

2,4-二硝基苯酚对采后龙眼果脂氧合酶活性和膜脂脂肪酸组分的影响

陈莲^{1,2}, 陈梦茵¹, 林河通^{1*}, 陈艺晖¹, 林艺芬¹, 陈绍军¹

(1. 福建农林大学食品科学学院, 福州 350002; 2. 漳州职业技术学院食品与生物工程系, 福建 漳州 363000)

摘要:以‘福眼’龙眼(*Dimocarpus longan* Lour. ‘Fuyan’)果实为材料,研究呼吸解偶联剂2,4-二硝基苯酚(DNP)对采后果脂氧合酶(LOX)活性、膜脂脂肪酸组分和细胞膜透性的影响及其与果皮褐变的关系。结果表明: DNP处理导致龙眼果皮细胞膜透性、LOX活性和褐变指数增加,膜脂脂肪酸组分中的棕榈酸(C_{16:0})、硬脂酸(C_{18:0})等饱和脂肪酸的组分增加,亚油酸(C_{18:2})、亚麻酸(C_{18:3})和花生一烯酸(C_{20:1})等不饱和脂肪酸的组分下降,脂肪酸不饱和指数和脂肪酸不饱和度下降。因此认为,DNP促进了龙眼果实果皮褐变可能是由于提高了LOX活性,促进了膜脂不饱和脂肪酸的降解而引起膜系统完整性受损,最终导致细胞膜结构的破坏,使酚酶与酚类物质接触而引起酚类物质氧化的结果。

关键词:龙眼; 褐变; 脂氧合酶; 脂肪酸; 细胞膜透性; DNP

中图分类号: Q945.66

文献标识码: A

文章编号:1005-3395(2009)05-0477-06

Effects of 2,4-dinitrophenol on Lipoygenase Activity and Fatty Acid Constituents of Membrane Lipids in Pericarp of Harvested Longan Fruits

CHEN Lian^{1,2}, CHEN Meng-yin¹, LIN He-tong¹, CHEN Yi-hui¹, LIN Yi-fen¹, CHEN Shao-jun¹

(1. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2. Department of Food Science and Biological Engineering, Zhangzhou Vocational Technical College, Zhangzhou 363000, China)

Abstract: The effects of 2,4-dinitrophenol (DNP, a uncouple agent for respiratory) on lipoygenase (LOX) activity, fatty acid constituents in membrane lipids and cellular membrane permeability in harvested longan (*Dimocarpus longan* Lour. ‘Fuyan’) pericarp were investigated and the relationship to pericarp browning was analysed. The results showed that the cellular membrane permeability, LOX activity and browning index increased treated with DNP, the saturated fatty acids, such as palmitic acid (C_{16:0}) and stearic acid (C_{18:0}) increased, and the unsaturated fatty acids, such as linoleic acid (C_{18:2}), linolenic acid (C_{18:3}) and (C_{20:1}), and index of unsaturated fatty acids (IUFA) and unsaturation degree of fatty acids decreased. It suggested that the pericarp browning of longan induced by DNP might be due to increasing LOX activity, enhancing degradation of membrane unsaturated fatty acid and reducing integrity of cellular membrane, which it lead to finally the contact of phenolase with phenolic substrates to produce browning polymers.

Key words: *Dimocarpus longan* Lour.; Browning; Lipoygenase; Fatty acid; Cell membrane permeability; 2,4-dinitrophenol

收稿日期:2009-02-16

接受日期:2009-05-18

基金项目:国家自然科学基金项目(30200192, 30671464); 国家科技支撑计划专项(2007BAD07B06); 福建省自然科学基金项目(F0310023, B0510019, 2008J0044); 福建省重点科技项目(2006S0003); 福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划(闽教科[2007]20号)资助

* 通讯作者 Corresponding author

龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)属于非呼吸跃变型果实,其果实夏季成熟,代谢旺盛,加上形态结构特殊,采后品质易劣变,表现为果皮褐变、果肉自溶,之后逐渐变质至完全腐烂,其中果皮褐变是最为突出的问题^[1-2]。因此,有必要深入研究龙眼采后果皮褐变的生理机制,以改进采后处理技术,从而延长果实保鲜期。有研究表明,正常果实存在酚类物质和酚酶,但由于液泡中的酚类物质和酚酶的区室化分布而不发生褐变^[3-4]。在果实褐变中膜系统经历了氧化分解,流动性下降,区室化功能被破坏,导致酚类物质氧化聚合,导致组织褐变^[5-6];而细胞膜系统区室化功能的破坏是导致果实采后褐变的关键^[2,7]。林河通等^[8]的研究表明,采后失水引起龙眼果皮褐变与细胞膜系统膜脂过氧化作用加强、细胞膜结构完整性破坏密切相关;而采用聚乙烯薄膜袋密封包装处理可减轻龙眼果皮膜脂过氧化作用、保持细胞膜结构的完整性,从而抑制龙眼果皮褐变的发生。胡位荣等^[9]报道,由脂氧合酶(LOX)主导的膜脂过氧化作用引起的膜结构破坏可能在荔枝(*Litchi chinensis*)果实褐变中起重要作用。Jackson等^[10]报道,经呼吸解偶联剂 2,4-二硝基苯酚(DNP)处理后的大麦(*Hordeum vulgare*)根膜脂脂肪酸中的棕榈酸(C_{16:0})和油酸(C_{18:1})含量增加,亚油酸(C_{18:2})和油酸(C_{18:1})的比值降低。由于脂类是细胞膜的主要组成部分,细胞膜脂肪酸成分的变化可能会改变膜的生物物理和生物化学特性,改变膜区室化功能和细胞膜透性。目前,有关龙眼果皮褐变与细胞膜脂肪酸组分变化关系的研究未见报道。本文以‘福眼’龙眼果实为材料,研究呼吸解偶联剂 2,4-二硝基苯酚(DNP)对采后龙眼果皮脂氧合酶(LOX)活性、膜脂脂肪酸组分和细胞膜透性的影响及其与果皮褐变的关系,旨在了解 DNP 在果皮褐变中的作用,为阐明龙眼采后果皮褐变发生的生理机制提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料和处理

以约九成熟的福建省主栽名优龙眼品种‘福眼’(*Dimocarpus longan* Lour. ‘Fuyan’)果实为材料,采自福建省南安市龙眼科技示范场。果实采收当天运至实验室(福州),选择大小均匀、色泽一致、无病虫、无损伤的健康果实进行处理:① DNP 处理:果实用 0.1 mmol/L 的 DNP 处理 0.5 h;② 对照:果实用蒸馏水浸泡 0.5 h,晾干后用 0.015 mm 厚的聚乙烯薄膜袋密封包装,每袋装果 50 个,每一处理

重复 3 次共 60 袋,在 28℃ 下贮藏。

1.2 果皮褐变评价

参照林河通等^[11]的方法。每次随机取 50 个果实,按照果皮内表面褐变面积大小把果皮褐变程度分为 6 级:1 级:褐变面积为 0;2 级:褐变面积 < 1/4;3 级:1/4 ≤ 褐变面积 < 1/2;4 级:1/2 ≤ 褐变面积 < 3/4;5 级:3/4 ≤ 褐变面积 ≤ 1;6 级:全部褐变。果皮褐变指数 = Σ(褐变级数 × 该级果数)/总果数。

1.3 果皮细胞膜透性测定

参照 Autio 等^[12]的方法,从 10 个果实中取果皮的圆片(直径 5 mm)30 个,加重蒸馏水 25 mL,25℃ 放置 3 h,搅拌均匀后以 DDS-IIA 型电导仪测定浸出液的电导度(C₁);随后再将果皮及浸出液回流煮沸 30 min,冷却后加重蒸馏水至 25 mL,搅拌均匀后测定果皮全渗电导度(C₂)。用相对渗透率表示果皮细胞膜透性大小。相对渗透率(%) = (C₁/C₂) × 100%

1.4 脂氧合酶(LOX)活性测定

按照陈昆松等^[13]的方法测定,结果以 OD₂₃₄ mg⁻¹ protein min⁻¹ 表示。

1.5 膜脂脂肪酸组分测定

参照苏维埃等^[14]的方法,将果皮在 100℃ 下钝化脂酶 10 min,称取 0.25 g 置于 10 mL 具塞试管中,加 2 mL 苯-石油醚(1:1, V/V),振摇 16 h 后,离心取上清液,再加 2 mL 0.1 mol/L KOH-甲醇溶液(1:1, V/V),振摇 10 min 后再加饱和 NaCl 至 10 mL。抽滤液于 GC-9A 气相色谱仪测定。条件是:20% DEGS 担体,3.0 mm × 2.0 m 石英玻璃柱,FIR 检测灵敏度为 0.015 c g⁻¹。N₂ 流速 50 mL min⁻¹,H₂ 流速 50 mL min⁻¹,空气流速 500 mL min⁻¹,柱温 195℃,进样口温度 240℃。用标准脂肪酸甲酯的色谱峰保留时间定性分析。定量分析采用对各组分峰面积积分,用归一化法计算各组分的百分含量。

1.6 蛋白质含量测定

按照 Bradford^[15]考马斯亮蓝 G250 染色法测定,以牛血清蛋白作标准曲线。

以上各指标测定均重复 3 次,使用 DPS 数据分析软件进行数据统计和差异显著性分析。数据为 3 次重复的平均值和标准误。

2 结果和分析

2.1 果皮褐变指数

由图 1 可知,龙眼果皮褐变指数随贮藏时间的

延长而增加。DNP 处理的果皮褐变指数增加迅速;而对照在 2 d 内缓慢上升,之后较快上升。统计分析表明,经 DNP 处理的龙眼果皮褐变指数显著($P < 0.05$)高于对照。这表明 DNP 处理能显著促进采后龙眼果皮褐变。

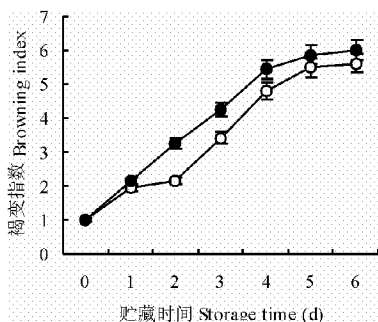


图1 DNP 处理对采后龙眼果皮褐变指数的影响

Fig. 1 Effect of DNP treatment on browning index in pericarp of harvested longan
●: DNP; ○: 对照 Control

2.2 果皮脂氧合酶(LOX)活性

脂氧合酶(LOX)是膜脂过氧化作用中的一个关键酶,能促进脂肪酸的分解^[16]。图2可见,对照果皮 LOX 活性随贮藏时间的延长而增加,在 4 d 内缓慢上升,4~6 d 快速上升。DNP 处理的在 1 d 内快速升高,1~2 d 缓慢上升,2~3 d 快速下降,3~6 d 又快速上升。值得注意的是,DNP 处理在贮藏第 2 天果皮出现明显褐变之前(图1),果皮 LOX 活性快速升高(图2)。统计分析表明,DNP 处理的果皮 LOX 活性除第 3 天外均显著($P < 0.05$)高于对照。这说明 DNP 处理促进采后龙眼果皮 LOX 活性的上升。

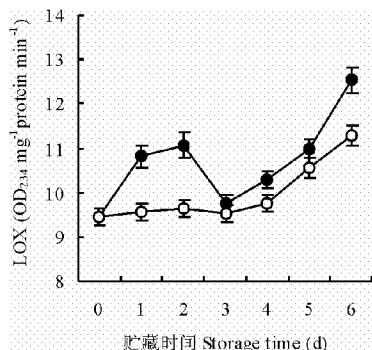


图2 DNP 处理对采后龙眼果皮脂氧合酶(LOX)活性的影响

Fig. 2 Effect of DNP treatment on LOX activity in pericarp of harvested longan fruit
●: DNP; ○: 对照 Control

2.3 果皮膜脂肪酸组分及其比例

脂肪酸是生物膜的重要组成部分,不同脂肪酸的含

量及比例决定着生物膜的稳定性^[17]。采收当天未经 DNP 处理的‘福眼’龙眼果皮膜的脂肪酸组分有棕榈酸($C_{16:0}$)、硬脂酸($C_{18:0}$)、油酸($C_{18:1}$)、亚油酸($C_{18:2}$)、亚麻酸($C_{18:3}$)和花生一烯酸($C_{20:1}$),相对含量分别为 22.4%、3.1%、24.1%、29%、15.7%、5.7%。其中饱和脂肪酸(棕榈酸和硬脂酸)占 25.5%、不饱和脂肪酸(油酸、亚油酸、亚麻酸和花生一烯酸)占 74.5%。棕榈酸($C_{16:0}$)、油酸($C_{18:1}$)、亚油酸($C_{18:2}$)、亚麻酸($C_{18:3}$)是果皮膜脂肪酸的主要组分,占脂肪酸总量的 91.2%。

由图3可知,经 DNP 处理的龙眼果皮花生一烯酸($C_{20:1}$)相对含量在 1 d 内略有上升,之后快速下降,到第 2 天时已经完全降解;油酸($C_{18:1}$)相对含量在 1 d 内快速下降,1~5 d 快速上升,之后下降;亚油酸($C_{18:2}$)相对含量在 2 d 内略有上升,之后快速下降;亚麻酸($C_{18:3}$)相对含量在 3 d 内略有上升,之后快速下降。棕榈酸($C_{16:0}$)相对含量随贮藏时间的延长而上升;硬脂酸($C_{18:0}$)相对含量在 3 d 内的变化很小,之后缓慢上升。

由图3还可看出,对照龙眼果皮的 花生一烯酸($C_{20:1}$)相对含量在 4 d 内略有下降;但 4~5 d 缓慢上升,之后快速下降。油酸($C_{18:1}$)相对含量在 1 d 内快速下降,1~2 d 略有上升,2~3 d 缓慢下降,之后缓慢上升。亚油酸($C_{18:2}$)相对含量在 2 d 内快速上升,之后较快下降;而亚麻酸($C_{18:3}$)相对含量随贮藏时间的延长而上升。棕榈酸($C_{16:0}$)相对含量在 3 d 内略有下降,之后上升,至第 4 天时达到最高值,之后缓慢下降;硬脂酸($C_{18:0}$)相对含量在贮藏期间变化很小。进一步比较可见,贮藏至第 6 天时,经 DNP 处理的龙眼果实的果皮棕榈酸和硬脂酸等饱和脂肪酸相对含量显著($P < 0.05$)高于对照;而亚油酸、亚麻酸和花生一烯酸等不饱和脂肪酸相对含量显著($P < 0.05$)低于对照。

上述结果表明,DNP 处理改变了龙眼果实果皮的膜脂脂肪酸组分,DNP 处理导致龙眼果皮膜脂脂肪酸组分中的棕榈酸($C_{16:0}$)和硬脂酸($C_{18:0}$)等饱和脂肪酸组分增加;而亚油酸($C_{18:2}$)、亚麻酸($C_{18:3}$)和花生一烯酸($C_{20:1}$)等不饱和脂肪酸的组分下降。

膜脂的不饱和程度对膜的流动性起重要的调节作用;而脂质过氧化的直接结果是组成细胞膜的不饱和脂肪酸减少,膜脂的流动性降低^[18]。膜脂脂肪酸不饱和指数(IUFA)和脂肪酸不饱和度是膜脂不饱和程度的两个主要指标。IUFA 是膜脂脂肪酸

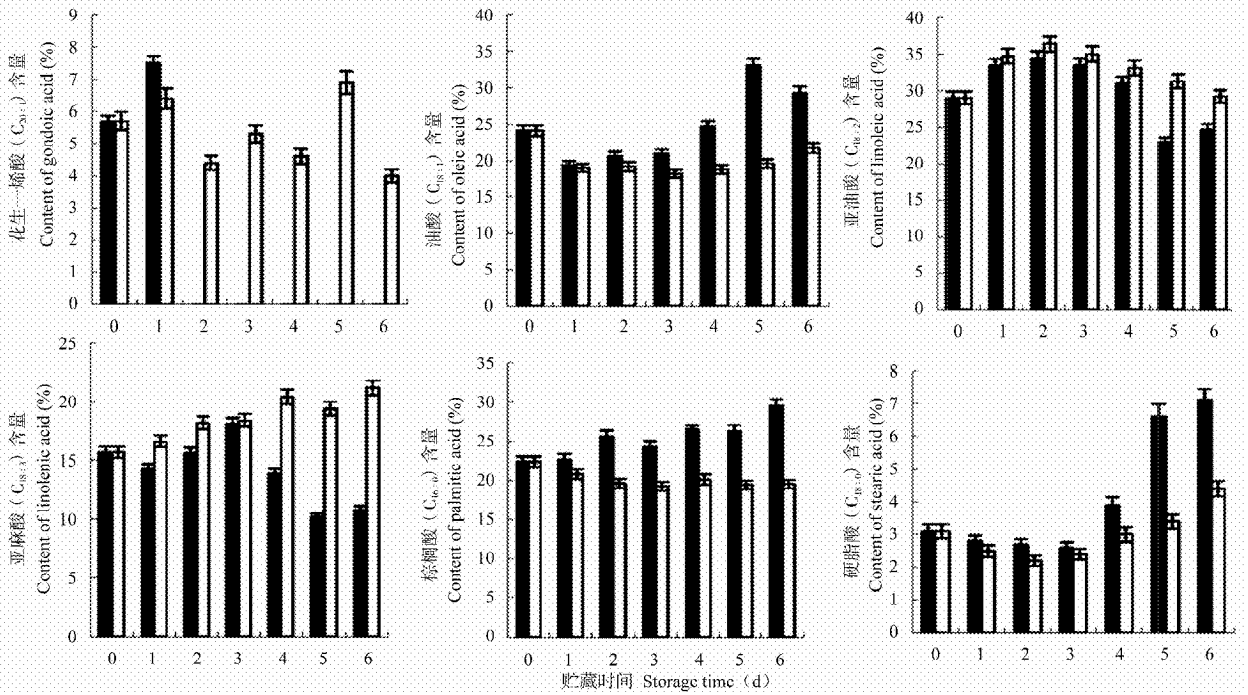


图 3 DNP 处理对采后龙眼果皮脂肪酸组分的影响

Fig. 3 Effect of DNP treatment on fatty acid compositions of membrane lipids in pericarp of harvested longan

■ DNP □ 对照

不饱和程度的综合指标之一。由图 4 可见, DNP 处理的果皮 IUSA 值随贮藏时间的延长而下降, 0~4 d 内缓慢下降, 4~5 d 快速下降, 之后变化很小; 而对照在 2 d 内缓慢上升, 2~3 d 缓慢下降, 3~4 d 缓慢上升, 之后变化很小。统计分析表明, DNP 处理的果皮 IUSA 值显著 ($P < 0.05$) 低于对照。这表明 DNP 处理使果皮膜脂的脂肪酸不饱和程度下降。DNP 处理的龙眼果实贮藏至第 5 天, 果皮已经发生严重褐变 (图 1)。因此, 龙眼果实贮藏 5 d, 果皮膜脂中的大多数易氧化型脂肪酸已经被氧化。

脂肪酸不饱和度是研究脂肪酸不饱和程度的又一重要指标, 可直接反映膜脂脂肪酸的构成和比例的变化。由图 5 可见, DNP 处理的果皮脂肪酸不饱和度随贮藏时间的延长而下降, 2 d 内较快下降, 2~3 d 略有上升, 之后快速下降; 而对照在 2 d 内快速上升, 2~4 d 快速下降, 之后快速上升, 贮藏至第 5 天时达到最高值, 之后缓慢下降。且 DNP 处理的果皮脂肪酸不饱和度显著 ($P < 0.05$) 低于对照, 因此, DNP 处理加速了采后龙眼果皮不饱和脂肪酸的降解, 导致脂肪酸不饱和程度的下降。

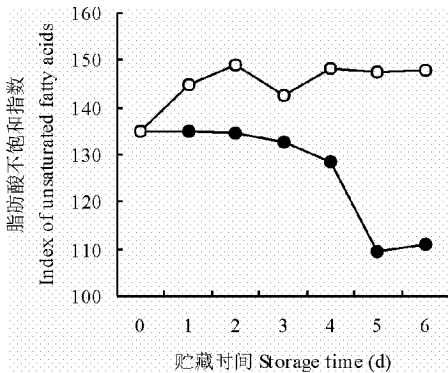


图 4 DNP 处理对采后龙眼果皮脂肪酸不饱和指数的影响

Fig. 4 Effect of DNP treatment on index of unsaturated fatty acids

in pericarp of harvested longan

●: DNP; ○: 对照 Control

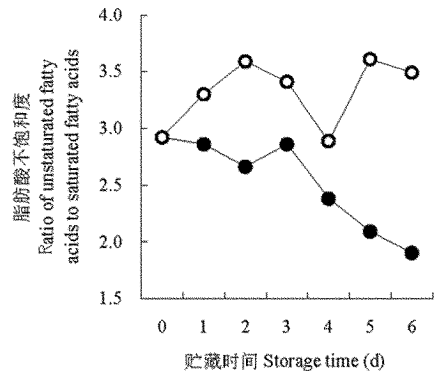


图 5 DNP 处理对采后龙眼果皮脂肪酸不饱和度的影响

Fig. 5 Effect of DNP treatment on unsaturation degree of fatty acids

in pericarp of harvested longan

●: DNP; ○: 对照 Control

2.4 果皮细胞膜透性

细胞膜完整性可用相对渗透率大小表示^[2]。由图6可见,采后龙眼果皮的相对渗透率随着采后贮藏时间的延长而增大。贮藏2 d内,龙眼果皮相对渗透率快速上升,2~5 d上升缓慢,之后快速上升;至第6天,DNP处理和对照的果皮相对渗透率分别为83%和77%,两者差异达显著($P < 0.05$)水平,表明DNP处理可加速龙眼果皮细胞膜结构完整性的破坏。

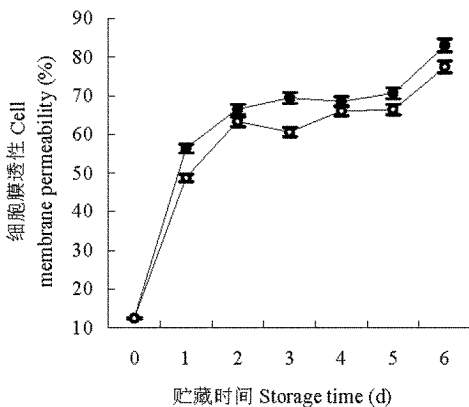


图6 DNP处理对龙眼果皮细胞膜透性的影响

Fig. 6 Effect of DNP treatment on cell membrane permeability in pericarp of harvested longan
●: DNP; ○: 对照 Control

3 讨论

在正常情况下,植物的褐变底物(酚类物质)分布于液泡中,而促进褐变的酚酶(如多酚氧化酶,PPO)则位于质体、线粒体等细胞器内膜和细胞膜及细胞质中,呈区室化分布,防止褐变底物(酚类物质)和酚酶的接触,可避免正常组织中酶促褐变的发生^[2,4]。酚类物质、PPO在细胞中的区室化分布是通过一系列膜系统实现的^[2]。采后果实衰老和失水、低温冷害、热伤害、机械损伤、高CO₂伤害、低O₂伤害、能量亏缺等逆境胁迫可诱导膜脂过氧化作用的发生,改变细胞膜膜脂脂肪酸组分及其饱和程度,加速细胞膜结构完整性的破坏,引起膜系统区室化功能丧失,导致酚酶和褐变底物接触,引起果实褐变发生^[2-4,19]。林河通等^[3,8]报道采后龙眼果皮失水褐变过程中,果皮细胞的膜脂过氧化作用加强,细胞膜透性迅速增大,细胞器和膜系统的完整性受到严重的破坏。采用聚乙烯薄膜袋包装则显著减少果皮失水和抑制果皮褐变,并保持较好的果皮细胞之细胞器和膜系统的完整性^[3]。纯氧处理能抑制荔枝、龙眼果实果皮褐

变,较好地保持果皮细胞器和膜系统的完整性,而且细胞膜透性较低,认为纯氧抑制果皮褐变与其维持细胞膜的完整性有关^[20-21]。延迟气调贮藏(Delayed controlled atmosphere storage)可延缓‘Conference’梨(*Pyrus communis*)果实褐变,这与延迟气调贮藏能保持果实中较高的亚油酸和亚麻酸等多不饱和脂肪酸含量,较好地保持细胞膜结构的完整性有关^[22]。脂氧合酶(LOX)是脂肪酸代谢中的一个关键酶,LOX通过催化亚油酸、亚麻酸等含有顺-1,4-戊二烯结构的多不饱和脂肪酸的迅速氧化而生成过氧氢基脂肪酸,激活膜脂过氧化作用而产生烷过氧基(ROO·)、烷氧基(RO·)等自由基,从而加剧自由基对细胞膜结构的破坏^[16,23]。胡位荣等^[9]报道,用直接或间接维持膜稳定的物质(如脱落酸、亚精胺、1-甲基环丙烯等)处理采后荔枝果实,能降低贮藏期间果皮LOX活性,减轻果皮褐变程度;因此认为,细胞膜结构的完整性对维持酚类物质、PPO在细胞中的区室化分布,避免果实褐变的发生起着重要作用。

本试验结果表明,DNP处理的龙眼果实的果皮LOX活性升高(图2),膜脂脂肪酸组分中的亚油酸(C_{18:2})、亚麻酸(C_{18:3})和花生一烯酸(C_{20:1})等不饱和脂肪酸的组分下降,而棕榈酸(C_{16:0})和硬脂酸(C_{18:0})等饱和脂肪酸的组分增加(图3),脂肪酸不饱和指数(IUFA)(图4)和脂肪酸不饱和度(图5)下降,果皮细胞膜透性(图6)和褐变指数(图1)增加。因此认为,DNP促进龙眼果实果皮褐变可能是由于LOX活性提高,促进了膜脂不饱和脂肪酸的降解而破坏膜系统完整性,最终导致细胞膜结构的破坏,使酚酶(PPO)与酚类物质接触,酚类物质发生氧化的结果。

参考文献

- [1] Jiang Y M, Zhang Z Q, Joyce D C, et al. Postharvest biology and handling of longan fruit (*Dimocarpus longan* Lour.) [J]. Postharv Biol Techn, 2002, 26(3): 241-252.
- [2] Lin H T(林河通), Xi Y F(席筠芳), Chen S J(陈绍军). A review of enzymatic browning in fruit during storage [J]. J Fuzhou Univ(福州大学学报), 2002, 30: 696-703.(in Chinese)
- [3] Lin H T(林河通), Chen L(陈莲), Kong X J(孔祥佳), et al. Effects of packaging on desiccation-induced browning and cellular ultrastructure of pericarp of longan fruits during storage [J]. Trans CSAE(农业工程学报), 2007, 23(12): 237-241.(in Chinese)
- [4] Ju Z G(鞠志国), Zhu G L(朱广廉), Cao Z X(曹宗巽). The compartmentation of polyphenol oxidase and its substrates in relation with fruit browning of Laiyang Chli (*Pyrus bretschneideri* Rehd) [J]. Acta Phytophysiol Sin(植物生理学报), 1988, 14(4): 356-361.(in Chinese)

- [5] Jiang Y M (蒋跃明), Chen M D (陈绵达), Lin Z F (林植芳), et al. Enzymatic browning of banana during low temperature storage [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), 1991, 17(2): 157–163. (in Chinese)
- [6] Huo J S (霍君生), Tong D Y (佟代言), Lin C L (刘彩莉), et al. Changes of superoxidation and endomembrane microviscosity of the core of Ya pears during browning development [J]. *Acta Hort Sin* (园艺学报), 1995, 22(3): 221–224. (in Chinese)
- [7] Jiang Y M (蒋跃明), Fu J R (傅家瑞), Xu L G (徐礼根). Membrane effects in postharvest senescence of horticultural crops [J]. *Guizhou J Bot* (广西植物), 2002, 22(2): 160–166. (in Chinese)
- [8] Lin H T (林河通), Xi Y F (席琦芳), Chen S J (陈绍军). The relationship between the desiccation-induced browning and the metabolism of active oxygen and phenolics in pericarp of postharvest longan fruit [J]. *J Plant Physiol Mol Biol* (植物生理与分子生物学学报), 2005, 31(3): 287–297. (in Chinese)
- [9] Hu W R (胡位荣), Liu S Z (刘顺枝), Zhang Z Q (张昭其), et al. Changes of lipoxygenase activity of postharvest litchi fruit [J]. *J Huazhong Agri Univ* (华中农业大学学报), 2005, 24(3): 285–289. (in Chinese)
- [10] Jackson P C, St John J B. Effects of 2,4-dinitrophenol on membrane lipids of roots [J]. *Plant Physiol*, 1982, 70: 858–862.
- [11] Lin H T (林河通), Chen S J (陈绍军), Xi Y F (席琦芳), et al. Observation on pericarp ultrastructure by scanning electron microscope and its relation to keeping quality of longan fruit [J]. *Trans CSAE* (农业工程学报), 2002, 18(3): 95–99. (in Chinese)
- [12] Autio W R, Bramlage W J. Chilling sensitivity of tomato fruit in relation to ripening and senescence [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1986, 111: 201–204.
- [13] Chen K S (陈昆松), Xu C J (徐昌杰), Xu W P (许文平), et al. Improved method for detecting lipoxygenase activity from kiwifruit and peach fruit [J]. *J Fruit Sci* (果树学报), 2003, 20(6): 436–438. (in Chinese)
- [14] Su W A (苏维埃), Wang W Y (王文英), Li J S (李锦树). The method for analysis of plant lipids and their fatty acids [J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 1980(3): 54–60. (in Chinese)
- [15] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254.
- [16] Chen K S (陈昆松), Zhang S L (张上隆). The role of lipoxygenase in ripening and senescing of fruits [J]. *Acta Hort Sin* (园艺学报), 1998, 25(4): 338–344. (in Chinese)
- [17] Yang F Y (杨福愉). Biomembrane fluidity and functions [J]. *Foreign Med Sci Mol Biol* (国外医学: 分子生物学分册), 1982, 4(4): 151–157. (in Chinese)
- [18] Lyons J M, Raison J K. Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury [J]. *Plant Cell Physiol*, 1970, 45: 386–389.
- [19] Marangoni A G, Palma T, Stanley D W. Membrane effects in postharvest physiology [J]. *Postharv Biol Technol*, 1996, 7: 193–217.
- [20] Duan X W (段学武), Jiang Y M (蒋跃明), Su X G (苏新国), et al. Effects of pure oxygen on browning and ultrastructure of postharvest litchi fruit [J]. *J Trop Subtrop Bot* (热带亚热带植物学报), 2004, 12(6): 565–568. (in Chinese)
- [21] Su X G, Jiang Y M, Duan X W, et al. Effects of pure oxygen on the rate of skin browning and energy status in longan fruit [J]. *Food Techn Biotechnol*, 2005, 43(4): 359–365.
- [22] Saquet A A, Streif J, Bangerth F. Energy metabolism and membrane lipid alterations in relation to brown heart development in Conference pears during delayed controlled atmosphere storage [J]. *Postharv Biol Technol*, 2003, 30: 123–132.
- [23] Gardner H W. Recent investigation into the lipoxygenase pathway of plants [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1991, 108: 221–239.