

# 青菜热水浴处理保绿机理研究

(浙江科技学院生物与化学工程学系, 杭州 310012) 袁海娜

**摘要:**通过对热处理后青菜组织内部叶绿素-蛋白质牢固性、叶绿素降解产物和过氧化物酶活性变化的检测, 初步考察了青菜热水浴处理的保绿机理。结果表明, 叶绿素的降解速率与叶绿素-蛋白质结合牢固性之间无显著相关性; 热处理抑制了脱镁叶绿素氧化酶的活性, 使叶绿素降解中间产物造成积累, 进而对叶绿素酶和脱镁叶绿素整合酶形成反馈抑制, 从而延缓了青菜叶片的黄化; 热处理抑制了过氧化物酶的活性, 从而阻止了由过氧化物酶引起的过氧化反应对叶绿体的伤害, 减缓了叶绿素的降解。热水浴处理影响了青菜蛋白质的合成, 产生了热激蛋白(HSPs)。

**关键词:** 叶绿素-蛋白质结合度, 叶绿素降解, 过氧化物酶, 热激蛋白, 保绿机理

**Abstract:** Chlorophyll-Protein binding capacity, intermediate products of Chlorophyll degradation and POD activity were measured to determine the green keeping mechanism of Pak Choi heat treatment. No relationship between the Chl-Pro binding capacity and Chl breakdown wasn't found. The pathway of Chl breakdown was blocked by restraining the activity of Pheide Dioxygenase, which is the key enzyme of Chl degradation. Meanwhile, activity of POD during storage after heat treatment was also suppressed. Two groups of heat shock proteins (HSPs) were found with different molecular weight from 54kDa to 74kDa and from 15kDa to 29kDa.

**Key words:** Chl-Pro binding capacity; Chl breakdown; POD; heat shock proteins (HSPs); mechanism of green preservation

中图分类号: TS255.3 文献标识码: A  
文章编号: 1002-0306(2005)01-0081-04

关于叶菜的黄化机理, 大多数的研究者都一致认为与叶绿素的降解有关。叶绿素酶、脱镁叶绿素整合酶和脱镁叶绿素氧化酶是影响叶绿素降解速率的关键因素。叶绿体中的叶绿素均以专一的非共价方式与相关多肽以叶绿素-蛋白质复合体的形式存在, 在组织中呈聚集状态有序排列。有研究表明<sup>[1-3]</sup>, 这些色素蛋白对叶绿素能起到一定的保护作用, 使其免受不利条件的破坏。过氧化物酶在植物组织中起着

重要的作用, 它能催化植物组织细胞膜的膜质过氧化反应, 从而使细胞中的叶绿体遭到破坏, 加速叶绿素的降解。

本实验通过对 Chl-Pro 的结合度、叶绿素降解速率、POD 活性和蛋白质合成在热处理后的变化来初步考察热水浴处理的保绿机理, 以为热处理保鲜技术的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

“上海青”购于杭州翠苑蔬菜市场; Tris、丙酮、乙醇、石油醚、1,4-二氧六环、过氧化氢、醋酸钠、醋酸、盐酸、氯化钾、Triton-x100 以上试剂均为分析纯; 愈创木酚 为化学纯。

高速离心机, SHZ-D(III) 循环水式真空泵, UV-1100 紫外可见分光光度计。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 青菜热处理** 取青菜外叶、中叶和内叶, 分别在 35~50℃ 水浴中加热处理 5~10min, 然后将表面水分吹干, 装入保鲜膜, 常温贮藏。

#### 1.2.2 叶绿素降解产物的测定<sup>[4,5]</sup>

**1.2.2.1 色素的提取** 准确称取 2.500g 样叶 (去中脉), 并加入 20mL 丙酮(0℃) 和 2.5mL 蒸馏水于研钵中研磨成浆, 过滤; 用 80% 的冰丙酮洗涤残渣至无色; 混合滤液并定容至 50mL, 置于暗光处备用。

#### 1.2.2.2 标准液的制备

**叶绿素 a、b** 20mL 的上述丙酮提取液中加入 3mL 1,4-二氧六环和 3mL 蒸馏水, 混合液 12000×g 离心 10min, 用 5mL 丙酮溶解沉淀, 置于暗光处备用。

**脱植基叶绿素** 取部分上述叶绿素制备液, 加入叶绿素酶的丙酮粉。

**脱镁叶绿酸** 向脱植基叶绿素中加入 1 滴 2mol/L 盐酸。

**脱镁叶绿素** 向叶绿素制备液中加入 1 滴 2mol/L 盐酸。

**1.2.2.3 蛋白质的沉淀** 取 25g 新鲜叶片, 加入 20 倍体积的丙酮, 于研钵中研磨 (-20℃) 成浆, 浸提

收稿日期: 2004-06-14

作者简介: 袁海娜(1978-), 女, 讲师, 研究方向: 果蔬保鲜。

表1 叶绿素标准曲线测定数据

叶绿素浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0	10	20	30	40	50	60	100
吸光度	0.0	0.037	0.093	0.128	0.157	0.190	0.245	0.400

表2 青菜不同部位叶片的叶绿素-蛋白质结合牢固性

叶片	叶绿素含量( $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{Fw}$ )	叶绿素-蛋白质结合度(%)	
		0.4%乙醇-石油醚中不可提取叶绿素	0.8%乙醇-石油醚中不可提取叶绿素
外叶	425.00 $\pm$ 9.03	99.91	78.14
中叶	500.00 $\pm$ 25.64	92.44	67.73
内叶	556.42 $\pm$ 53.21	90.31	66.09

15min,倾去上清液,再用8倍体积的丙酮浸提,直至上清液无色。沉淀物真空过滤,并在常温下干燥去除溶剂,冷藏备用。

1.2.2.4 酶的提取 称取上述丙酮粉3g,加入90mL(15mmol/L Na-P缓冲液(pH7)、50mmol/L KCl和0.24% Triton-x100)混合液,在30℃磁力搅拌1h,提取液过滤,滤出液离心12000 $\times$ g,收集上清液,即为粗酶液。

1.2.2.5 样品的测定 将色素提取液进行适当稀释,UV-1100紫外可见分光光度计测定各处理的吸光度。

1.2.3 过氧化物酶活性测定 参照文献[6]。

1.2.4 热激蛋白分离 参照文献[7]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 叶绿素-蛋白质牢固性的测定及在热处理后的变化

2.1.1 叶绿素的乙醇溶液的标准曲线 叶绿素的乙醇溶液的标准曲线测定数据见表1,以叶绿素浓度C( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )为横坐标,吸光度A为纵坐标绘制标准曲线。回归方程为: $C=0.004A+0.003$ , $R^2=0.9991$ 。

2.1.2 热处理对青菜叶绿素-蛋白质牢固性的影响 叶绿素-蛋白质结合度采用文献[8]的方法测定,结果见表2,表3。

表3 热处理对青菜叶绿素-蛋白质结合牢固性的影响

处理	叶绿素含量( $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{Fw}$ )	叶绿素-蛋白质结合度(%)
50℃/10min	366.06	56.74
46℃/10min	475.00	77.11
44℃/10min	362.82	72.90
35℃/10min	398.72	71.14
35℃/20min	324.36	43.97
35℃/30min	404.49	31.64
对照	425.93	99.91

注:以0.4%乙醇-石油醚中不可提取的叶绿素表示。

从表2中可以看出,不同叶位叶片的叶绿素-蛋白质结合度不同。外叶牢固性最大,而内叶牢固性只有外叶的73%。如果以牢固性较弱的叶绿素(即0.4%乙醇-石油醚可提取的叶绿素)来计,外叶中几

乎所有叶绿素都处于与蛋白质的结合状态下,并且有78%的叶绿素-蛋白质属于紧密结合(即0.8%乙醇-石油醚可提取的叶绿素)。而内叶中,有将近10%的叶绿素处于游离状态,只有66%的叶绿素与蛋白质紧密结合。

表3表明,叶绿素-蛋白质结合牢固性与热处理的温度和时间有关。与对照相比,热处理降低了叶绿素-蛋白质的结合牢固性,下降幅度在17%~66%(即这些叶绿素都由原来的与蛋白质结合状态转化为游离状态),并且,高温短时间处理可以提高叶绿素-蛋白质结合的牢固性,但变化不显著。另外,即使在较低的热处理温度(35℃)下进行长时间处理也会在很大程度上改变叶绿素-蛋白质的结合牢固性,而且,这种变化似乎与青菜的叶绿素含量的变化并无相关性。这说明,叶绿素-蛋白质结合度与叶绿素降解速率或叶片的黄化速率之间并不存在必然的联系,即色素蛋白质对叶绿素的保护作用并不明显。这与前人<sup>[9]</sup>的研究结果不同。

### 2.2 热处理对叶绿素降解速率的影响

2.2.1 叶绿素降解产物的最大吸收波长 叶绿素降解的中间产物主要包括脱植基叶绿素和脱镁叶绿素。用UV-1100紫外可见分光光度计于300~500nm叶绿素降解产物的各标准液进行扫描,得最大吸收波长分别是脱植基叶绿素a(b):430~435nm;脱镁叶绿素(酸)a(b):412~415nm。

2.2.2 热处理对青菜叶绿素降解的影响 叶绿素降解产物的吸光度变化如图1~图6。

图1~图4显示,热处理后,在贮藏初期外叶叶绿素的降解速率与对照相比差异并不是很明显,但是大约在贮藏后的第4d,脱植基叶绿素a(b)和脱镁叶绿素a(b)的吸光度均出现了增大的现象,说明这些产物

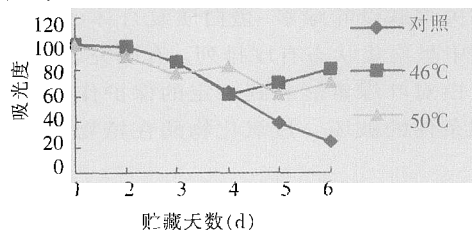


图1 热处理对青菜外叶脱植基叶绿素a(b)的影响

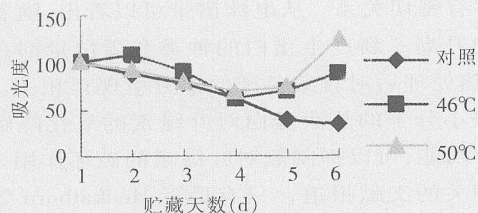


图2 热处理对青菜外叶脱镁叶绿素 a(b)的影响

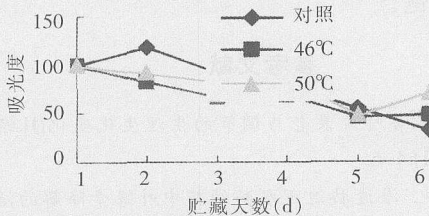


图3 热处理对青菜中叶脱植基叶绿素 a(b)的影响

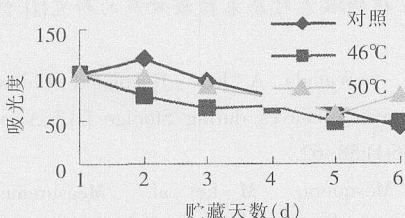


图4 热处理对青菜中叶脱镁叶绿素 a(b)的影响

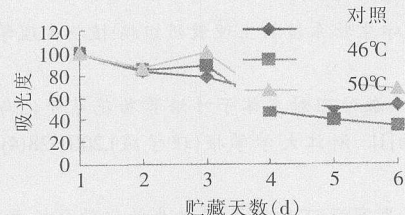


图5 热处理对青菜内叶脱植基叶绿素 a(b)的影响

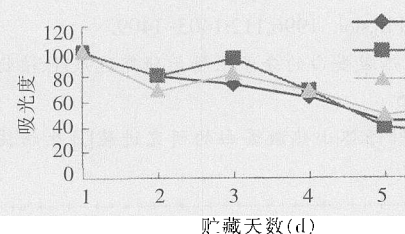


图6 热处理对青菜内叶脱镁叶绿素 a(b)的影响

出现了积累, 而对照的吸光度则继续呈快速下降趋势。这说明青菜的外叶在热处理后, 其细胞内叶绿素降解的相关酶(叶绿素酶、脱镁叶绿素螯合酶和脱镁叶绿素氧化酶)并没有马上受到抑制, 而是在储藏后期, 当叶片要进入衰老生理时, 由于热效应抑制了脱镁叶绿素氧化酶的合成, 而阻断了叶绿素的进一步降解, 使脱镁叶绿素 a(b)和脱植基叶绿素发生积累。同时, 这些产物的累积又对叶绿素酶和脱镁叶绿素螯合酶造成反馈抑制, 从而使整个叶绿素的降解途径受到抑制, 延缓了青菜的黄化。因此, 我们认为在

叶绿素降解的过程中, 叶绿素脱镁氧化酶是控制整个过程的关键酶, 而且, 此酶是在叶菜进入衰老期时才合成的<sup>[9]</sup>。所以, 热处理对青菜叶片的保绿作用主要是通过抑制脱镁叶绿素氧化酶活性的抑制达到的。

另外, 不同叶位的叶片叶绿素降解速率不同。图5~图6表明, 与外叶和中叶相比, 内叶在贮藏过程中, 降解产物的积累现象并不如前两者明显。这说明不同叶位的叶片对热处理的敏感性不同, 显然, 外叶比内层叶片更敏感。这就说明, 热处理在蔬菜, 特别是叶菜采收保鲜中的应用效果是受多种因素影响的, 其中, 蔬菜的种类、同一种类的不同处理部位以及蔬菜所处的生理年龄等都是很关键的因素。这可能也就是国内外研究者对热处理技术在果蔬保鲜中的应用观点不统一的主要原因。

### 2.3 热处理对过氧化物酶活性的影响

过氧化物酶活性的测定采用愈创木酚法。热处理对青菜过氧化物酶活性的影响见图7。

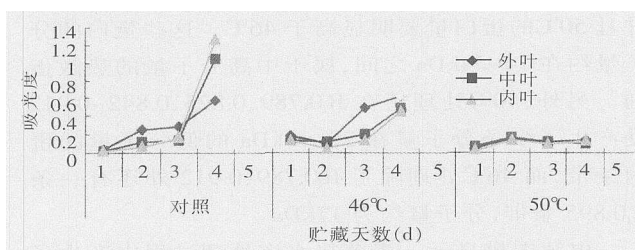


图7 热处理对青菜过氧化物酶活性的影响

从图7中可以看出, 在青菜的贮藏过程中, 过氧化物酶活性是逐渐升高的, 这与李拖平<sup>[3]</sup>等对芹菜的研究结果是一致的。同时, 热处理抑制了青菜叶片中过氧化物酶的活性, 并且处理温度越高, 抑制效果越显著。对外叶来说, 贮藏期内对照的吸光度增加了14.5倍, 46°C处理增加了2.4倍, 而50°C热水浴处理后外叶的过氧化物酶的活性在4d内只升高了1.9倍; 对于中叶, 对照叶片在贮藏期内 POD 活性增加了46倍, 而热处理的叶片酶活性均明显下降, 50°C处理后酶活性仅增加了0.5倍; 而对内叶来说, 过氧化物酶活性在贮藏期内的变化相对于外叶和中叶要大的多, 对照增加了83.3倍, 46°C处理后, 酶活性只增加了2.5倍。这说明同叶位的叶片随着处理温度的升高, 酶活性增加的幅度越小, 同时, 对于相同处理的不同叶位的叶片, 内叶酶活性相对变化更大。

过氧化物酶的活性与叶片的黄化情况有关。随着叶片黄化的加剧, 过氧化物酶活性也加强。日本的山内等人在1985年曾经对叶菜的黄化机理进行了研究, 他们认为黄化是由于过氧化物酶参与的过氧化反应而产生的一些过氧化产物破坏了叶绿素而引起的。1994年, 李拖平等研究也表明抑制芹菜贮藏过程中过氧化物酶活性的上升, 可以延缓叶绿素的降解, 有效地保持芹菜的新鲜品质。

## 2.4 热水浴处理对蛋白质合成的影响

热处理对青菜蛋白质合成的影响见图 8。

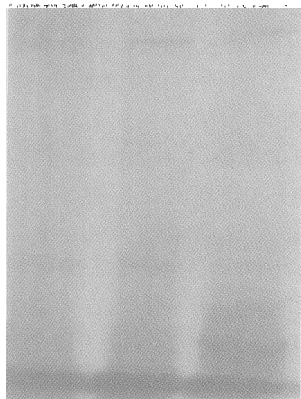


图 8 青菜热处理后的电泳图谱

青菜热处理后的电泳谱带显示,热处理对青菜蛋白质合成的影响显著。与对照相比,在 R<sub>0</sub>0.386、0.579 处,46℃和 50℃处理都产生了新的蛋白条带,并且 50℃的蛋白量要明显高于 46℃。这些蛋白的分子量约在 74~54kDa 之间,属于中高分子量的热激蛋白。另外,50℃处理还在 R<sub>0</sub>0.789、0.825、0.842~0.912 处产生了多条分子量在 29~15kDa 的低分子量的蛋白条带,而 46℃处理除了 R<sub>0</sub>0.789、0.912 外还有一条 R<sub>0</sub>0.895 条带,分子量约为 17kDa。

电泳图谱显示,青菜热水浴处理过程中产生了多种热激蛋白(HSP),其中除 74kDa 和 54kDa 两条较大分子量蛋白外,其余都属于 29~15kDa 的小分子量蛋白。至于这些新 HSPs 在青菜采后贮藏过程中存在的意义至今还不太清楚。但是,结合本实验的结果和前人<sup>[10,11]</sup>对 HSP 的研究我认为,首先可以肯定两个事实:≥46℃的热处理能有效抑制青菜叶片的黄化;在此热处理条件下青菜叶片的蛋白质电泳谱带表明,有许多新的蛋白质产生,特别是分子量在 15~30kDa 的小分子蛋白。虽然抑制叶绿素降解相关酶,特别是脱镁叶绿素氧化酶的活性可能是延缓青菜黄化的一个重要因素,但同时热激蛋白的产生和叶绿

(上接第 80 页)

- [3] Lee, Bum Chun, et al. Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola frondosa* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32(5): 574~581.
- [4] 徐尔尼,等.食用菌对 Fe、Zn、Se 生物富集作用的探讨[J]. *食品科学*, 1999, 20(11): 44~46.
- [5] 刘伟民,黄达明,陈庶来,等.灰树花深层发酵培养基优化研究[J]. *食品科学*, 2003, 24(3): 99~102.
- [6] Mayuzumi Y, Mizuno T. Cultivation methods of naitake (*Grifola frondosa*) [J]. *Fd Rev Int*, 1997, 13: 357~364.
- [7] 裘娟萍,等.灰树花深层发酵培养基的研究[J]. *微生物学通报*, 2000, 27(4): 275~278.

素的降解有密切关系。从电泳谱带可以看出,随着处理温度的升高,新产生蛋白的种类和蛋白量都在增加,这与热处理后对青菜色泽的评分呈现正相关。因此,这些小分子的热激蛋白对叶绿素的氧化降解有一种保护功能,可以抑制氧对叶绿素的破坏作用。目前尚无相关的文献报道,只有最近 Heckathorn 等报道,叶绿体 SmHSPs 在高温下可以保护光系统 II 和整个电子传递链。

## 参考文献:

- [1] 苏冬梅,等.杏叶片衰老与调节的生理生化变化[J]. *经济林研究*, 2001, 19(1): 4~6.
- [2] 蒋明义,等.渗透胁迫下水稻幼苗中叶绿素降解的活性氧损伤作用[J]. *植物学报*, 1994, 36(4): 289~295.
- [3] 李艳平,等.植物激素对芹菜贮藏效应的研究[J]. *食品科学*, 1994(5): 9~11.
- [4] Naoki Y, Watada A E. Regulated Chlorophyll Degradation in Spinach Leaves during Storage [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1991, 116(1): 58~62.
- [5] Minguea Mosquera, M I, et al. Measurement of Chlorophyllase Activity in Olive Fruit (*Olea europaea*) [J]. *J Biol Chem*, 1994, 116: 263~268.
- [6] 华东师范大学生物系植物生理教研组编. *植物生理学实验指导* [M]. 1980.
- [7] 李凤玉,等.热激处理对离体子叶培养物花芽分化与可溶性蛋白谱的影响[J]. *浙江大学学报(理学版)*, 2001, 28(4): 434~438.
- [8] 波钦诺克著,荆家海,丁钟荣译. *植物生物化学分析方法* [M]. 北京: 科学出版社, 1981. 115~262.
- [9] Matile P, et al. Chlorophyll Breakdown in Senescent Leaves [J]. *Plant Physiol*, 1996, 112: 1403~1409.
- [10] 费云标,等.热激蛋白的分子生物学研究进展[J]. *植物学通报*, 1995, 12(1): 1~5.
- [11] 董娟,等.叶绿体小热激蛋白的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2000(3): 19~24.
- [8] 汪维云,吴守一,朱金华.灰树花深层发酵培养工艺研究[J]. *生物工程学报*, 1999, 15(3): 378~382.
- [9] 李宝健,徐志祥.灰树花大规模液体深层发酵工艺[P]. 专利号 01129714.
- [10] 纪天保,等.灰树花仿生栽培法[P]. 专利号 93107858.
- [11] The influence of zinc status on the kinetics of zinc uptake into cultured endothelial cells [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 1999, 10(8): 484~489.
- [12] 何冬兰,石其德. La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 对猴头菌生长的影响[J]. *中草药*, 2001, 32(2): 261~263.
- [13] 王怡平,肖亚中,等.稀土元素对红酵母的生长及类胡萝卜素合成的影响[J]. *微生物通报*, 1999, 26(2): 117~119.