

油桃果实成熟过程中脂质过氧化相关酶活性变化研究

李 军^{1,4}, 王文雅², 郭函子³, 胡小松⁴

(1. 河北科技师范学院, 秦皇岛 066600; 2. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029;

3. 中国农业科学院作物科学所, 北京 100081; 4. 中国农业大学食品与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要:以油桃品种“华光”为试材, 研究果实在成熟过程中相关指标的变化。测定了过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、脂氧合酶(LOX)的活性以及过氧化氢(H_2O_2)、可溶性固形物(TSS)和淀粉的含量, 并对果实中的 H_2O_2 积累与酶活性的关系进行了分析。结果显示, 在果实生长成熟期间, 脂氧合酶(LOX)的活性和过氧化氢(H_2O_2)含量持续升高, 过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性前期升高, 后期下降, 可溶性固形物含量持续上升, 淀粉含量前期上升, 后期下降。这表明, 脂氧合酶(LOX)的活性迅速上升可能启动了油桃果实从成熟过程转向衰老过程。

关键词:油桃; LOX; POD; CAT; SOD; H_2O_2

中图分类号:S663.1 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2006)05-0038-03

油桃果实以其香嫩多汁, 富含维生素 C、铁和其它矿物质而深受人们喜爱。油桃在我国种植地域广泛, 年产量较大。但油桃极易衰老, 每年因保鲜不当导致大量油桃腐烂, 造成很大的资源浪费和经济损失。脂质过氧化是引起果实衰老的关键因子, 参与脂质过氧化过程的酶主要有 LOX、POD、CAT、SOD 等^[1-4], 在油桃成熟衰老与脂质过氧化之间关系的研究多侧重于采后贮藏期间, 而对于果实采摘前二者间的关系却少有报道。油桃采后的生理变化是其前期生理变化的延承和继续, 因此对于油桃采摘前成熟衰老过程与脂质过氧化酶系统之间的关系的意义。本试验以华光油桃为试材, 研究了油桃采前成熟过程中, LOX、POD、CAT、SOD 酶活性及 H_2O_2 、可溶性固形物、淀粉含量的变化规律。

1 试验材料

1.1 材料

河北昌黎的油桃(品种: 华光), 从花后第 10 d, 4 月 29 日开始, 每隔 5 d 采摘一次, 当天测定其成熟指标及酶活性。

1.2 主要仪器

冷冻高速离心机(美国 sorvall Instrument); 电子天平(上海第二天平仪器厂); pHs-3E 数字式 pH 计(江苏电分析仪器厂); 组织捣碎匀浆机(江苏国华仪器厂); 722 型分光光度计等。

2 方法

2.1 可溶性固形物的测定

用阿贝折光仪测定^[5]。

2.2 淀粉含量的测定

参照韩雅珊^[6]、王军虹^[7]的方法, 取冰冻样品, 用 40% $HClO_4$ 浸提, 2 500 r/min 离心 10 min 后, 取上清液备用。KI- I_2 法, 620 nm 波长下比色。单位: mg/g(DW)。

2.3 脂肪氧合酶活性测定

参照罗云波^[8]的方法。将果肉组织在 4℃条件下置于磷酸缓冲液(pH7.5)匀浆。再将匀浆液 15 000 r/min 离心 10 min, 取上清液与底物混合。在 25℃条件下培养 1 h, 脂氧

合酶的活性用分光光度计在 234 nm 的波长下进行测定。每分钟增加一个 OD 值为一个酶活性单位, 测定重复 3 次。

2.4 H_2O_2 含量的测定

参照 Patterson^[8]、柯德森^[9]的方法。样品用冷丙酮提取, 取 1 ml 提取液加 0.1 ml 20% $TiCl_4$ 的浓盐酸液, 0.2 ml 浓氨水, 生成的过氧化物-Ti 复合物用 3 000× g 离心 10 min, 将沉淀溶于 3 ml H_2SO_4 (1 mol/L)中, 410 nm 波长测定光吸收, 制作 H_2O_2 标准曲线。

2.5 POD 酶液提取与活性测定

2.5.1 POD 酶液提取 称 5~20.0 g 外表完好的冰冻油桃果肉, 0.2 mmol/L pH6.5 磷酸缓冲液浸提, 捣碎机捣成匀浆。将匀浆全部转入离心管, 在 0℃12 000 r/min 冷冻离心 30 min, 上清液经玻璃棉过滤, 转入 25 ml 容量瓶。用 0.2 mol/L pH6.5 磷酸缓冲液定容至刻度。4℃保存, 等待 POD 测定。

2.5.2 活力测定 愈创木酚氧化法。反应池中, 0.5 ml 10.5% (W/V) 愈创木酚(溶剂为 50% 乙醇)+0.2 ml 0.5% (W/V) H_2O_2 +0.2 ml 酶液+2.1 ml 0.05 mol/L pH6.5 磷酸缓冲液, 30℃保温 3 min, 在 470 nm 波长下测定吸光度变化 ΔA , 吸光度变化 0.001 定义为酶单位。

2.6 CAT 酶液提取与活性测定

2.6.1 CAT 酶液提取 定期取果, 称 25 g 油桃果肉, 加 0.5 g $CaCO_3$ 及一定量的 0.1 mol/L pH7.0 磷酸缓冲液, 捣碎机捣碎, 使最终体积为 100 ml 混匀。用双层纱布挤出提取液, 弃去渣滓, 提取液在冷冻条件下离心或过滤, 取上清液备用。

2.6.2 活性测定 采用滴定法, 参照韩雅珊^[10]的方法。

2.7 SOD 酶液提取与活性测定

2.7.1 SOD 酶液提取 称 5~10 g 油桃, 加入预先在冰箱放置的 0.05 mol/L pH7.8 磷酸缓冲液, 其用量约为所用材料的 2~10 倍, 在 4℃条件下或冰浴中研成匀浆, 四层纱布过滤, 将滤液 4 000 r/min 冰冻离心 20 min, 收集上清液, 即为酶粗提液。

2.7.2 活性测定 采刚氮蓝四唑(NBT M=817.76)化还原的抑制法^[11]。具体操作为: 取 8 只小烧杯按下表中的量加入各种试剂, 其中 4~8 号杯中加水量和酶液量视酶液浓度及活性按比例进行调整, 但反应体系总体积保持 3 ml。试液全部加入后充分混匀, 除 1 号杯外, 其余均在 4 000 Lx 日光灯下

*项目资助: 国家“十五”重大科技专项(2001BA501A21)

收稿日期: 2006-03-27

照射 50 min, 然后立即在 560 nm 测定光密度。

表 1 反应体系中试剂的量 (ml)					
杯号	蛋氨酸磷酸缓冲液	水	NBT	酶液	核黄素
1	1.5	0.9	0.3	0	0.3
2	1.5	0.9	0.3	0	0.3
3	1.5	0.9	0.3	0	0.3
4	1.5	0.85	0.3	0.05	0.3
5	1.5	0.80	0.3	0.10	0.3
6	1.5	0.75	0.3	0.15	0.3
7	1.5	0.70	0.3	0.20	0.3
8	1.5	0.65	0.3	0.25	0.3

酶活单位定义: 以抑制 NBT 光还原 50% 作为一个酶活单位; 酶活计算方法:

酶活单位(U/ml) = $\frac{1}{50\% \text{ 酶活单位的酶液量}}$ × 稀释倍数。

3 结果与分析

3.1 可溶性固形物(TSS)含量

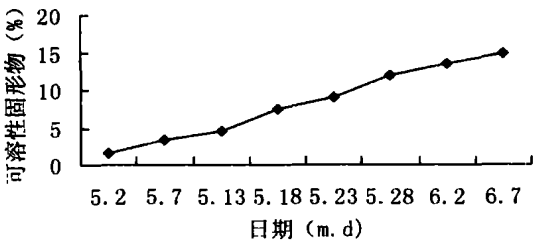


图 1 不同时期油桃中可溶性固形物的含量变化

可溶性固形物含量随果实的成熟而上升。当达到成熟期后, 含量在 13.3%~15.6%。一般说来, 在一定范围内, 果实比重及硬度较大, TSS 含量较低, TSS 含量越高, 果实的成熟程度越高。具体指标有待于进一步研究。

3.2 可溶性淀粉含量

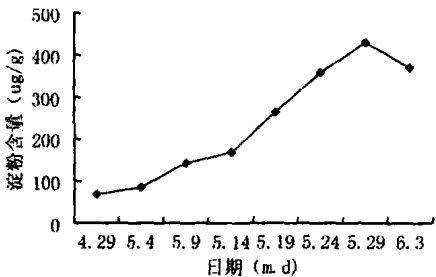


图 2 不同时期油桃中淀粉的含量变化

从图 2 看出, 油桃在生长期, 淀粉含量总体上呈上升趋势。而在成熟后期, 呈下降趋势。果实进入成熟期, 淀粉水解, 含量下降。

3.3 脂氧合酶活性

从图 3 看出, LOX 活性在 4 月底至 5 月中下旬较低, 变化差异不明显; 随着果实的成熟过程的进行, 从 5 月底开始迅速上升。这可能是油桃果实迅速完成成熟过程进而转向启动衰老过程的标志。

3.4 H₂O₂ 含量

H₂O₂ 可能是启动衰老的一个重要因子。从图 4 看出,

H₂O₂ 含量呈持续上升趋势。可能是在成熟过程中 SOD 的活性高于 CAT 和 POD 二者的活性。因为 SOD 能催化 O₂⁻ 发生歧化作用, 生成 H₂O₂, 而 CAT 和 POD 是担负清除 H₂O₂ 和其它的氧自由基的主要酶类。

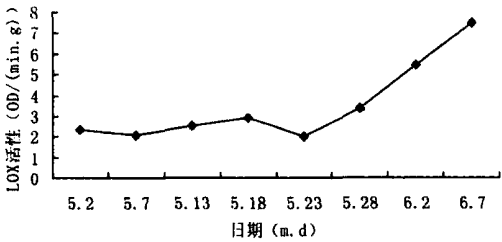


图 3 不同时期油桃中脂氧合酶活性变化

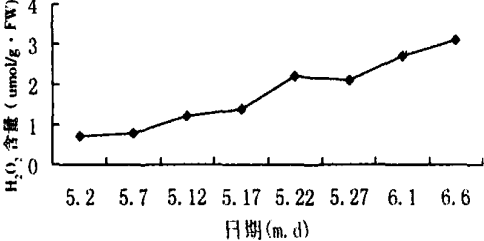


图 4 不同时期油桃中 H₂O₂ 含量的变化

3.5 POD 活性

从图 5 看出, 油桃幼果时, POD 活性很小, 几乎为零。POD 活性在果实成熟前期较低。随着成熟度提高, 成熟后期约提高 8 倍, 而又逐渐下降, 这一变化说明 POD 活性与果实的成熟衰老密切相关。

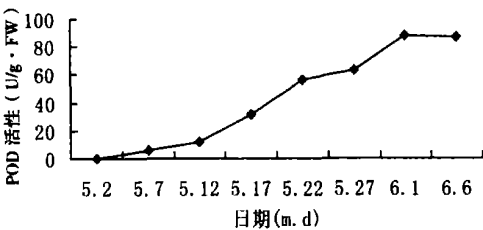


图 5 不同时期油桃中 POD 活性的变化

3.6 CAT 活性

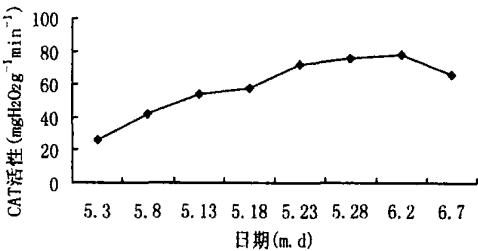


图 6 不同时期油桃中 CAT 活性的变化

从图 6 看出, CAT 活性在成熟前期呈上升趋势, 达到高峰, 到达成熟后期又立即下降。CAT 活性的提高能把体内具有潜在危害的 O₂⁻ 和 H₂O₂ 转化为无害的 H₂O 和 O₂, 从而阻止由 H₂O₂ 导致的氧伤害。CAT 活性的下降, 可以导致 H₂O₂ 的累积, 从而使果实膜结构受到损伤。

3.7 SOD 活性

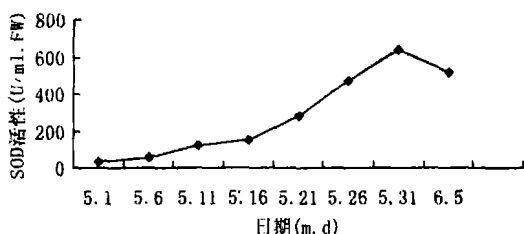


图7 不同时期油桃中SOD活性的变化

从图7看出:随着果实成熟度提高,SOD活性在幼果期最低,成熟期最高,过熟期降低。由此反映出随果实成熟衰老,SOD活性上升。

不同成熟度油桃中SOD活性的变化说明,果实衰老时,SOD活性的下降,意味着果实清除活性氧自由基(O_2^-)的能力下降,歧化产物 H_2O_2 累积。果实发育过程中SOD活性的提高与SOD的合成有关,SOD活性的提高是相应于 O_2^- 含量增加的应急解毒措施,是使细胞免受毒害的调节反应。通过提高SOD活性来增强果实对不良环境的抵抗力和适应性。

4 讨论

采用测定成熟期间果实中酶活性变化的方法,可以较灵敏地判断果实的内部系列生化反应的状况,倘若利用二者的相关关系,将果实的商品指标与酶活性建立定量关系,可以预测果实的适宜采收贮藏期,从而有目的地调控贮藏过程,采用适当手段(包括基因工程)调控酶的活性,则可控制果实中的代谢过程,贮藏期就可以得到延长,这在调控贮藏条件上也是有积极作用的,很有必要进一步开展研究。

LOX是植物体内的一种重要的酶,具有普遍的生理意义,参与调控植物体植保素的合成、成熟衰老、光合作用等生理过程^[1]。特别是在果实衰老软化过程中,LOX能够催化脂质过氧化,使游离的不饱和脂肪酸产生自由基,作用于膜磷脂中的结合态不饱和脂肪酸,导致细胞膜的破坏,使膜的分室效应丧失,启动机体衰老过程^[1]。本研究,从4月底至5月中下旬油桃体内LOX活性较低,且变化幅度不大,这时LOX可能主要参与油桃果实内的一些物质合成及成熟发育生命活动,但从5月底开始LOX活性迅速上升,很有可能调控衰老因子诱导LOX开始大量合成,导致活性氧离子急剧产生,启动油桃果实的衰老过程。

植物在生命过程中会产生活性氧(包括过氧化氢、超氧阴离子、羟自由基和单线态氧等),SOD能够催化超氧阴离子形成 H_2O_2 ,再经CAT或POD的催化形成 H_2O_2 和 $O_2^{[12]}$,正常情况下植物体内的活性氧处于产生与消除的动态平衡状态。关于组织衰老的机理多归于超氧自由基引起的膜脂氧化与过氧化的损害,Fridovich(1978)^[12]提出了植物在逆境下自由基伤害的理论,指出植物体内氧自由基大量产生时,如果超出了本身的清除能力,便会引起伤害。Asada—K Chloroplasts认为,果蔬在衰老过程中,活性氧清除酶间的活性变化不同步,从而导致活性氧大量产生。

关于CAT、POD、SOD在果蔬的活性变化不同的研究结果不尽一致。植物衰老期让SOD、CAT活性下降,氧吸收量增加,形成了过量的 O_2 、 H_2O_2 、 HO 、 O_2^- 活性氧。采后7d的荔枝果皮SOD活性约为采收当天的一半,而POD含量则上升了2倍^[13]。此次实验中,油桃在成熟前期,果肉中POD活

性上升,成熟后期,酶活性下降。POD活性可以作为后熟衰老的参数。在猕猴桃成熟衰老过程中,CAT、POD、SOD属于后期上升型酶,即在果实软化时,其活性开始上升,果实越衰老,它们的活性越高^[14]。这与油桃相反,在油桃成熟衰老过程中,CAT、POD、SOD属于前期上升型酶,即在果实成熟时,其活性开始上升,果实成熟程度越高,它们的活性越高。本试验结果显示,在油桃成熟前期SOD、CAT、POD酶活性和 H_2O_2 含量呈现持续增加的趋势,这表明油桃中SOD、CAT、POD为诱导酶,产生 H_2O_2 的自由基诱导了它们含量的上升,表现为这类氧化还原酶活性的上升。对草莓的研究表明,4个不同品种在25℃前期条件下,SOD酶活性持续上升,这与本实验研究结果相似^[15]。

综上所述,本研究认为LOX、SOD、POD、CAT之间的关系为:SOD、POD、CAT酶在油桃果实内起到清除自由基的作用,使果实免受自由基伤害,但LOX活性迅速上升后,油桃这类衰老很快的果实中活性氧自由基产生量太多,大大超过了SOD等自由基清除剂的清除能力,它们活性转而下降,导致这类果实的迅速衰老。在油桃的品质指标上表现为,可溶性固形物含量持续增加,而淀粉含量增加停止,转为降解为可溶性糖类,从而达到了果实的最佳食用程度,进入迅速衰老期。因此,SOD、POD、CAT、LOX酶活性水平可作为判断油桃果实衰老的生理指标之一。减缓SOD活性下降,维持较高POD、CAT活性,抑制LOX活性迅速提高可以有效延缓油桃果实的衰老。

参考文献:

- [1] 罗云波.脂氧合酶与番茄采后成熟关系.园艺学报[J],1994,21(4):357—360.
- [2] 冯彤,于新.热激处理对贮藏期间银杏过氧化氢酶活性的影响[J].仲恺农业技术学院学报,1998,11(2):24—27.
- [3] 关军锋,管雪强.成熟度和采后处理对草莓果实品质、超氧化物歧化酶活性和蛋白质含量的影响[J].果树科学,1997,14(1):24—27.
- [4] 周国忠,刁太清.猕猴桃果实淀粉含量和淀粉酶活性变化与耐贮藏性的关系[J].果树科学,1997,14(1):21—23.
- [5] 大连轻工学院,华南理工大学等合编.食品分析[M].中国轻工业出版社,1998,57—64.
- [6] 韩雅珊.淀粉含量的测定,食品化学实验指导[M].中国农业大学出版社,1996,33—35.
- [7] 王军虹,刘武林.苹果梨贮藏期生理变化[J].东北农业大学学报,1999,30(1):79—83.
- [8] Patterson B D, Mikal Y, Nam H G. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium(IV). Analytical Biochemistry, 1984, 139: 487—492.
- [9] 柯德森.活性氧在外源乙烯诱导内源乙烯产生过程中的作用[J].植物生理学报,1997,23(1):67—72.
- [10] 韩雅珊.过氧化氢酶的测定,食品科学实验指导[M].中国农业大学出版社,1992,146—148.
- [11] 沈文彪,叶茂柄.小麦旗叶自然衰老过程中清除活性氧能力的变化[J].植物学报,1997,37(7):634—640.
- [12] 宋纯鹏.植物衰老生物学[M].北京大学出版社,1998.
- [13] 林植芳.采后荔枝果实中氧化和过氧化作用的变化[J].植物学报,1988,30(4):282—387.
- [14] 吕均良.猕猴桃果实采后成熟过程中乙烯生成和超氧化物歧化酶的活性变化[J].浙江农业大学学报,1993,19(2):135—138.
- [15] 晏绍庆.玻璃化保存草莓多酚氧化酶活性变化的实验研究[J].食品科学,2000,21(1):58—62.