

403946

冷冻诱导的油棕(*Elaeis guineensis*) 中果皮脂类化合物的水解

[马来西亚]Ravigadevi Sambanthamurthi 等

摘要 将油棕果置于15℃及其以下的温度下,其中果皮的游离脂肪酸(FFA)含量会显著增加。当温度为5℃时,效果最为明显,此时可观察到FFA水平可达总油量的70%以上。FFA的增加伴随着脂溶性磷水平的增加及胡萝卜素含量的下降。冷冻处理对棕仁油无影响。结果显示了由低温胁迫所导致的中果皮脂肪酶的活化。

引 言

游离脂肪酸水平是决定油质量的一个主要因素。就生产高质量的棕油而言,一个重要的必不可少的条件就是油棕中果皮需达最低酸度值,也即最低FFA水平。果实受损曾被认为是油棕果中FFA水平增加的唯一重要因素(Hartley,1988),其原因通常归结于某种脂肪酶的活化。在完整或未受损伤的果实中,所含油类物质被认为由于有液泡膜的存在而可以免受酶的作用。而当受到损伤时,这种膜则可以发生破裂。尽管油棕中的这种还原性脂解活性非常重要,但有关其影响因素的基本资料尚很缺乏。

在有关油棕中果皮脂解活性的本质上,不同工作者提出过一些相冲突的证据。据Hartley(1988)认为,油棕中果皮含有一种很活跃的内源脂肪酶。但Tombs等(1982)提出证据认为这种脂解活性是由于真菌的侵入所引起。Oo(1981)也报导在油棕中果皮中缺乏内源脂肪酶。然而最近,Abigor等(1985)报道过他们对来自油棕中果皮的一种脂肪酶的提纯及部分特性的研究。Arumughan等(1989)也报道了油棕果脂肪酶的组织化学定位。

本文所提出的证据显示了油棕中果皮中一种很活跃的内源脂肪酶的存在,该酶受低温影响而被活化。

材料和方法

从马来西亚油棕研究所获得新鲜的油棕果穗(*Elaeis guineensis*) Jacq. var. *tenera*)。使用前直接从果穗上取下果实,擦洗干净,用0.5%的次氯酸钠表面灭菌40分钟,再于无菌蒸馏水中漂洗。除了另有说明的地方,所有试验及其阐明的结果均利用成熟果(开花期后达20周),所有试验均重复三次(每重复包括15个棕果)。

贮藏处理 果实按规定贮藏期限于一系列恒定温度下贮藏于冷藏箱或恒温箱中,温度变化范围为从-80℃到30℃。温度的监控使用绘图记录仪,在所有情况下,其波动幅度

不超过 0.5℃。在指定时间的最后,果实中的酶经在调至中—高档的微波炉中加热 5 分钟而被钝化。

需要比较低的温度时,就象在有关部分所述的那样,将果实浸没在液氮中贮藏。

油的提取 物理法提取:酶经钝化后,将果实置于压热器中于 15 磅/英寸² 下软化 10 分钟,然后用手压机榨出其油。

化学法提取 采用 Folch 等(1957)的程序。经用氯仿/甲醇溶液(2:1,v/v)反复抽提数次从中果皮薄片中获得脂类组分。其操作于夜间常温(28℃)下进行。

游离脂肪酸的测定 用滴定法。取 1g 油溶解于 40cm³ 中和异丙醇之中,将此混合物加热到大约 40℃,用 0.1M 氢氧化钠滴定。中果皮的 FFA 含量用棕榈酸所占百分率表示,棕仁油的 FFA 含量则用月桂酸所占百分率表示(American Oil Chemist's Society Official Method, Ca 5a-40,1989)。

甘油酯分析 加 1.0cm³ 三甲基甲硅烷基咪唑(TSIM)于 50mg 油中使其甲硅烷基化。甘油酯及脂肪酸甲硅烷脂的分析采用气相色谱法(Perkin Elmer)。以 OV 1 为固定液按 3%涂渍于硅藻土担体(100—120 目)之上。填充柱规格:0.4m×1.0cm。以氮为载体,其流速 80cm³/分。进样器及检测器温度分别为 280℃和 370℃。柱温度为 160~345℃,按程序升温,每分钟 5℃。用三癸酸甘油酯(C30)作为内标。

电解质渗漏 将分别于 28℃(常温)、5℃和 -20℃下以及于液氮中恒温处理一夜之后的油棕果复置于室内温度之下。从每一处理中选出 7 个大小相似的果实(总重 57.06~57.98g),去掉其外果皮,分别置于 90cm³ 0.4M 的甘露醇之中,保持在常温下,6 小时后测定悬浮溶液的导电性。然后将果实置于压热器中于 121℃下维持 15 分钟,再测定一次(作为 100%电解质渗漏)。

胡萝卜素测定 准确称取 0.1g 油(精确到 0.0001g)于 -25cm³ 的容量瓶中,用异辛烷定溶,测定溶液在 446nm 处的吸收率。胡萝卜素含量(用每克油含 β~胡萝卜素的微克数表示)按如下公式计算:

$$\frac{25 \times 383(a_s - a_b)}{100W}$$

这里 a_s 为样品吸收率; a_b 为比色杯误差(即空白);W 为样品的克重(PORIM Test Methods,1988)。

磷的分析 用原子吸收分光光度法测定总的磷含量(Perkin Elmer)。测定时采用 Ismail 等(1987)所述的石墨炉法。

乙烯的检测 将棕果密封于聚丙烯袋中,于 5℃及室温下过夜。然后将贮藏于 5℃下的果实复置于室温下。用一密封的注射器按一规定量从塑料袋里的空气中取出样气,用气相色谱法(Shimadzu)进行分析。采用游离脂肪酸相(FFAP)毛细管柱(长 50m,内径 0.25mm)。以氮为载体,其流速 1.0cm³/分。进样器及检测器温度均 120℃。柱温度为 40~80℃,采用程序升温控制,每分钟 5℃。利用这种方法可以检测出含量低至 0.01mm³/dm³ 的乙烯。

用商品乙烯气作为外标。

结 果

温度对 FFA 水平的影响 图 1 显示了果实于不同温度下处理一夜之后其 FFA 水平的变化。在温度高于 15℃ 时, FFA 水平较低(0~10%), 当温度低于 15℃ 时, FFA 含量则有一个稳定的增加, 并在 5℃ 时达到 70% 的最高值。这一结果显示出了低温导致了某种脂肪酶的活化。对于这种高的酯解活性也可以认为是由于低温下物理构象发生变化, 增加了底物的有效性所致。当然, 所观察到的结果也可能是由于膜损伤所导致的膜束缚酶的释放而引起。不过, 如果存在这种情况, 那么用冰点或冰点以下温度贮藏后, 预计将观察到更高的酯解活性, 因为在这些温度下, 膜损伤更严重。对于在液氮中贮藏过夜的油棕果, 紧接着将其中一部分取出置于工作台上直达室内温度, 一部分立即浸入自来水(28℃)中使其迅速解冻。另外还有一组果实则用迅速冰冻并解冻的方法反复处理多次。以上三种不同处理, 其 FFA 水平分别为 25%、27% 和 27%。迅速冰冻及解冻会引起中果皮膜系统的严重损伤, 就象根据电解质渗漏现象以及果实的外观变化所观察到的一样。然而, 这些受到严重损伤的果实其 FFA 含量并不象经过用 5℃ 温度处理的果实那样高。因此, 更有可能的情况是, 的确有一种酶在低温下被活化, 在 5℃ 时其活性最高。

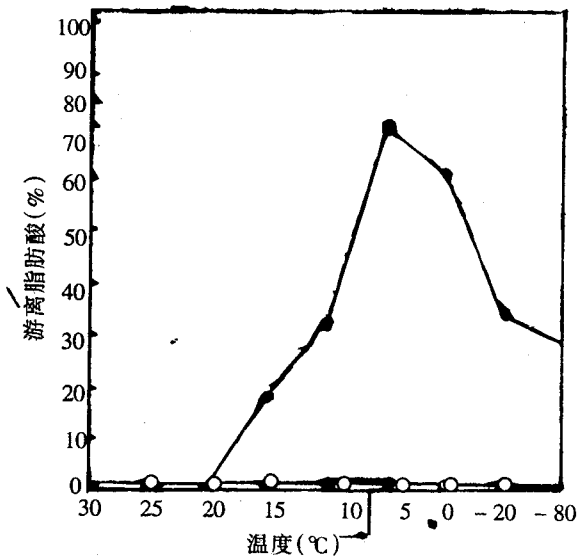


图 1 油棕中果皮(●)及棕仁(○)其游离脂肪酸水平随温度的变化

果实于液氮中贮藏后再用以上三种不同方法进行处理, 其 FFA 水平非常接近, 这表明 FFA 水平不是决定于受伤的程度, 而是决定于温度条件。

试验中, 还将于不同温度下贮藏过夜的果实的棕仁取出, 用 Folch 的方法提取出棕仁油。图 1 显示出降低温度并不增加棕仁中的 FFA 水平。看来这一现象只存在于中果皮之中。

用物理或化学方法提取的中果皮的脂类组分其 FFA 含量相似, 就随后的试验, 使用物理压榨法提取其油分。

冷冻的油棕果其伤害的进一步发展 本试验除用肉眼观察以外, 还根据电解质渗漏

的变化来评估油棕中果皮所受的冷冻伤害。置于 5℃ 下过夜的果实其电解质渗漏量显著增加(从 33% 到 62%)(表 1)。置于冰点以下温度的果实其电解质渗漏量增加更为显著(于 -20℃ 下贮藏的果实为从 33% 到 82%, 于液氮中贮藏的果实为从 33%~100%)。尽管存在较高的电解质渗漏量,其膜伤害也因此而更严重,但用冰点以下温度处理的果实其 FFA 水平始终低于用 5℃ 温度处理的果实。肉眼观察也表明置于冰点以下温度的果实其膜伤害比贮藏于 5℃ 下的果实更为严重些。

表 1 置于不同温度下过夜的油棕果实其电解质渗漏测定结果

温 度	导电力 (西门子(s)/cm)	经高温高压处理后的 导电力 * (s/cm)	电解质渗漏 百分率
常温(28℃)	266	811	33
5℃	521	834	62
-20℃	675	825	82
液氮	820	823	100

*: 高温高压处理后测得的值作为 100% 导电力。

解冻时间对游离脂肪酸含量的影响 将 5℃ 及 -20℃ 下贮藏过夜的果实紧接着置于室温下不同长度的时间。就象图 2 所示的那样,用 5℃ 贮藏的果实其 FFA 含量甚至在

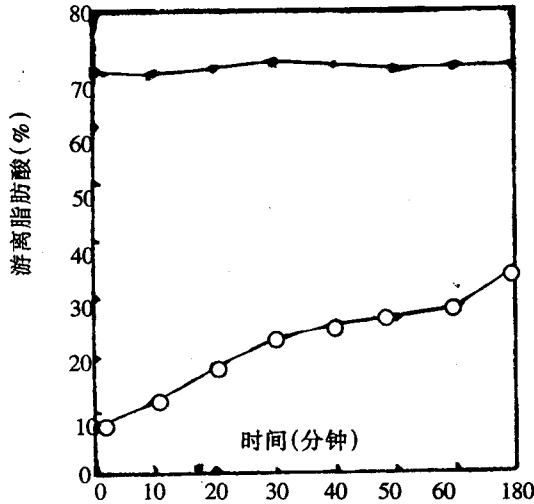


图 2 解冻时间对最初于 5℃(●)及 -20℃(○)下贮藏的果实其游离脂肪酸水平变化的影响

果实被置于室温下以前就已经达到最高水平。可是,于 -20℃ 下贮藏的果实在解冻时间为零时其 FFA 含量低于 10%, 随着时间的延长才逐渐增加。在冰冻的果实中,其酶的活性很低,但随着果实温度的增加(随解冻时间的延长),直到大约 5℃ 或稍高时,酶的活性增强。这些结果充分表明在 5℃ 时酶是活化的。即使底物有效性的增加有助于提高 FFA 水平,也仍然需要有 5℃ 时的这种高脂解活性以从有效底物中释放出 FFA。

油棕果年龄对游离脂肪酸含量的影响 本试验测定了油棕果在花开期之后的周数(WAA)各不相同其中果皮的 FFA 含量(图 3)。在 WAA 为 16 时,第一次观察到冷冻

处理(5℃)增加 FFA 水平的效果。随着果实的成熟,效果更加显著。当 WAA 为 21 时,达到其最高值。这显示了酯解活性与三酰甘油酯生物合成的同步化。油棕中果皮内三酰甘油酯的生物合成开始于 WAA 为 16 的时候,并在 WAA 大约为 20 时达到最高值(Oo 等, 1984)。当 WAA 超过 21 时,果实则变得过度成熟,然后开始腐烂。试验中还观察到当 WAA 超过 21 时,用 5℃ 处理的果实其酯解活性出现下降。然而,贮藏于室温下的果实,在 WAA 为 16~20 期间,其 FFA 水平很低,当 WAA 超过 21 时,表现出缓慢而稳定的增加,直到 WAA 为 24 时,其 FFA 水平才比得上于 5℃ 下贮藏的果实。这些结果表明未受伤果实中的脂肪酶在常温下未被活化。当 WAA 超过 21 果实开始腐烂果时,其 FFA 含量的增加可能是由来自微生物的脂肪酶所引起。

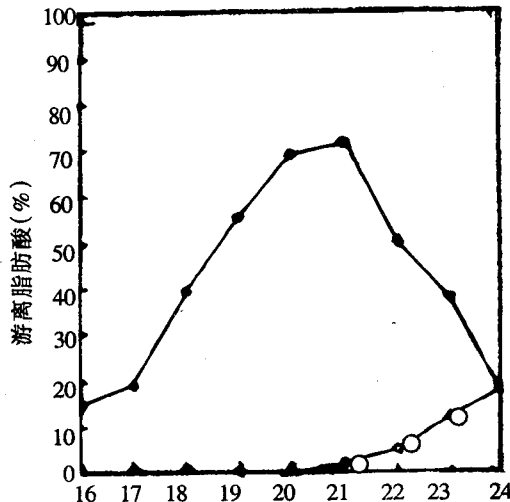


图3 油棕果的年龄对贮藏于 5℃(●)及室温(28℃)(○)下的果实其游离脂肪酸水平变化的影响

受伤对 FFA 水平的影响 碾压油棕果使其中果皮严重受伤,紧接着置于常温下过夜,对这种受伤果实进行分析的结果表明,其 FFA 含量仅为 13%。

脂类物质的成分 表 2 显示了从贮藏于 5℃ 及常温(28℃)下过夜的果实中提取的脂类组分其甘油酯(及 FFA)的含量。这些结果为通过气相色谱分析获得。用该方法测出的 FFA 含量与用氢氧化钠滴定法所测得的结果非常一致(图 1)。

从总的成分来看,贮藏于 5℃ 下的果实其单酰基甘油(MG)和甘油二酯(DG)水平低(分别为 0.2% 和 2.4%),而甘油三酯(TG)和 FFA 水平高(分别为 26.4% 和 71%)。这表明脂肪酶相对说来是非特异性的,即它能在甘油三酯分子中三个位子中的任何一个上使其酰基连接发生断裂。然而从单一成分来看,含 52 个碳和 54 个碳的 TG 类分子在低温下显然比其它 TG 类分子更容易发生脂解作用。贮藏于常温及 5℃ 下的果实其 TG 水平之间的相对差异显示了 TG 分子水解的程度。含 52 个碳的棕油类主要由 POO(棕榈酰油酰基)组成,并含有少量的 OPO(Tan, 1979),而含 54 个碳的一类则主要由三油酸甘油酯(OOO)组成。这样看来,该酶对于主要包含油酸的甘油三酯分子存在着一定程度的专一性。这也许可以用这样一个事实来解释,即在低温条件下,这些甘油三酯类比那些主要由棕榈酸组成的甘油三酯更富于流动性,因而就更容易被水解。

表2 从5℃及常温(28℃)下贮藏过夜的果实中提取的中果皮脂类物质的成分

脂类组分	种 类	各成分的百分率(重量%)			
		低温处理 (5℃)	常温 (28℃)	绝对差异 (28℃与5℃之间)	相对差异
甘油三酯	C44	~	0.1	0.1	
	C46	0.7	1.3	0.6	
	C48	5.3	6.8	1.5	22.1
	C50	15.9	39.0	23.1	59.2
	C52	3.9	41.0	37.1	90.5
	C54	0.8	11.0	10.2	92.7
	C56	~	0.2	0.2	
	总的	26.4	97.0	70.6	72.8
甘油二酯	C32	0.6	0.4	-0.2	
	C34	1.4	1.5	0.1	
	C36	0.4	0.5	0.1	
	总的	2.4	2.6	0.2	
单酰基甘油	总的	0.2	0.3	0.1	
游离脂肪酸	C12	—	N.D.		
	C14	—	N.D.		
	C16	28.5	N.D.		
	C18	42.5	N.D.		
	总的	71.0	0.1	-70.9	

— 二未能检测出; N. D. = 未做

胡萝卜素含量 观察表明,用冰点以上低温处理的果实其胡萝卜素含量显著下降,在常温(28℃)下贮藏过夜的果实其油的胡萝卜素含量为425 μ /g。而在5℃下贮藏过夜的果实仅为259 μ /g,在冰冻的果实中未观察到这种现象。于-20℃及-80℃下贮藏过夜的果实其胡萝卜素水平分别为435和423 μ /g。胡萝卜素的氧化可以被脂肪氧化酶催化。低温诱导的脂肪氧化酶的活化还需进一步研究。

为了进一步检验游离脂肪酸作为一种自动催化剂从而使FFA增加或使胡萝卜素下降的可能性,加0.5g棕榈酸于5g天然棕油中,于室温下保持1个小时。FFA分析表明,除了外加的棕榈酸之外,其酸度没有任何增加,胡萝卜素含量也无变化。

磷含量 低温处理后的油棕果其总的脂溶性磷水平比用常温处理的果实更高(表3)。要确定这种磷水平增加的原因还需要进一步的研究。已经知道,在油棕中果皮中存在磷脂酶D活性(Goh等,1982),并且不可忽视在低温下该磷脂酶活性的加强。不过,由于还未确定出这种脂溶性磷的准确特征,因而有关磷水平增加的原因上也就不可能得出明确的结论。

表3 从油棕中果皮提取的油其总的磷水平

温 度	磷水平(根据重量)(mg/dm ³)
常温(28℃)	10
5℃	62

乙烯的影响 水解活性的增加及胡萝卜素含量的降低可以被看作是衰老诱导的结果。由于乙烯通常与成熟及衰老紧密相联系,故研究了低温通过增加乙烯产生量从而诱导衰老效果的可能性。不管是于5℃下贮藏过夜的果实还是那些于常温下贮藏的果实,利用毛细管气相色谱分析均未检测出其乙烯的产生。此外,在常温下置于乙烯中达3小时的果实也未出现低温处理的效果。

讨 论

我们的发现表明,在增加脂解活性方面,低温较之受伤起着一种更富戏剧性的作用。就象本文中所述的那样,甚至严重损伤果实(常温下)也只能使其FFA水平增加到13%。这与Desassis(1957)的报道形成对照,据他的观察,在油棕果被碾压受伤后5分钟之内,其FFA水平可达30%以上。这样看来,受伤本身并不是导致高FFA水平的原因,而多种因素的配合,即与受伤伴随的真菌侵入及过度成熟一起导致了所报道的这种高FFA水平。

电解质渗漏是一种通常被用来指示质膜因受低温胁迫而导致的物理损伤的参数。然而,尽管存在这样一个事实,即冰冻后又随即置于常温下的果实比贮藏于5℃下的果实表现出更高的电解质渗漏量,但前者的FFA含量却低于后者。这再次表明增加的脂解活性不能单独归因于膜损伤。这些结果显示了在低温下某种脂肪酶的活化,而不是由低温诱导的膜破裂所引起的膜束缚酶的释放。

Minorsky(1985)假定低温可以导致细胞溶质中 Ca^{2+} 浓度的迅速增加,而这又可以导致脂肪酶的活化。Kaniuga等(1978)在低温敏感植物冷冻处理期间的叶绿体中曾观察到FFA的积累。Genzel等(1988)也指出,低温敏感番茄经冷藏后其叶绿体中半乳糖脂酶的活性有所提高,其FFA水平也因此而增加。

有充分的证据说明脂肪酸成分和含量的改变是植物对于环境温度改变在表型上的一种反应。当生长温度降低时,通过磷脂及脂肪酸成分的改变,可使其膜的最适流动性及最佳功能状态在新的温度下得以保持。在成熟的大豆种子中,磷脂(Dornbos等,1989)及甘油三酯(Wolf等,1982)两者的脂肪酸成分都可因生长温度的变化而发生改变。Wolf等(1982)指出,温度对甘油三酯的脂肪酸成分有强烈影响,即随着温度的改变,亚麻酸及亚油酸显著减少而油酸增加,棕榈酸及硬脂酸保持不变。Cheesbrough(1989)指出,正在发育的大豆种子中,有关脂肪酸生物合成的几种酶其活性可以发生改变以适应环境温度的变化。然而,脂肪酸生物合成的改变,即脂肪酸合成的加强及伴随的甘油三酯脂化作用的下降,不可能就是在受低温胁迫的果实中所观察到的很高FFA水平(>70%)的原因。FFA含量的增加只能归因于脂解活性的加强。

Parkin等(1989)描述过黄瓜中由冷冻诱导的脂类化合物的降低。他们的结果指出,黄瓜经冷藏后其磷脂酶D的活性得到加强,在本文所述的这一工作中,观察到油棕中果皮在冷藏之后其脂溶性磷含量有所增加。对于低温诱导油棕果中果皮磷脂酶D活性的可能性还需进一步研究。

Yoshida 等(1973)报道环境温度显著地控制着脂类代谢。他们指出,磷脂酰胆碱及磷脂酰乙醇胺与环境温度呈反相关,而 TG 含量则随温度的下降而下降。磷脂和 TG 含量对于低温的这种相反的反应显示出它们之间可能存在着互变现象。与此相反,在本文中所观察到的脂溶性磷含量的增加也可以用 TG 对磷脂的转变来解释。

象在冷冻的油棕中果皮中所观察到的这种水解活性的增加及膜透性的改变通常是与成熟和衰老联系在一起的。有充分的证据证明衰老期间脂类物质的降解。对于番茄膜系统上脂类物质降低(Kalra 等,1973),质体膜上脂类下降(Galliard,1968),正在成熟的苹果中磷脂酰胆碱增加(Bartley,1984)以及正在成熟的香蕉其膜系统上脂类化合物未饱和程度增加(Wada 等,1978)等现象都已有有人作过阐述。Dhindsa 等(1981)证实了处于衰老中的叶片其膜系统透性的增加及脂类过氧化物作用的加强。这样看来冷冻处理油棕中果皮所诱导的结果与衰老相似。不过,在试验中并未检测出通常会引起成熟及衰老后果的乙烯的释放。

由于油棕是一种热带作物,这种由冷冻诱导的酶其生理意义还不清楚。已经知道,在进化上适应于温暖环境的植物种类容易受到冰点以上低温的危害。对于低温处理后出现特异蛋白质的合成这一现象,已在各种植物中得到充分证明(Cooper 等,1988;Graham 等,1982),而且一般认为这些应激蛋白质的功能就是调节代谢作用,维持其体内的平衡。几乎有理由可以这样认为,在油棕果中所观察到的由低温诱导的脂解活性是对低温作出反应的应激蛋白质合成的结果。目前正在努力从油棕中果皮中分离出具低温活性的脂肪酶的工作,并且初步的研究表明该酶位于油质体上。曾报道过在油棕中果皮内缺乏内源脂肪酶的几个研究者很可能未检测出这种酶的存在,因为他们分析的是中果皮的可溶性部分,而不是脂类主体级分。

田郎译自《Journal of Experimental Botany》Vol. 42, No. 242, PP. 1199—1205, September, 1991。
殷寿华校。

(上接第 48 页)

以获得优质产品,这些结果证明了规模化的体细胞胚微繁殖技术是可行的,它在短期内提供了一个快速有效地获得优良栽培材料的途径。由于组培耗资小,并能供应强根壮苗,它为栽培者提供了更有吸引力的繁殖手段。微繁殖代替了传统的繁殖方式,尤其是代替了使用种子繁殖。所以建议,若想获取优良的栽培材料,应尽可能采取微繁殖手段。

刘华清译自《Principes: Journal of The International Palm Society》1995, 39(1): 47—52, 邹寿青校。