

采后荔枝果实的类脂褐素和有机自由基水平的变化

林植芳 王 伟 林桂珠 陈绵达

(中国科学院华南植物研究所, 广州)

赵 成 学

(中国科学院上海有机化学研究所, 上海)

提 要

两个荔枝品种(糯米糍和淮枝)果实的类脂褐素水平随贮藏时间延长而增高。低温抑制类脂褐素的形成。品种间果皮的自由基水平呈不同类型的变化。

衰老植物组织中膜脂过氧化作用显著增强, 已得到许多实验证实^[1-7], 但也存在不同的论点^[8]。深入研究此问题的焦点在于必须明确衰老与膜脂过氧化作用及自由基引发这个过程之间的关系。对此, 以果实为材料的研究很少^[9], 尤其是同时涉及成熟及衰老果实的有机自由基和类脂褐素水平的研究, 则尚未见报道。本文以成熟荔枝为材料, 探讨采后不同时间果实的荧光性色素类脂褐素含量的变化以及与贮藏温度的关系, 并以 ESR 法测定了果皮的有机自由基浓度。

材 料 和 方 法

荔枝品种糯米糍和淮枝 (*Litchi chinensis* cultivars Nomechur 和 Huizhi) 果实采自广州市郊, 经精选后放入聚乙烯薄膜袋中, 室温 ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) 或低温 ($1 \pm 1^\circ\text{C}$) 下贮藏 7 天。间隔不同时间取样进行分析。

类脂褐素 (Lipofuscin-like pigments 简称 LFLP) 含量的测定参照 Wilhelm 和 Wilhelmova^[7] 的方法。果皮或果肉按 1:8 (W/V) 用氯仿-甲醇 (2:1, V/V) 提取, $1000 \times g$ 离心 5 分钟。上清液以重蒸馏水洗涤两次, 去除可能的干扰, 遮光下真空干燥, 溶于少量甲醇-氯仿 (8:1,

V/V) 中待用。荧光光谱以 Hitachi MPF-4 荧光分光光度计分析。固定荧光强度以 Beckman 344 型高效液相色谱仪测定, 应用 Ultresphere ODS fum 柱 $4.6 \times 150 \text{ mm}$, 流速 1 ml/min , 压力 21.6 kPa 。激发光 360 nm , 发射荧光 455 nm 。类脂褐素含量以峰面积 $\mu\text{MeV/mg}$ 蛋白质表示。

有机自由基的测定参照 Priestley 等^[8] 的方法, 但果皮于 60°C 烘干, 研磨过 60 目筛, 保存于含有 P_2O_5 的干燥器中。称一定量的果皮干粉放入毛细管中, 置于 Varian E-112 ESR Spectrometer 的微波腔中。测定条件是: 磁场强度 3270 G , 扫描范围 $10 \times 10 \text{ G}$, 调制频率 100 kHz , 调制幅度 $0.5 \times 1.0 \text{ G}$, 微波功率 10 mW , 扫描时间 4 分钟, 时间常数 0.128 sec , 23°C 。ESR 信号的 g 因子以锰 (Mn^{2+}) 标法测定。信号大小按峰高度以 DPPH (α, α -二苯基- β -苦基苯胍) 为标准加以计算, 以自旋数/克干重表示有机自由基的浓度。

实 验 结 果

一、果实贮藏期间有机自由基水平的变化

荔枝果皮干粉的有机自由基的 ESR 波谱为不具超精细结构的单峰, 见图 1, g 因子 = 2.0032 , 与我们测定的四种植物叶片及叶绿体

干粉的有机自由基的 g 因子相同 (植物生理学报,印刷中), 与前人报道的生物干样的 g 因子 (2.0040—2.0055) 范围接近^[11,12]。

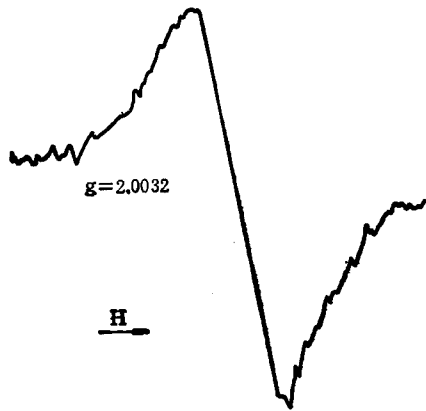


图1 荔枝果皮干粉的有机自由基的 ESR 波谱(一阶导数)

室温贮藏 6 天, 果皮的有机自由基浓度的变幅为 $15\text{--}21 \times 10^{15}$ 自旋/克干重 (暗处) 和 $25\text{--}31 \times 10^{15}$ 自旋/克干重 (紫外光下) 之间, 紫外辐射诱发自由基形成增加 50—70% (表 1)。两种荔枝品种在贮藏期间果皮的有机自由基浓度的变化趋势不一致。糯米糍在室温放置 1 天后, 自由基相对增加 33% (暗) 及 25% (光); 放置 5 天则比 1 天时降低, 但仍比新鲜果皮中高 14—15%, 表明衰老与自由基损伤有一定的关系。淮枝果皮干粉中自由基浓度随时间变化表现另一种图式, 自由基的光/暗也比糯米糍略高。

表 1 荔枝果实在贮藏过程中果皮的有机自由基浓度 (自旋数 $\times 10^{15}$ /克干重) 的变化*

品种	贮藏时间, 天	暗 下		光 辐 射		光/暗
		浓度	%	浓度	%	
糯米糍	0	15.71	100.0	25.16	100.0	1.602
	1	21.00	133.7	31.60	125.6	1.505
	5	18.12	115.6	28.76	114.3	1.585
淮 枝	0	18.73	100.0	30.46	100.0	1.626
	2	17.03	90.9	28.19	92.5	1.656
	5	15.33	81.8	25.54	83.9	1.667
	6	16.98	85.3	27.15	89.1	1.698

* 表中数据为样品充分混合后 (10 个果的果皮干粉) 随机取样 (重约 125mg) 作一次测定的结果。

二、类脂褐素 (LFLP) 的变化

用扫描荧光光谱法发现, 荔枝果皮的 LFLP 具有 360nm 的荧光激发峰和 390nm 的荧光发射峰 (图 2a)。果肉的 LFLP 成分较复杂, 激发峰 320 及 360nm, 发射峰 327、343、400nm (图 2b)。荔枝果实的 LFLP 的激发峰与动物组织的脂褐素 LFP^[10] 及植物叶绿体^[7], 香蕉、桃子果实^[9] 的 LFLP 的荧光激发峰相同, 但荧光发射峰则较通常的 440—470nm 短, 可能因其荧光性物质的组成成分不同所致。

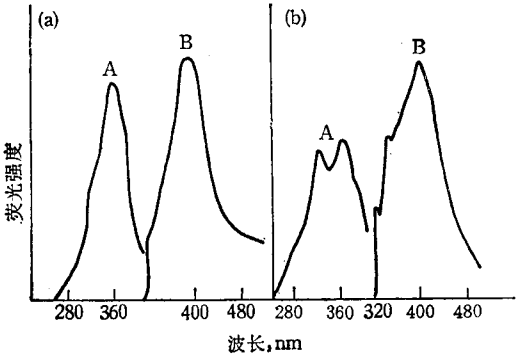


图 2 荔枝果实 (a 为果皮, b 为果肉) 类脂褐素的激发 (A) 和发射光谱 (B)

固定荧光 E_{m455}/E_{s360} 的测定 (图 3) 看出糯米糍果皮的 LFLP 在贮藏过程中随果实的衰老而逐渐增加, 到第 5 天已比开始时增加近 1.2 倍。

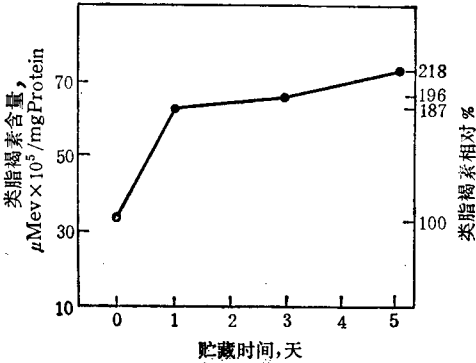


图 3 糯米糍果皮的类脂褐素在果实贮藏中的变化

LFLP 在果实组织中的形成与积累受贮藏温度的影响。表 2 表明, 与 30℃ 时相比, 1℃ 低温明显抑制两种果实果皮中 LFLP 形成的速

率。果肉中的 LFLP 含量比果皮低得多,30℃贮藏 7 天的淮枝果肉中按单位蛋白质计算的 LFLP 量只为相应果皮的 1/32。

表 2 温度对荔枝贮藏过程中类脂褐素水平的影响

品种	贮藏时间 (天)	LFLP 含量 ($\mu\text{Mev} \times 10^3 / \text{mg protein}$)		
		果 皮		果肉
		30℃	1℃	30℃
糯米糍	当天	0	0	NS
	2	0	0	
	4	*88.6 $\pm$ 0.06	*87.4 $\pm$ 0.06	
	7	4146.1 $\pm$ 0.47	170.7 $\pm$ 0.02	
淮枝	当天	0	0	0
	4	148.0 $\pm$ 0.02	*40.2 $\pm$ 0.03	0
	7	3419.6 $\pm$ 0.31	49.2 $\pm$ 0.00	106.6 $\pm$ 0.03

注: NS 未作测定, * $P > 0.05$, 其余数字 $P < 0.05$ 。

讨 论

荧光性类脂褐素是膜脂过氧化产物——丙二醛与蛋白质、核酸、和磷脂交联形成的带 Schiff 碱的化合物,它是膜脂过氧化作用所致,通常与机体和细胞的衰老密切相关^[10,11]。荔枝果实的果皮及果肉在贮藏老化过程中 LFLP 含量增多,支持了 Maguire 和 Haard^[9] 首次提出的果实(香蕉及桃子)成熟及衰老过程中有 LFLP 积累的论点,也与我们已发现采后 7 天的荔枝果皮中丙二醛含量增加 2—3 倍的结果(植物学报,待发表)相符,进一步证实了膜脂过氧化作用对膜的损伤是导致荔枝果实衰老的原因之一,同时也是衰老的结果。

膜脂过氧化作用通常由自由基(活性氧自由基、有机自由基)进攻膜脂的多不饱和脂肪酸而引发的。一些过渡金属离子如 Fe, Cu 等也能启动多不饱和脂肪酸的自发氧化^[2]。荔枝果实衰老过程中类脂褐素和丙二醛的积累,伴以超氧化物歧化酶活性下降和谷胱甘肽等抗氧化剂的减少(另文报道),推测衰老果实组织内可能存在较高浓度的自由基,由此导致生物膜的变性、组织破坏和衰老。然而,从果皮干粉的有机自由基分析结果来看,只从糯米糍品种中得到证实,而淮枝的情况却相反。两者的差异原因尚不清楚,初步估计可能与所用淮枝果实过熟有关。1℃ 低温延缓了果皮中 LFLP 的积累,表明对荔枝的非伤害低温能抑制果实的过氧化作用与衰老过程,有利于荔枝的贮藏和保鲜,即与保鲜的效果一致。

参 考 文 献

- [1] 林植芳等:《植物学报》, 1984, 26, 605.
- [2] Brennas, T. C.: *Plant Physiol.*, 1977, 59, 411.
- [3] Dhindsa, R. S. et al.: *J. Exp. Bot.* 1981, 32, 90.
- [4] Dhindsa, R. S. et al.: *Physiol. Plant.*, 1982, 56, 453.
- [5] Leshem, Y. Y.: *What's New in Plant Physiol.*, 1981, 12, 1.
- [6] Pauls, K. P. et al.: *Plant Physiol.*, 1984, 75, 1152.
- [7] Wilhelm, J. et al.: *Photosynthesis*, 1981, 15, 55.
- [8] Priestley, D. A. et al.: *Plant Physiol.*, 1980, 66, 715.
- [9] Maguire, Y. P. et al.: *Nature*, 1975, 258, 599.
- [10] Tappel, A. L.: *Pathobiology of Cell Membranes*, Vol. II, Academic Press, New York, 1975, 145—170.
- [11] Swartz, H. M. et al.: 电子自旋共振的生物应用(中译本), 科学出版社, 北京, 1972, 221—239 页.
- [12] 曹锡清:《生物化学与生物物理进展》, 1986, (2), 17.

[本文于 1987 年 8 月 11 日收到]

(上接第 384 页)

- [4] Sanger, F. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1980, 143, 161.
- [5] Barber, M. et al.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1981, 325.
- [6] Biemann, K. et al.: *Mass Spectrom. Rev.*, 1987, 6(1), 1.
- [7] Dell, A. and Morris, H. R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1982, 106, 1456.
- [8] Barber, M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, 110, 753.
- [9] Morris, H. R. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, 101, 623.
- [10] Williams, D. H. et al.: *Biochem. J.*, 1982, 201, 105.

- [11] Köning, W. A. et al.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, 1983, 46, 403.
- [12] Buko, A. M. et al.: *Biomed. Mass Spectrom.*, 1983, 10, 408.
- [13] Roepstorff, P. et al.: *Biomed. Mass Spectrom.*, 1985, 12, 181.
- [14] Shtivelman, E. et al.: *Nature*, 1985, 315, 550.
- [15] Roepstorff, P. et al.: *Biomed. Mass Spectrom.*, 1984, 11, 601.
- [16] Garner, G. V. et al.: *Org. Mass Spectrom.*, 1983, 18, 486.

[本文于 1987 年 7 月 22 日收到]