

乙醇对鲜切西兰花抗氧化酶及叶绿体超微结构的影响

韩俊华¹, 周君一², 牛天贵³, 陶炜煜⁴, 蔡同一³, 李全宏^{3,*}

(1. 河北科技大学生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050018 2. 河北省体育科学研究所, 河北 石家庄 050011;
3. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083 4. 中商流通生产力促进中心, 北京 100080)

摘 要: 乙醇(6ml/kg, 5h)处理显著降低了4℃贮藏期间鲜切西兰花失重和叶绿素含量的下降, 促进了抗氧化酶SOD、CAT的活性。对鲜切西兰花叶绿体超微结构的研究表明, 乙醇对叶绿体外膜及内部基粒片层结构均起到保护作用, 减小了贮藏期间叶绿体的破坏程度, 显著延缓了叶绿体结构的解体。

关键词: 乙醇; 鲜切西兰花; 抗氧化酶; 超微结构

Effects of Ethanol Vapor Treatment on Antioxidant Enzyme and Chloroplast Ultrastructure of Fresh-cut Broccoli Florets

HAN Jun-hua¹, ZHOU Jun-yi², NIU Tian-gui³, TAO Wei-yu², CAI Tong-yi³, LI Quan-hong^{3,*}

(1. College of Biological Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China;
2. Hebei Sport Science Institute, Shijiazhuang 050011, China
3. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;
4. Distribution Productivity Promotion Center of China Commerce, Beijing 100080, China)

Abstract: Exposure of 6 ml/kg ethanol vapor to fresh-cut broccoli for 5 h could reduce the weight loss and retard the degradation of chlorophyll significantly at 4 °C. The chloroplast ultrastructure of the sepal in the fresh-cut broccoli florets was investigated with a transmission electron microscope. The results indicated that the ethanol vapor treatment can well maintain the integrity of chloroplast envelope and grana and stromal thylakoids as well. Ethanol vapor treatment can inhibit the decomposition of chloroplast structure during the storage at 4 °C, for retarding the yellowing of fresh-cut broccoli florets.

Key words ethanol; fresh-cut broccoli florets; antioxidant enzyme; ultrastructure

中图分类号: TS255.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)03-0283-05

西兰花(broccoli)又叫青花菜(*Brassica oleracea* L. Var. *Italica*)、绿菜花、嫩茎花椰菜, 是花椰菜的一个变种, 属于十字花科芸薹属甘蓝种的一个变种, 为一、二年生草本植物。原产地中海东部沿岸地区。西兰花的营养价值远远高于一般蔬菜。同时, 西兰花富含4-甲基亚磺酰丁基芥子油苷(glucoraphanin), 具有一定的抗癌作用。西兰花的食用部分为绿色的花球, 其质地鲜绿脆嫩, 风味清爽适口, 然而采后和鲜切后极易衰老, 品质快速下降。西兰花品质降低主要表现在失水和小花的黄化^[1]。前期的研究结果已经表明, 乙醇可以延缓西

兰花的黄化, 延长产品的货架期。本研究将进一步探讨乙醇处理后, 鲜切西兰花在贮藏期间的抗氧化酶活性的变化情况, 以进一步阐明乙醇控制果蔬成熟衰老的机理, 并对乙醇处理后鲜切西兰花叶绿体的超微结构进行观察, 进一步验证该处理浓度是否对叶绿体的结构造成伤害, 以期有效控制西兰花的衰老、保持较长的货架期提供一定的理论依据, 更好的为鲜切西兰花的生产实践服务。

1 材料与方法

收稿日期: 2007-01-12

基金项目: 北京市科委资助项目(H030730060330)

作者简介: 韩俊华(1977-), 女, 博士, 研究方向为食品科学。E-mail: teach2003@126.com

* 通讯作者: 李全宏(1966-), 男, 教授, 博士, 研究方向为农产品加工与贮藏工程。E-mail: liquanhong66@163.com

1.1 材料

西兰花采收后立即放入加冰的聚乙烯泡沫盒,采收后3~5 h内运到实验室,选取大小一致,色泽均匀,无机械损伤和病虫害的使用。当西兰花的温度缓慢接近室温后进行乙醇处理。

1.2 方法

1.2.1 乙醇处理

将挑选的西兰花(约1.5 kg)装入10 L塑料箱(25 cm × 25 cm × 16 cm),外套0.06 mm厚的聚乙烯薄膜,按照2、4、6、8 ml/kg西兰花将95%乙醇(化学纯)加入到90 mm平皿里面,平皿内预先放入一张剪好的滤纸。将平皿放在塑料箱的底部,保证乙醇不接触西兰花,将薄膜口立即扎紧并在四个角分别剪一个小孔(直径1 cm左右),在室温暗处密闭5 h。对照不加乙醇密闭5 h。对照及不同的处理各设三个重复。

之后打开容器,使乙醇挥发1 h。取出西兰花使用 100×10^{-6} 的次氯酸钠,浸泡1~2 min,然后用清水冲洗干净,准备进行鲜切。刀具及板等均用70%乙醇消毒处理。将小花分别从花头上切下(留茎3~4 cm),将3个容器的西兰花切下后混合,用托盘和聚乙烯膜包装(120 ± 5 g),每个处理包装三盒,保证每朵小花来自不同的花球。之后分别在4℃和10℃,90%~95% RH进行贮藏。每次测定在三盒包装里分别取样,每两天取一次。实验重复两次。

1.2.2 失重率

称重法。每两天称重一次。

$$\text{失重率}(\%) = \frac{W_0 - W_t}{W_0} \times 100$$

式中, W_0 为鲜切西兰花的初始质量; W_t 为贮藏过程中某时刻的质量。

1.2.3 叶绿素

采用比色法^[2]测定。

1.2.4 超氧化物歧化酶(SOD)的提取及活性测定

参考Prochazkova等的方法并稍做修改^[3]。取4 g西兰花样品,加入8 ml预冷的0.05 mol/L pH7.8的磷酸缓冲液(内含0.1% PVPP),在冰浴中研磨,匀浆,于4℃、12000 × g离心30 min,收集上清液立即用于SOD活性测定。

取10 ml指形玻璃管进行测定。按照下表所列加入各反应液,其中4支为对照管,混匀后2支对照管置

于暗处,其他各管于4000 lx日光灯下反应20 min。至反应结束后,以不照光管做空白,于560 nm处分别测定其他各管的光吸收。SOD活性单位以抑制NBT光化还原的50%为一个酶活性单位表示。SOD活性用U/g FW表示。

试剂	用量(ml)	终浓度(比色时)
0.05 mol/L磷酸缓冲液	1.5	
130 mmol/L 甲硫氨酸(met)溶液	0.3	13 mmol/L
750 μmol/L 氮蓝四唑(NBT)溶液	0.3	75 μmol/L
100 μmol/L EDTA溶液	0.3	10 μmol/L
20 μmol/L 核黄素	0.3	2.0 μmol/L
酶液	0.1	对照4支管以缓冲液代替
蒸馏水	0.2	
总体积	3.0	

1.2.5 过氧化氢酶(CAT)的提取及活性测定

参考Havir和McHale方法测定^[4]。取贮藏期间的西兰花样品4 g,加入8 ml预冷的100 mmol/L, pH7.5的磷酸缓冲液(含5 mmol/L二硫苏糖醇和2% PVP),在冰浴条件下研磨,匀浆,于4℃,12000 × g离心30 min,收集上清液,用于酶活性测定。

酶反应体系由3 ml 10 mmol/L H_2O_2 和上述酶提取液100 μl组成,以蒸馏水作参比。从加入酶液30 s开始记录每30 s反应体系在240 nm的吸光度,连续测定1 min。重复三次。以每分钟240 nm处吸光度变化0.01为一个酶活力单位(U),酶活力单位表示为U/g FW。

1.2.6 蛋白质含量测定

按照Bradford方法测定^[5],以牛血清蛋白(BSA)为标准蛋白做标准曲线,计算蛋白质含量。

1.2.7 叶绿体超微结构的观察

参考Suzuki等^[6]和Zhang等的方法^[7],对4℃贮藏期间的鲜切西兰花分别取样进行电镜观察。

取样和切片:每次取样用双面刀片切取 $2 \text{ mm}^2 \times 1 \text{ mm}^2$ 西兰花小花的萼片部分,将小块置于0.2 mol/L磷酸缓冲液(pH7.0)配制的2.5%的戊二醛中固定,同时抽气直到切块下沉。保存到4℃冰箱中,待制片和观察。

制片:用PBS冲洗固定的切块,再用磷酸缓冲液配制成的2%的饿酸固定,用PBS再次冲洗,系列乙醇脱水,EP812树脂浸透包埋,LKB-V超薄切片机切片(切片厚度50~100 nm),醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色,在JEOL-100S透射电镜(JEOL Technologies,日本)下观察,拍照。

1.2.8 数据统计分析

应用Excel2003对所有数据进行统计分析并制图。采

用SPSS10.0软件(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)的邓肯多重比较进行差异显著性分析。 $p < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 乙醇对鲜切西兰花失重率的影响

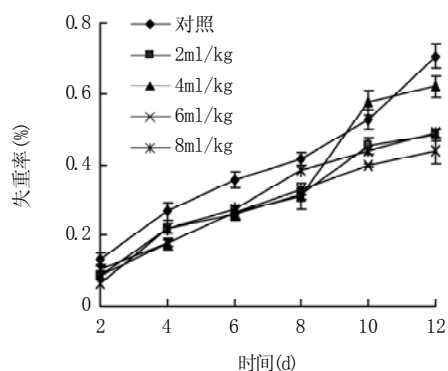


图1 乙醇对鲜切西兰花失重的影响(4℃)(n=3)
Fig.1 Effect of ethanol treatment on fresh-cut broccoli (4℃) weight loss (n=3)

由图1可以看出,在贮藏期间,鲜切西兰花的失重率逐渐增加,乙醇处理组的西兰花的失重均低于对照组。4℃条件下,贮存到第2d时,对照西兰花以及2、4、6和8ml/kg乙醇处理的西兰花的失重率分别为0.13%、0.09%、0.09%、0.10%和0.07%,第4d时失重率分别为0.36%、0.26%、0.26%、0.27%和0.27%,到第12d时失重率分别增加到0.71%、0.48%、0.62%、0.44%和0.49%(图1),乙醇处理的西兰花的失重率显著低于对照组。在贮藏期的前6d,处理组西兰花的失重率均显著低于对照组,但处理组之间差异不显著。到贮藏后期,6ml/kg乙醇处理组西兰花的失重率显著低于其他处理组。

2.2 乙醇对鲜切西兰花叶绿素含量的影响

由图2可以看出,乙醇处理不同程度的延缓了叶绿素的降解。4℃条件下,贮藏到第8d时,对照组鲜切西兰花的叶绿素含量下降了33.43%,而2、4、6、8ml/kg乙醇处理的鲜切西兰花叶绿素含量分别下降了30.40%、30.65%、17.88%和19.74%。贮藏结束时,6ml/kg和8ml/kg乙醇处理组的西兰花叶绿素含量仍均显著高于对照和2、4ml/kg乙醇处理组西兰花的叶绿素含量,然而组间差异不显著。

2.3 乙醇对鲜切西兰花贮藏期间SOD酶活性的影响

乙醇处理后鲜切西兰花的SOD活性变化如图3所示。在贮藏过程中,鲜切西兰花的SOD酶活性均有所

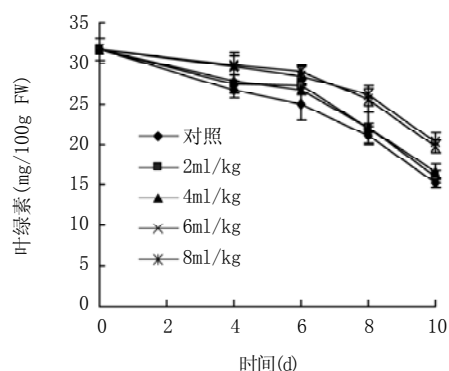


图2 乙醇对鲜切西兰花叶绿素含量的影响(4℃)(n=3)
Fig.2 Effects of ethanol treatment on fresh-cut broccoli chlorophyll content (4℃) (n=3)

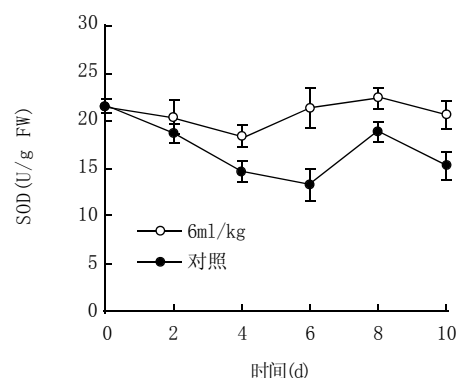


图3 乙醇处理对西兰花SOD活性的影响(4℃)(n=3)
Fig.3 Effects of ethanol treatment on SOD activity(4℃)(n=3)

下降,乙醇处理组的活性不同程度的高于对照组。开始时,西兰花的SOD活性为21.5U/g FW,贮藏到第4d时,处理组和对照组活性分别下降到18.4U/g FW和14.7U/g FW。此时,处理组活性显著高于对照组。在接下来的贮藏期内,鲜切西兰花的SOD活性均有一个缓慢上升的趋势,到贮藏期结束时,处理组的SOD活性均显著高于对照组。由上述可以看出,乙醇处理在一定程度上增加了贮藏期间鲜切西兰花的SOD活性。

2.4 乙醇对鲜切西兰花贮藏期间CAT酶活性的影响

图4显示了鲜切西兰花在4℃贮藏期间CAT活性的变化情况。随着贮藏时间的延长,鲜切西兰花的CAT活性均有所下降。在贮藏期的前4d,西兰花的CAT活性均呈现下降的趋势,之后缓慢上升。到第6d时,处理组的CAT活性(27.9U/g FW)较对照组(23.1U/g FW)高出20.8%,差异显著。在接下来的贮藏期内,乙醇处理组的鲜切西兰花CAT活性均显著高于对照组。

2.5 乙醇对鲜切西兰花叶绿体超微结构的影响

完整西兰花经6ml/kg乙醇处理5h后进行切割、包装,之后于4℃下贮藏。西兰花叶绿体超微结构的变化

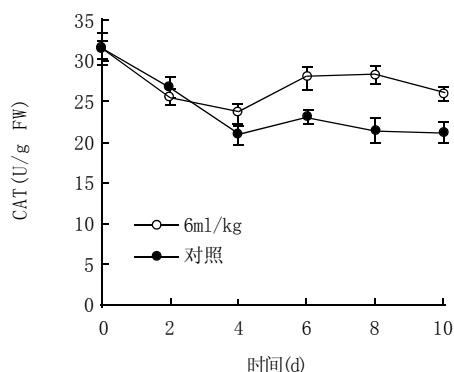
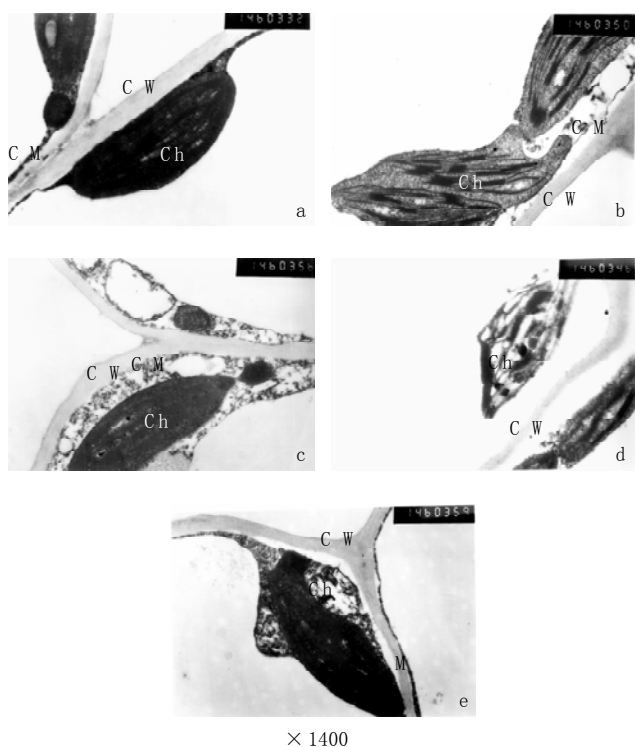


图4 乙醇处理对西兰花CAT活性的影响(4℃)(n=3)

Fig.4 Effects of ethanol treatment on CAT activity(4℃)(n=3)



×1400
CW. 细胞壁; Ch. 叶绿体; CM. 细胞膜。

图5 乙醇对鲜切西兰花叶绿体超微结构的影响(4℃)

Fig.5 Effects of ethanol treatment on chloroplast ultrastructure of fresh-cut broccoli (4℃)

如图5所示。

图5a为贮藏开始时,未处理的完整西兰花的叶绿体超微结构照片。结果显示,叶绿体结构完整清晰,内部片层结构良好,类囊体排列有序。细胞壁光滑,质膜紧贴在细胞壁之内。

在4℃下贮藏到第7d时,对照组的鲜切西兰花叶绿体结构发生了明显的解体现象。质膜开始从细胞壁上分离,大部分基粒片层基本上保持垛叠状态,但叶绿体被膜破裂,内容物外流,基粒片层数量减少,叶绿体内部开始出现空洞(图5b)。而乙醇处理的鲜切西兰花叶

绿体未出现破解和解体,保持了清晰和完整的片层结构和外部形态(图5c)。到贮藏期的第12d,对照组的鲜切西兰花叶绿体结构已经明显破坏,被膜破裂严重,基粒片层结构模糊、膨散、解体(图5d)。而此时处理组的鲜切西兰花叶绿体还维持比较清晰的外部结构,内部基粒片层还比较丰富、规则,叶绿体的边缘结构在很大程度上也开始解体(图5e)。

3 讨论

3.1 乙醇与SOD、CAT

SOD和CAT是植物组织内防御活性氧毒害的酶系统,对于维持采后果蔬的品质具有重要意义。本实验结果表明,西兰花经6ml/kg乙醇处理5h后,促进了贮藏期间的SOD活性。与对照相比,在贮藏期间,乙醇处理组的鲜切西兰花一直保持较高SOD活性。而CAT活性在贮藏前期与对照组相比差异不大,到贮藏后期,处理组的鲜切西兰花CAT活性始终显著高于对照组。有研究推测,乙醇处理对果蔬采后抗氧化酶活性的影响有一定的顺序性。乙醇首先诱导SOD活性的增加,随着组织内 H_2O_2 等过氧化物的积累,CAT和POD的活性逐渐增强[8]。乙醇处理对鲜切西兰花组织内SOD、CAT活性的促进作用表明,乙醇提高了西兰花清除活性氧的能力,增强了组织对活性氧毒害的抵抗。本实验结果表明,乙醇处理减少了鲜切西兰花的失重、蛋白质和叶绿素含量的下降,这在一定程度上可能与组织内较高的抗氧化酶活性有关。因此认为,在很大程度上,乙醇通过调节抗氧化酶的活性起到延缓衰老的作用。

3.2 乙醇与西兰花叶绿体结构

西兰花的绿色主要取决于叶绿体。因此,研究乙醇处理后西兰花内叶绿体到色素细胞的变化是非常必要的。

Suzuki等分别采用0.3、3和12g的乙醇颗粒对西兰花进行持续处理后发现[6],乙醇均抑制了叶绿素含量的降低,延缓了西兰花的黄化。透射电镜下观察后发现,0.3g和3g乙醇处理显著抑制了叶绿体结构的降解,延缓了叶绿体向色素细胞的转变,未对细胞结构造成损伤。而12g乙醇处理虽然也延缓了西兰花的黄化,但是对细胞内原生质体造成了一定的伤害。而且随着贮藏时间的延长,该处理组的西兰花组织细胞在形态和结构上受到更严重的损坏,最终叶绿体失去功能。由此可见,过高浓度的乙醇虽然也保持了较长时间的绿色,但是对细胞结构和功能造成破坏,和适宜浓度乙醇处理的保绿机

理是不同的。而且,也有研究表明,过高浓度的乙醇处理会加速原生质膜破裂,增加离子泄露^[9]。因此,在西兰花中如果处理浓度过高很容易导致西兰花的异味、软烂、深绿色等异常现象。

本研究发现,6ml/kg 乙醇处理 5h,显著延缓了鲜切西兰花的失重和叶绿素含量的降低。透射电镜观察发现,与对照相比,乙醇更好的维持了鲜切西兰花的叶绿体结构,延缓了叶绿体的降解作用,未对细胞结构造成明显损伤。因此,本研究初步认为,该乙醇处理浓度在鲜切西兰花保鲜中是有效、可行的。

参考文献:

- [1] TOIVONEN P M A, SWEENEY M. Differences in chlorophyll loss at 13 °C for two broccoli (*Brassica oleracea*L.) cultivars associated with antioxidant enzyme activities[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1998, 46: 20-24.
- [2] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [3] PROCHAZKOVA D, SAIRAM R K, SRIVASTAVA G C, et al. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves[J]. Plant Science, 2001, 161: 765-771.
- [4] HAVIR E A, MCHALE N A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves[J]. Plant Physiology, 1987, 84: 450-455.
- [5] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [6] SUZUKI Y, KIMURA T, TAKAHASHI D, et al. Ultrastructural evidence for the inhibition of chloroplast-to-chromoplast conversion in broccoli floret sepals by ethanol vapor[J]. Postharvest Biology and Technology, 2005, 35: 237-243.
- [7] ZHANG J H, HUANG W D, LIU Y P, et al. Effects of temperature acclimation pretreatment on the ultrastructure of mesophyll cells in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Jingxiu) under cross-temperature stress [J]. Acta Botanica Sinica, 2005, 47(8): 959-970.
- [8] 佟世生. 乙醇处理对苹果、梨生理病害和品质的影响及机理的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2002.
- [9] SALTEIT M E. Effects of alcohols and their interaction with ethylene on the ripening of epidermal pericarp discs of tomato fruit[J]. Plant Physiology, 1989, 90: 167-174.