

BADANIA WIDM FLUORESCENCYJNYCH MIĄŻSZU JABŁEK

A. Kuczyński

Instytut Agrofizyki PAN, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin 27

e-mail: akucyski@demeter.ipan.lublin.pl

Streszczenie. Miąższ owocu dojrzałego jabłka odmiany *Granny Smiths* pod wpływem wybranych pasm UV emituje na charakterystycznych liniach 312 nm, 363 nm, 375 nm, 390 nm, a także w paśmie niebiesko-zielonym, w czerwieni i dalekiej czerwieni.

Porównano, w paśmie niebiesko-zielonym, widmo fluorescencji polifenoli wzbudzonych przez UV z widmem wzbudzenia chlorofilu i stwierdzono, że fluorescencja jest silnie reabsorbowana przez barwniki fotosyntetyzujące – chlorofile i karotenoidy. Zaobserwowano silną absorpcję osłonową, w paśmie zielonym, w widmie wzbudzenia chlorofilu, pochodzącą od antocyjanów, które prawdopodobnie występują w miąższu.

Słowa kluczowe: UV, luminescencja, reflektancja, odbicie, tkanka, *Malus domestica*.

WSTĘP

Współczesna, intensywna produkcja owoców korzysta z zaawansowanych mechanizmów biologicznych, fizjologicznych i w ten sposób reguluje plonowanie, dojrzewanie i trwałość chłodniczą jabłek - jednocześnie dąży do zachowania wysokiej jakości produktu. Wiadome jest, że rośliny reagując na stresy grożące uszkodzeniem ich struktur komórkowych, odpowiadają specyficzną syntezą substancji polifenolowych. Czynione są próby monitorowania i wykorzystania pomiaru stopnia zaawansowania uruchomionych mechanizmów ochronnych w komórkach do oceny skażeń środowiska [2]. Mogą też zostać wykorzystane przy ocenie jakości żywności pochodzenia roślinnego, nowych technologii agrotechnicznych i przechowalniczych.

Do analizy polifenoli w miąższu jabłek stosuje się różnorodne metody fizyczne i fizykochemiczne. Obecnie najbardziej popularna jest chromatografia ekstraktów HPLC z detekcją spektrofotometryczną. Stosowanie spektrofotometrii UV-VIS-IR w roli pojedynczej metody analizy ekstraktów, ze względu na nakładanie się pasm absorpcji i fluorescencji, jest trudne nawet, gdy wykorzysta się do ich oznaczeń specjalnie zmodyfikowane warunki fizykochemiczne [5]. Badania spektrofotometryczne w świetle odbitym od tkanki roślinnej pozwalają jedynie oszacować ogólny skład i przemiany polifenoli [8].

Obszerne publikacje poświęcane są wykazaniu ważnej roli, jaką pełnią polifenole w komórce i żywieniu człowieka. Jednak stwierdza się, że jest mało danych o luminescencji polifenoli [1]. Prezentowane są widma wzorców w roztworach alkoholowych, lecz na ich podstawie, interpretacja fluorescencji ekstraktów z materiału roślinnego, nawet po zastosowaniu rozdzielu chromatograficznego i obserwacji w jednym ciągu widm absorpcji i fluorescencji, jest nadal trudna [6]. Liczne polifenole występują w złożonej postaci np. często tworzą wiązania glikozydowe i już wtedy widmo ulega zmianie. Szerzej wykorzystuje się fluorescencję w chromatografii cienkowarstwowej.

Testy biologiczne korzystają z fluorescencyjnych właściwości któregoś z produktów reakcji enzymatycznej, a to pozwala śledzić przebieg reakcji. Wiele efektów zakłóca pomiary właściwości światła emitowanego przez układ biologiczny. W układzie biologicznym równocześnie emituje wiele fluoroforów i wiele reabsorbuje. Przy silnym wzbudzaniu laserem mogą zachodzić reakcje w stanie wzbudzonym. Dlatego projektuje się nowe związki, używane jako znaczniki, o korzystniejszych właściwościach chemicznych i spektroskopowych, przenikające błony (komórkową, jądra), które są trwałe, nietoksyczne, a ich emisja jest bardzo wydajna i nie zakłócana w układzie. Zwiększenie selektywności metod luminescencyjnych uzyskuje się w układach pomiaru widmowo-czasowych.

W agrotechnice i sadownictwie wykorzystano dotychczas fluorescencję innej grupy - barwników chlorofilowych. Metoda stała się rutynowym testem, wykonywanym także z samolotu. Jest przydatna w badaniu naruszenia równowagi stosunków wodnych, nawożenia, inwazji szkodników – ogólnie stresu w uprawach [4]. Opiera się ona, głównie na pomiarze fluorescencji długofalowej chlorofilu w liściach, lecz dokładniejsze testy korzystają również z pomiaru fluorescencji krótkofalowej niebiesko-zielonej [3, 7].

W literaturze brakuje informacji umożliwiających skorzystanie z metod fluorescencyjnych przy ocenie jakości tkanki jabłka. Celem pracy było zbadanie właściwości fluorescencyjnych powierzchni przeciętego miąższu jabłka i dobra-

nie takich warunków, żeby uzyskać widma charakteryzujące substancje polifenolowe wzbudzone i fluoryzujące w zakresie UV.

MATERIAŁ I METODA

Owoce jabłoni odmiany *Granny Smiths* importowane są do Polski z Argentyny. Zakupiono je z dostawy do sieci supermarketów. Zdecydowano się na odmianę nie uprawianą w Polsce, żeby nawiązać do wyników prac zagranicznych prezentujących badania biochemiczne, fizjologiczne.

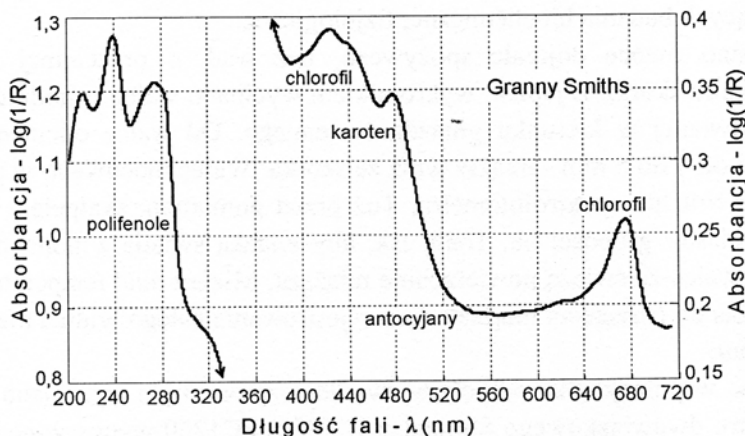
Wybrano owoce dojrzałe spożywczo, bez wad, o przeciętnej wielkości i wybarwieniu skórki. Z jabłek, wykrojnikiem wycinano walec o średnicy 15 mm i osi skierowanej w kierunku gniazda nasiennego. Od walca odcinano plaster o grubości od 4 do 5 mm - miąższ wraz ze skórką. Walec mocowano w przystawce fluorymetru lub spektrofotometru. Tuż przed pomiarem, skalpelem odcinano następny plaster grubości ok. 1 mm, tak, aby wiązka światła z monochromatora padała na walec ze świeżą powierzchnią miąższu. Miąższ miał temperaturę około 18°C, a czas od przecięcia miąższu do zarejestrowania całego widma nie przekraczał 3 minut.

Widma współczynnika odbicia w świetle rozproszonym otrzymano ze spektrofotometru dwuwiązkowego Shimadzu UV-VIS PC1260 wyposażonego w kulę całkującą ISR-260. Stosowano ustawienia: szerokość przesłony wiązki monochromatora 5 nm, przemieszczanie widma od fal długich z prędkością „Medium”. Wartości współczynnika odbicia - $R(\%)$ mierzono w stosunku do 100% wzorca bieli z siarczanu baru i przeliczano na $ABS = \log(1/R)$. Pomiary fluorescencji wykonano spektrofluorymetrem jednowiązkowym z podwójnym monochromatorem siatkowym (Shimadzu RF-5001PC) w układzie wzbudzania czołowego. Ustalono szerokość przesłony: dla wiązki wzbudzającej 5 nm, dla emisji 3 nm, prędkość rejestracji „Medium” i czułość „High”. Wygładzanie widm metodą średniej ruchomej i obliczenia wykonano w arkuszu kalkulacyjnym MS Excel 2000.

WYNIKI I DYSKUSJA

Typowe dla odmiany *Granny Smiths* widmo absorpcji w świetle rozproszonym, odbitym od miąższu jabłka, uzyskane ze spektrofotometru, przedstawiono na Rys. 1. Widać charakterystyczną absorpcję barwników występujących w miąższu: chlorofili, antocyjanów, karotenoidów i polifenoli. Wybrana odmiana cechuje się szczególnie wyraźnym pikiem w paśmie 680 nm, a to świadczy

o dużej zawartości chlorofili. Najsilniejszą absorpcję miąższ wykazuje w UV (dla zakresu UV przyjęto inną skalę na osi ABS, Rys. 1) i spowodowane jest to absorpcją światła zarówno przez wodę jak i bardzo liczną grupę związków np. polifenolowych. Widma rejestrowane są przy monochromatyzacji tylko od strony źródła światła, a więc natężenie wiązki odbitej jest wzmacniane przez świecące fluorofory występujące w miąższu. Wstępne warunki do wzbudzania fluorescencji wybrano w okolicach pików widm absorpcyjnych.



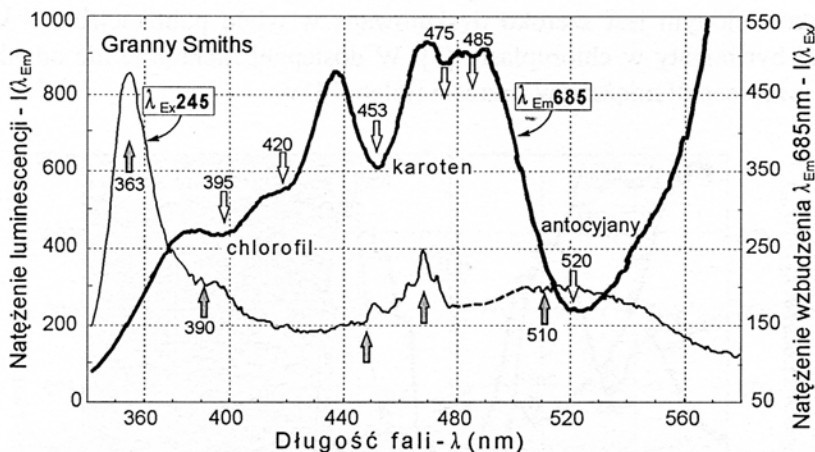
Rys. 1. Widmo absorpcji świeżego miąższu w świetle rozproszonym, odbitym - typowe dla odmiany *Granny Smiths*.

Fig. 1. The representative absorbance spectra of apple flesh cv. *Granny Smiths* against diffuse illumination.

Przebadano warunki wzbudzania i detekcji na jakie pozwalała dostępna aparatura. Ustalając długość fali światła wzbudzającego - λ_{Ex} i mierząc rozkład natężenia luminescencji - $I(\lambda_{Em})$, otrzymywano widmo fluorescencji fluoroforu. Ustalając długość fali dla obserwowanej fluorescencji - λ_{Em} i zmieniając długość fali światła wzbudzającego - λ_{Ex} otrzymywano widmo proporcjonalne do widma absorpcji - jest to tzw. widmo wzbudzenia fluorescencji - $I(\lambda_{Ex})$. Sygnał fluorescencji proporcjonalny jest do stężenia molekuł fluoroforu i na jego podstawie można określić liczbę molekuł.

Oświetlając miąższ monochromatycznie (od 340 nm do 580 nm) wzbudzano świecenie barwników chlorofilowych w paśmie czerwieni - $\lambda_{Em}=685$ nm i dalekiej czerwieni - $\lambda_{Em}=735$ nm. W ten sposób zarejestrowano widma wzbudzania, które mają dwa silne maksima przy 470 nm, 435 nm i znacznie słabsze przy

385 nm (Rys. 2). Zastosowania rolnicze pomiarów luminescencji długofalowej chlorofilu wykorzystują do wzbudzania laser o długości fali 337 nm [3], a więc daleko od maksimum, w którym uzyskuje się najsilniejsze świecenie chlorofilu. Celowo wybrane wzbudzenie pośrednie chlorofilu, z udziałem fluorescencji innych barwników, pozwala zmierzyć nie tylko stężenie chlorofilu z proporcji: emisja w paśmie 685 nm do emisji w paśmie 735 nm, ale również dostarcza danych dla normalizacji wyników pomiaru [4].



Rys. 2. Widma emisji - $I(\lambda_{Em})$ i wzbudzenia fluorescencji - $I(\lambda_{Ex})$ otrzymane ze świeżego mięszu jabłka w zakresie VIS.

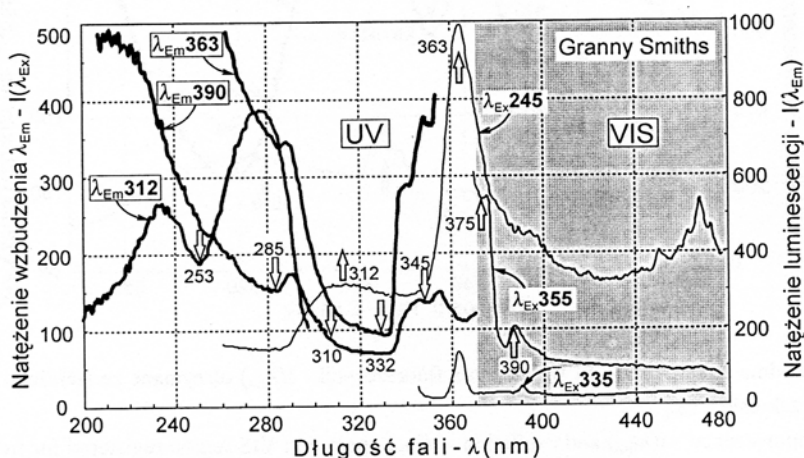
Fig. 2. Fluorescence - $I(\lambda_{Em})$ and excitation - $I(\lambda_{Ex})$ spectra in VIS region registered for fresh apple flesh.

Zaobserwowane w widmie wzbudzenia charakterystyczne doliny przy: 453, 475 i 485 nm, wskazują na absorpcję przez karoten i chlorofil, a także przez chlorofil przy 420 nm i 395 nm. Natomiast dolina absorpcji w widmie wzbudzenia przy 520 nm pochodzi od różnych form antocyjanowych, które efektywnie pochłaniają nadmiar światła bez wypromieniowywania i w ten sposób osłaniają żywe komórki [9].

Widmo emisji wzbudzonej przez $\lambda_{Ex} = 245$ nm, dla łatwiejszego porównania z widmem wzbudzenia chlorofilu, przedstawiono również na Rys. 2. W widmie emisji, pomiędzy 400 nm i 520 nm widoczne są szczątkowe pasma fluorescencji. Pozostały one widoczne, pomimo absorpcji w tym paśmie promieniowania przez chloroplasty - barwniki chlorofilowe i karotenoidowe. Nadmiar energii wyświecany jest przez chlorofil w zakresie długofalowym 735 nm lub 685 nm. Doliny

absorpcji w widmie wzbudzenia (od 395nm do 485nm) i emisja długofalowa chlorofilu wskazują na zachowanie szczątkowej aktywności fotosyntetycznej chloroplastów w miąższu jabłka.

W wyniku poszukiwań optymalnych parametrów wzbudzenia emisji polifenuoli światłem UV, wybrano linie: $\lambda_{Ex}=245$ nm, $\lambda_{Ex}=335$ nm i $\lambda_{Ex}=355$ nm. Pozwalają one zaobserwować (Rys. 3) piki emisji w zakresie ultrafioletu przy 312 nm i 363 nm, emisji w zakresie VIS na 375 nm, 390 nm i tylko szczątkowe piki w szerokim paśmie niebiesko-zielonym. Jednak silna emisja w paśmie niebiesko-zielonym jest szeroko dyskutowana w wielu publikacjach, w których materiał był bogaty w chloroplasty [7]. W dostępnej literaturze nie odnaleziono opisu fluorescencji miąższu w zakresie fioletu i UV.



Rys. 3. Widma emisji - $I(\lambda_{Em})$ i wzbudzenia fluorescencji - $I(\lambda_{Ex})$ otrzymane ze świeżego miąższu jabłka w zakresie UV.

Fig. 3. Fluorescence - $I(\lambda_{Em})$ and excitation - $I(\lambda_{Ex})$ spectra in ultraviolet (UV) registered for fresh apple flesh.

Na Rys. 3 widać, że bardzo efektywna emisja na $\lambda_{Em}=363$ nm i $\lambda_{Em}=390$ nm zachodzi przy wzbudzeniu krótkofalowym poniżej 280 nm. Natomiast wzbudzanie emisji $\lambda_{Em}=312$ nm jest najefektywniejsze w pasmach 270 nm lub 235 nm. Przy efektywnym wzbudzeniu $\lambda_{Ex}=245$ nm w wysokim pikie emisji 363 nm ukrywał się pik 390 nm. Wydzielenie pików 390 nm nastąpiło dopiero przy wzbudzeniu powyżej $\lambda_{Ex}=335$ nm, a przy wzbudzeniu na $\lambda_{Ex}=355$ nm ujawnił się nowy pik emisji 375 nm. Wzbudzeniu krótkofalowemu UV – (Rys. 2 i 3), zawsze towarzyszyła emisja w paśmie niebiesko-zielonym, w czerwieni i w dalekiej czerwieni.

Przedstawione na Rys. 3 widma wzbudzenia mają także charakterystyczne doliny. Wskazują one na występowanie absorpcji - nieznaczne obniżenie wyświecania w badanych pasmach. Może to być wywołane nie zidentyfikowanymi przez nas, związkami polifenolowymi, które absorbowałyby: na 253 nm, 285 nm, 310 nm, 332 nm i na 345 nm.

Przeprowadzona analiza widm wzbudzenia i emisji dowodzi występowania absorpcji aktywnej również w zakresie UV. Absorpcja taka wzbudza wieloskładnikową, lecz w efekcie, dość selektywną fluorescencję w badanym, żywym układzie tkankowym.

PODSUMOWANIE

Do badań fluorescencji wybrano odmianę *Granny Smiths* o specyficznej, zielonej barwie miąższu, którą zachowuje w stadium dojrzałości spożywczej. Badania potwierdziły, znaną z literatury, bardzo silną fluorescencję barwników chlorofilowych w tkankach zielonych.

Wystąpiły liczne efekty reabsorpcji fluorescencji wzbudzonej przez UV. Proces reabsorpcji w zakresie niebiesko-zielonym, ale także towarzyszące temu silne wypromieniowywanie energii w zakresie czerwieni i dalekiej czerwieni wskazuje na szczątkową aktywność chloroplastów w miąższu jabłka. Stwierdzono bardzo silną absorpcję w zakresie czerwieni przez antocyjany i potwierdza to znaną, ochronną rolę przed promieniowaniem, jaką pełnią one także w skórcie.

Widma fluorescencji miąższu różnią się od znanych z literatury widm tkanek fotosyntetyzujących, nowymi i istotnymi szczegółami. U jabłka zaobserwowano nieznane pasma emisji w zakresie światła niebieskiego i ultrafioletu, a także bardzo wyraźne zniekształcenia przez reabsorpcję, w pasmach emisji w zakresie niebiesko-zielonym.

Badania miąższu pozwoliły wybrać korzystne warunki wzbudzenia fluorescencji i wyodrębnić cztery pasma emisji krótkofalowej miąższu. Wydzielanie centrów fluoryzujących związków fenolowych w miąższu jabłka jest utrudnione bo jest ich wiele. Jednak uzyskane ostre piki wzbudzenia i emisji stwarzają obiecujące warunki do kontynuowania badań jakości jabłek. Włączenie metod chemometrycznych do analizy takich widm powinno dać interesujące zastosowania w doświadczeniach sadowniczych i przechowalniczych.

PIŚMIENNICTWO

1. **Drabent R., Pliszka B., Olszewska T.:** Fluorescence properties of the plant anthocyanin pigments. I. Fluorescence of the anthocyanins in *Brasica oleracea* L. extracts. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 50, 53-58, 1999.
2. **Karolewski P., Giertych M. J.:** Influence of toxic metal ions on phenols in needles and root, and on rot respiration of Scots pine seedlings. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 63, 1, 29-35, 1994.
3. **Lang M., Stober F., Lichtenthaler H. K.:** Fluorescence emission spectra of plant leaves and plant constituents. *Radiat. Environ. Biophys.*, 30, 333-347, 1991.
4. **Lichtenthaler H. K., Miehe J. A.:** Fluorescence imaging as a diagnostic tools for plant stress. *Trends in Plant Science*, 2, 8, 317-319, 1997.
5. **Merken H. M., Merken C. D., Beecher G. R.:** Kinetics Method for the Quantitation of Anthocyanidins, Flavonols, and Flavones in Foods. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2727-2731, 2001.
6. **Morales F., Cerovic Z. G., Moya I.:** Time-resolved blue-green fluorescence of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. Spectroscopic evidence for the presence of ferulic acid as the main fluorophore of the epidermis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1273, 251-262, 1996.
7. **Stober F., Lang M., Lichtenthaler H. K.:** Blue, Green, and Red Fluorescence Emission Signatures of Green, Etiolated, and White Leaves. *Remote Sens. Environ.*, 47, 65-71, 1994.
8. **Schulz H., Engelhardt U. H., Wegent A., Drews H. H., Lapczynski S.:** Application of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy to the Simultaneous Prediction of Alkaloids and Phenolics Substances in Green Tea Leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 5064-5067, 1999.
9. **Saure M. C.:** External Control of Anthocyanin Formation in Apple. *Scientia Horticulture*, 42, 181-218, 1990.

A STUDY OF FLUORESCENCE SPECTRA OF APPLE FLESH

A. Kuczyński

Institute of Agrophysics PAS, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin 27

e-mail: akucyski@demeter.ipan.lublin.pl

Summary. The flesh of ripe fruit of *Granny Smiths* apple cultivars, under selected ultraviolet illumination bands, emits in characteristic peaks: at 312nm, 363nm, 375nm, 390nm, and also in the blue-green, red and far-red bands.

In the blue-green region, spectra of fluorescence of phenols excited by UV were compared with excitation spectra of chlorophyll and it was affirmed that fluorescence is strongly reabsorbed by the photosynthetic pigments – by chlorophyll and carotenoids.

Moreover, strong shielded absorption was observed in the green region, in excitation spectra of chlorophyll, derived from anthocyanins which probably occur in the apple flesh.

Keywords: UV, luminescence, reflectance, tissue, *Malus domestica*.