸在贮藏前期变化较缓慢,从初始的 $(17.07 \pm 2.44)\%$ 到采后5 d 的 $(18.39 \pm 1.96)\%$,其后比例迅速上升,至末期增为 $(52.9 \pm 3.5)\%$ (图3)。

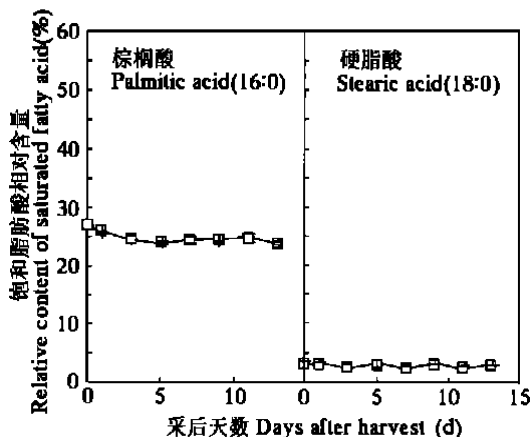


图2 ‘湖景蜜露’桃果实采后在20℃下后熟进程中棕榈酸和硬脂酸组分的变化

Fig. 2 Changes in palmitic and stearic acid composition during postharvest peach fruit ripening at 20

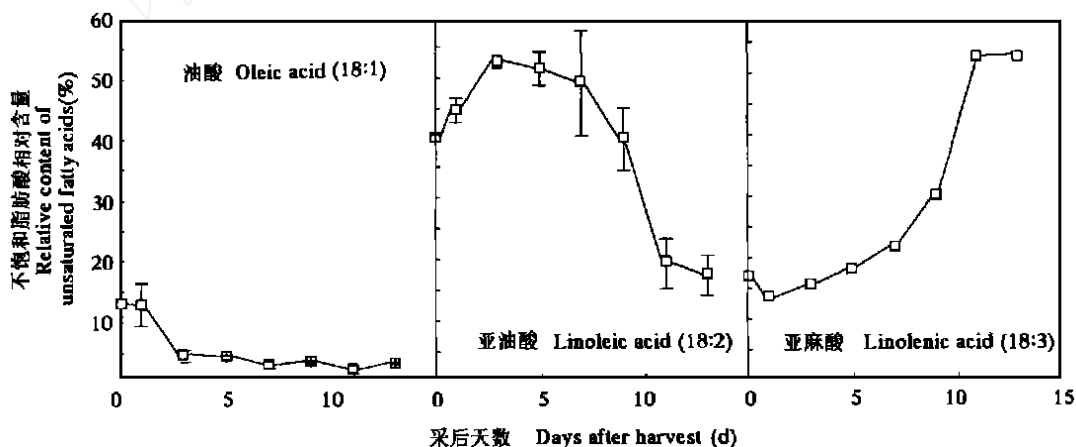


图3 ‘湖景蜜露’桃果实采后在20℃下后熟进程中油酸、亚油酸和亚麻酸组分的变化

Fig. 3 Changes in oleic, linoleic and linolenic acid composition during postharvest peach fruit ripening at 20

3 讨论

乙烯是一种成熟衰老激素,在果实成熟、衰老进程中起着重要的调节作用。人为促进或抑制采后果实的内源乙烯生成,可加速或延缓果实的后熟软化进程。但有研究认为在有些果实的后熟软化过程中,乙烯只是一个决定后熟软化速度的因子,而非软化启动因子^[12~15]。桃果实后熟软化进程有典型的乙烯跃变,Tonutti等^[16]发现,桃果实采后初期的软化启动阶段,乙烯释放量增加缓慢,乙烯跃变出现在软化后期。我们对湖景蜜露桃果实的研究也得到类似的结果,认为软化后期的乙烯大量生成可能是果实成熟衰老伴随的一种

现象, 乙烯在果实后熟软化进程中的作用仍有待进一步研究。

脂质过氧化作用是组织衰老过程中膜降解的主要机制, 该过程有自由基的介入^[2,17]。LOX 及其催化的过氧化反应产物直接参与了组织的衰老进程, 组织膜脂过氧化作用的启动需要 LOX^[5]。LOX 启动脂质过氧化反应的时间和程度, 与其酶活性变化相比, 酶作用底物的有效性显得更为重要。脂质过氧化反应启动时需要 LOX, 而一旦反应启动后, LOX 便会自我活化^[5] (即 LOX 活性可被其催化产生的脂质过氧化物活化), 而衰老过程由磷脂酶催化的膜磷脂降解产物则是 LOX 底物游离不饱和脂肪酸的主要来源。

陈昆松等^[6]研究发现, 在猕猴桃果实后熟软化过程中的 LOX 活性与膜脂脂肪酸组分的变化一致, 在果实采后初期, 随着 LOX 活性的增加, 底物亚油酸和亚麻酸被消耗, 并启动膜脂过氧化作用, LOX 自我活化, 促使细胞膜释放出游离脂肪酸, 致使 LOX 底物亚油酸和亚麻酸迅速积累。在香蕉果实成熟过程中, 跃变前期, 亚麻酸增加缓慢, 跃变上升期增加迅速, 而该过程亚油酸组分呈下降变化^[9]。我们的试验结果与同属冷敏型果实的香蕉^[9]的结果基本一致, 而不同于猕猴桃^[6]、西洋梨^[7]和葡萄柚^[8]。这种差异可能与果实对环境温度的敏感性有关。本研究显示, 桃果实采后在 20 后熟过程中, 棕榈酸和硬脂酸组分变化相对平稳, 且硬脂酸含量很低, 这可能是由于硬脂酸作为油酸的前体物质, 很容易在脂肪酸脱饱和酶的作用下转化为油酸^[18]之故; 三种不饱和脂肪酸油酸、亚油酸和亚麻酸组分中, 采后的前 3 d, 油酸呈持续下降变化, 亚油酸组分趋于增加, 亚麻酸略有减少后又增加; 同期的 LOX 活性维持在较高水平, 果实硬度迅速下降, 乙烯进入跃变上升期。由此可知, 在果实采后初期, 高活性的 LOX 可能首先以亚麻酸为底物, 随着油酸比例的下降, 亚油酸积累, 启动 LOX 自我活化, 促使膜脂过氧化进一步加剧, 加速乙烯的合成, LOX 峰值出现在乙烯跃变峰之前。采摘 3 d 后, 由于油酸水平趋于稳定, 亚油酸含量比例下降, 而亚麻酸增加。亚麻酸水平的增加, 可促使细胞膜透性的增加^[19]。果实后熟软化后期亚麻酸比例的急剧增加可能是果实组织衰老的结果。亚油酸和亚麻酸的这种变化趋势, 是亚油酸可进一步在脂肪酸脱饱和酶催化下转化为亚麻酸^[18]的结果, 这也是 LOX 自我活化和组织衰老过程中膜脂氧化的需要。

综上所述, 由 LOX 参与启动的膜脂过氧化, 可促使膜磷脂的降解和游离脂肪酸的积累, 在 LOX 出现自我活化之前, 亚麻酸可能是 LOX 催化反应的主要底物。果实组织的后熟软化与 LOX 参与的细胞膜脂过氧化作用有相关性, 乙烯跃变可能是作为桃果实成熟启动后的伴随因子, 参与果实后熟软化进程。

参考文献:

- 1 Paliyath G, Droillard M J. The mechanism of membrane deterioration and disassembly during senescence. *Plant Physiol. Biochem.*, 1992, 30: 789 ~ 812
- 2 Thompson J E. The molecular basis for membrane deterioration during senescence. In: Nooden L D, Leopold A C. *Senescence and aging in plants*. San Diego: Academic Press, 1988. 51 ~ 83
- 3 Ferrie B J, Beaudoin N, Burkhart B, et al. The cloning of two tomato lipoxygenase genes and their differential expression during fruit ripening. *Plant Physiol.*, 1994, 106: 109 ~ 118
- 4 Marangoni A G, Palma T, Stanley D W. Membrane effects in postharvest physiology. *Postharvest Biol. Technol.*, 1996, 7: 193 ~ 217
- 5 Fobel M, Lynch D V, Thompson J E. Membrane deterioration in senescing carnation flowers. *Plant Physiol.*, 1987, 85: 204

~ 211

- 6 陈昆松, 徐昌杰, 张上隆, 等. 脂氧合酶与猕猴桃果实后熟软化的关系. 植物生理学报, 1999, 25 (2): 138 ~ 144
- 7 Gerasopoulos D, Richardson D G. Effects of storage temperature on fatty acids composition of 'Anjou' pears. Acta Hort., 1995, 379: 459 ~ 466
- 8 Schirra M. Fatty acid profile changes in "Marsh seedless" grapefruit in response to storage conditions. Acta Hort., 1994, 368: 429 ~ 434
- 9 Wade N L. Membrane lipid composition and tissue leakage of pre- and early-climacteric banana fruit. Postharvest Biol. Technol., 1995, 5: 139 ~ 147
- 10 Axelrod B, Cheesbrough T M, Leakso S. Lipoxygenase from soybeans. Methods in Enzymology, 1981, 7: 443 ~ 451
- 11 苏维埃, 王文英, 李锦树. 植物类脂及其脂肪酸的分析技术. 植物生理学通讯, 1980, (3): 54 ~ 60
- 12 陈昆松, 郑金士, 张上隆, 等. 乙烯与猕猴桃果实的后熟软化. 浙江农业大学学报, 1999, 25 (3): 251 ~ 254
- 13 Matsumoto S, Obara T, Luh B S. Changes in chemical constituents of kiwifruit during postharvest ripening. J. Food Sci., 1983, 48: 607 ~ 611
- 14 Pratt H K, Reid M S. Chinese gooseberry: Seasonal patterns in fruit growth and maturation, ripening, respiration and the role of ethylene. J. Food Sci. Agric., 1974, 25: 747 ~ 757
- 15 Wright H B, Heatherbell D A. A study of respiratory trends and some associated physio-chemical changes of Chinese gooseberry fruit *Actinidia chinensis* (yang-tao) during the later stages of development. New Zealand Journal of Agricultural Research, 1967, 10: 405 ~ 414
- 16 Tonutti P, Bonghi C, Ramina A. Fruit firmness and ethylene biosynthesis in three cultivars of peach (*Prunus persica* L. Batsch). J. Hort. Sci., 1996, 71 (1): 141 ~ 147
- 17 Dhindsa R S, Plumb-Dhindsa P, Thorpe T A. Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. J. Exp. Bot., 1981, 32 (126): 93 ~ 101
- 18 Harwood J L. Fatty acid metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mbl. Biol., 1988, 39: 101 ~ 138
- 19 Nanaiah G K, Anderson J A. Electrolyte leakage and evolution of ethylene and ethane from pepper leaf disks following temperature stress and fatty acid infiltration. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 1992, 117: 846 ~ 851

Changes of Lipoxygenase Activity and Membrane Fatty Acid Composition in Postharvest Ripening Peach (*Prunus persica* L.) Fruit

Wu Min^{1,2}, Chen Kunsong^{1,2}, Zhang Shanglong², and Wu Ping¹

(¹Laboratory of Plant Molecular Physiology and Biotechnology, College of Life Sciences Zhejiang University, Hangzhou 310029; ²Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Abstract: A peach cultivar 'Hujingmilu' was used to investigate the changes of LOX activity, ethylene production and membrane fatty acid composition. It was found that the major fatty acids in the ripening peach fruit included palmitic acid (16:0), stearic acid (18:0), oleic acid (18:1), linoleic acid (18:2) and linolenic acid (18:3). There were remarkable changes in the proportion of oleic acid, linoleic acid and linolenic acid, especially linoleic acid and linolenic acid, while no such notable changes in the proportion of palmitic acid and stearic acid during fruit ripening at 20 °C. Linolenic acid was mainly used as a LOX catalyzing substrate before LOX self-propagation during fruit ripening at 20 °C. LOX might play a role in membrane lipid peroxidation which participated in fruit ripening and softening. The significance of these results was discussed.

Key words: *Prunus persica* L.; Fruit; Ripening; Softening; Fatty acids; Lipoxygenase; Ethylene