

中華民國第 65 屆中小學科學展覽會

作品說明書

國中組 生物科

030309

生菜變色的秘密

學校名稱：臺南市立後甲國民中學

作者： 國一 莊雨直	指導老師： 侯念佐
-------------------	------------------

關鍵詞： 酵素、氧化還原、多酚

摘要

蔬果收成後褐變主要由多酚氧化酶（PPO）催化酚類化合物，氧化產生醌，伴隨非酶促反應，聚合成深色色素。本研究主要探討台灣福山萵苣變色的原因及其緩解。首先，本研究觀察到莖和葉柄中的維管束最容易變色。接著，證實了鹼性環境會抑制 PPO 的活性，而抗氧化劑維生素 C 和還原型谷胱甘肽可以抑制褐變。研究進一步改良粗萃取的步驟，並以兒茶酚作為反應物，測量產物鄰苯醌的吸光質，量化 PPO 的活性。此外，也發現變色的細胞並不一定為死亡的細胞，死亡的細胞也不一定會變色。最後，配合組織切片，確認變色細胞較多的是木質部，而死亡細胞較多的是韌皮部。綜上所述，本研究證實萵苣變色的部位 PPO 活性較高，且可以利用抗氧化劑抑制變色。

壹、研究動機

餐廳的生菜沙拉看起來很鮮脆，但菜葉的切斷面卻有紅色的斑紋，我想吃生菜卻被媽媽阻止了，她認為生菜不新鮮才會變紅色。但我查到網路資訊卻說：「生菜切口變色的原因，是因為生菜被菜刀切開時造成細胞破裂，細胞中的多酚成份因為氧化而變成紅色，這並不是生菜變質腐壞的關係，是可以安全食用的。如果想要減緩生菜變紅的速度，可沿著生菜的纖維切，用鹽水或醋水浸泡一下，用保鮮膜包好再存放，防止切口暴露在空氣中即可。」這段話令我好奇，這個氧化作用是我們生物課學到的**酵素**催化嗎？如果抑制了氧化酵素，或者阻斷多酚和氧氣的接觸，生菜是不是就不會變色了呢？我真的嘗試用鹽水、醋、或清水浸泡切過的生菜，兩天後，我發現只有鹽水泡過的生菜變紅了。但是，七天後，醋水浸泡卻不但變紅，還變褐色了！這讓我很想知道到底生菜變色的原因是什麼，以及，有哪些方法能有效保持生菜的鮮綠呢？

研究架構

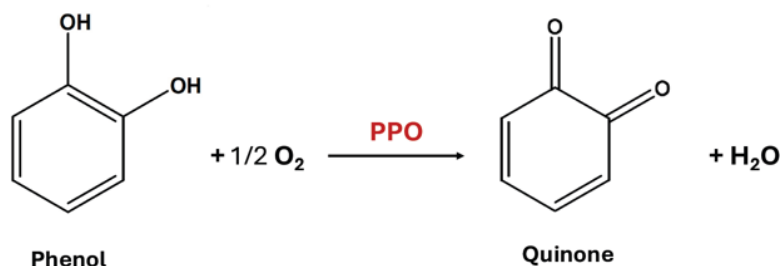
生活經驗	• 生菜切面變色是不新鮮嗎？
文獻探討	• 多酚氧化酶及抗氧化物對氧化還原反應的影響
課本相關知識	• 酵素催化，氧化還原，維管束及細胞膜
前導實驗	• 確認生菜切面變色部位和時程
確認現象	• 記錄一週內生菜變色情形
研究設計	• 酸鹼度，抗氧化物，酵素活性，細胞死亡
結論	• 量化結果與討論

（圖片為作者製作）

貳、研究目的

一、背景知識

萵苣 (*Lactuca sativa*) 為菊科 (*Asteraceae*) 萵苣屬的一年生草本植物，是世界上最常見的食用蔬菜之一，廣泛栽培於溫帶與亞熱帶地區。萵苣富含水分、膳食纖維、維生素 A 與葉酸，具高營養價值(Bar et al., 2023)。然而生菜切段會因表面變色造成的賣相及口感不佳，會造成食物的損失和浪費。蔬果收成後變色的關鍵原因是**酵素催化褐變**(酶促褐變, enzymatic browning)，主要由**多酚氧化酶** (polyphenol oxidase, PPO) 催化**酚**(phenol)化合物的氧化產生**醌**(quinone) (如下圖)，而隨後的非酶促反應(non-enzymatic reaction)，導致這些化合物聚合成深色色素。和蘋果褐變不同的是，生菜的非酶促反應是紅色的，這是因為生菜有比較多的咖啡酸，咖啡酸中的酚被氧化為醌的產物就是紅色的(Saltveit, 2018)。



(圖片為作者製作)

酚類化合物是透過植物的次級代謝途徑合成的，主要存於**液泡**或**細胞壁**，而在細胞質和粒線體中含量較低 (Hunter et al., 2017)。PPO 存在許多植物中葉綠體。因為在植物組織細胞內的胞器有單獨隔間，在正常的植物生長條件下，PPO 和酚不會相互作用。但是刀切等物理損傷會破壞傷口表面的細胞胞器隔間，致 PPO 和酚類的釋放和混合。而且，即使馬上在 4 °C 下儲存，受損生菜中的總酚含量還是會在 24 小時內會增加 (Hunter et al., 2017)。

PPO 催化兩種不同的反應：**單酚**產生**二酚** (單酚酶) 和隨後將**二酚**氧化為**醌** (二酚酶)，兩者都需要分子**氧**的存在。自然課本提到**酸鹼度**對**酵素**的活性會有影響，目前已知酸鹼度可能會影響 PPO 對反應物的親和力。但前人研究發現達到 PPO 活性最高的酸鹼度，依照不同物種而不同。例如：芒果、葡萄的 PPO 在 pH 6 左右的活性最高，而山藥的 PPO 則在 pH 9 左右的活性最高(Kaya & Bagci, 2021; Palma-Orozco et al., 2014)。一般來說，PPO 在 pH 6-7 下活性較高，但在 pH 3 以下不活躍(Moon et al., 2020)。但是，

酸性環境對於台灣常見的福山萵苣是否也有抑制其變色的效果未知。

抗氧化劑可以與**氧氣**反應，抑制褐變。抗氧化劑還能夠與中間產物發生反應，從而打破連鎖反應，並抑制色素的形成。抗壞血酸(維生素 C)和還原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH) 是被廣泛研究的抗氧化劑。文獻指出，還原型谷胱甘肽已被用於防止水果變色，而抗壞血酸抑制水果變色抑制褐變效果比較不明顯 (Moon et al., 2020)。但是，目前尚未知道維生素 C 和還原型谷胱甘肽是否能抑制台灣福山萵苣變色。

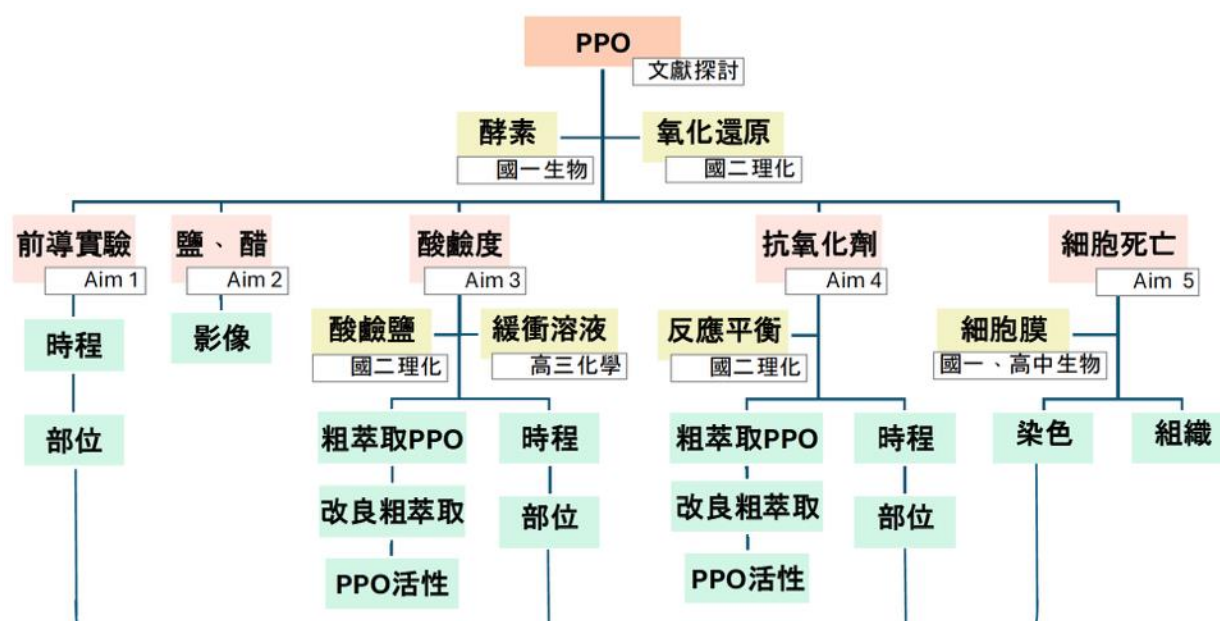
因應環境，**細胞膜**決定了細胞維生的能力，細胞膜損傷是反應外在刺激的指標。因此，細胞膜損可以用來評估壓力引起的細胞損傷或死亡。伊文斯藍 (Evan's blue) 染料只能穿透破裂或不穩定的膜，而染色細胞。相比之下，能夠保持細胞膜完整性的活的、健康的細胞不會吸收伊文斯藍染料。文獻中指出，在生菜切面出現了快速褐變、葉綠素損失、大量細胞死亡，以及活性氧的積累和電解質洩漏 (Iakimova & Woltering, 2018)。我將以伊文斯藍染色觀察台灣福山萵苣切面變色的細胞是否為死亡的細胞。

二、研究特定目標

我的實驗目標是「探討生菜變色的原因，進而延緩生菜變色的方法」，特定目標為：

- (一)、紀錄生菜變色**部位**以及**時程**。
- (二)、紀錄鹽水及食醋抑制生菜變色的效果
- (三)、探討**酸鹼性**對生菜變色的影響:環境的酸鹼度是否影響 PPO 的活性。
- (四)、探討**抗氧化物**抑制生菜變色的效果:抗壞血酸和還原型穀胱甘肽是否影響 PPO 活性。
- (五)、探討生菜變色和**細胞死亡**的關係：探討變色的細胞是否為死細胞。

三、實驗流程及課本連結



(圖片為作者製作)

參、研究設備及器材

一、**試劑耗材**：台灣福山萵苣 (*Lactuca sativa* var. *sativa*)、食鹽 (氯化鈉, NaCl)、食醋、磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4)、磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4)、磷酸一氫鈉 (Na_2HPO_4)、氫氧化鉀 (KOH)、抗壞血酸(即維生素 C, Vitamin C)、還原型谷胱甘肽 (Glutathione, GSH)、1 號濾紙、pH 值試紙、鄰苯二酚 (即兒茶酚, catechol)、伊文斯藍 (Evan's blue)、10%福馬林、石蠟、二甲苯 (Xylene)、乙醇 (Ethanol)、AB-PAS 染劑 (Servicebio AB-PAS Stain)、載玻片、蓋玻片、石蠟、封片膠。

二、**器具設備**：夾鏈袋、保鮮盒、不鏽鋼刀、果汁機、燒杯、漏斗、15ml 及 50ml 離心管、血清移液管、血清移液器、微量離心管、微型杵、微量分注管、微量分注器、96 孔盤、試管振盪器、冰箱、照相機、天秤 (SATORIUS TE - 214S)、解剖顯微鏡 (ZEISS STEMI 305)、複式顯微鏡 (Nikon ECLIPSE Ti2)、低溫離心機 (Thermo HERAEUS MEGAFUGE1)、分光光度計 (MD SPECTRA max340)、組織脫水機 (Epredia Excelsior AS)、化學抽風櫃。

肆、研究過程及方法

一、探討生菜變色部位以及時程

先決定後續實驗的控制變因，包括生菜種類、部位、以及變色的時程：觀察靠近根的莖、葉片白色及綠色部分，以及外層葉及內層嫩葉的變色情形，找出最佳觀察的生菜種類及部位進行實驗。由於參考文獻指出水氣會影響生菜變色，所以均以未清洗的同棵（或同批）生菜進行實驗。以塑膠夾鏈袋保存，並放置冰箱冷藏。每天拍照紀錄 7 天，找出最佳觀察生菜變色的時間範圍，作為後續實驗參考。以解剖顯微鏡觀察變色細胞分佈。

二、紀錄鹽水及食醋抑制生菜變色的效果

參考網路資訊建議生菜切斷後可先泡過食鹽水或食醋，可延長保鮮期。將切斷的生菜分組，以 0.9% NaCl (w/v) 或 10% (v/v) 食醋浸泡 5 分鐘後，擦乾置於塑膠袋保存，並放置冰箱冷藏，進行實驗觀察，並拍照紀錄。

三、探討酸鹼性對生菜變色的影響

因為照片中變色不均，難以量化變色程度，決定參考前人研究，進行粗萃取，測量個萃取液中 PPO 的活性，加入純反應物（兒茶酚）產生鄰苯酚，以分光光度計測量產物鄰苯酚在 410 nm 的吸光值(Palma-Orozco et al., 2014)。最常用來粗萃取 PPO 的溶液為 0.1 M 磷酸鈉緩衝液, pH 7.0 (Cabrera et al., 2024)，為了測試不同酸鹼度對萵苣變色以及 PPO 活性的影響，配置以下 0.1 M 磷酸鹽緩衝液。

（一）配製磷酸鹽緩衝液（phosphate buffer）：

1. 0.1M Phosphate buffer, pH 7.4
1.1g K_2HPO_4 (Mw=174.2 g/mol)
0.5g KH_2PO_4 (Mw=136.1 g/mol)
加水至 100ml
2. 0.1M Phosphate buffer, pH 5.5
1.312g KH_2PO_4 (Mw=136.1 g/mol)
0.129 g Na_2HPO_4 (Mw=141.96 g/mol)

以 0.1M NaOH 調整 pH

加水至 100 ml

3. 0.1M Phosphate buffer, pH 10.0

1.74 g KH_2PO_4 (Mw=136.1 g/mol)

80 ml H_2O

以 1M KOH 調整 pH

加水至 100.0 ml

(二) **粗萃取**：為避免生菜表面物質影響實驗結果，福山萵苣葉均以先清水洗淨，並且以廚房紙巾擦乾，分成三組，秤重後，分別加入 1:1 (w/v) 不同酸鹼值 (pH 5.5, pH 7.4, pH 10.0) 的磷酸鹽緩衝液，以果汁機打碎 90 秒。以濾紙過濾，收集濾液，於 4°C 中離心 $12,000 \times g$ 15 分鐘。取上清液置於冰上 (圖一)。

(三) **測量上清液中蛋白質濃度**：以布拉德福蛋白質定量法 (Bradford protein assay)，測量粗萃取中是否有蛋白質。即利用考馬斯藍染料在與蛋白質結合後，由紅色轉成藍色，用比色法與標準品 (0 ~ 14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Bovine serum albumin; BSA) 比較即可測得樣本中蛋白質濃度。取 1 μl 粗萃取於 799 μl H_2O 以及 200 μl Bradford assay 中，震盪混合，以分光光度計紀錄 595 nm 吸光值。

(四) **測量上清液中 PPO 活性**：參考前人研究並調整萃取液的比例(Cabrera et al., 2024)。

取 50 μl 粗萃取於 250 μl 60mM 兒茶酚反應溶液中，在 25°C 反應 10 分鐘，取 200 μl 總反應溶於 96 孔盤中，以分光光度計紀錄 410 nm 吸光值。

(五) **紀錄變色時程及部位**：萵苣清洗後擦乾，浸泡不同的溶液 (純水，磷酸鹽緩衝液 pH 5.5, pH 7.4, pH 10.0)，稍微擦後，存於單獨的保鮮盒中，每天以解剖顯微鏡觀察，拍照一個禮拜。

1. 	配製萃取液	7. 	平衡離心管重量
2. 	福山萵苣以清水洗淨擦乾，秤重	8. 	離心 $10,000 \times g$ ， 15min， 4°C
3. 	加入1:1(w/v)萃取液，以果汁機打碎90秒。	9. 	確認上清液與沉澱物分離
4. 	以濾紙過濾	10. 	離心管放置冰上，確保蛋白質活性
5. 	收集濾液至錐形瓶	11. 	以移液管取出含有PPO的上清液
6. 	濾液移至離心管	12. 	確認上清液與沉澱物分離

圖一、粗萃取實驗流程（圖片為作者製作）。

四、探討抗氧化物抑制生菜變色的效果

（一）配製溶液及試劑，均新鮮配製且置於冰上：

1. 1 M 維生素 C 原液：

1.761 g Ascorbic acid ($M_w=176.12 \text{ g/mol}$)

加 Phosphate buffer pH 7.4 至 10 ml

2. 2 mM 維生素 C 磷酸鹽緩衝液：

99.8 ml Phosphate buffer pH 7.4

0.2 ml 1M 維生素 C 原液

3. **20 mM 維生素 C 磷酸鹽緩衝液：**

98 ml Phosphate buffer pH 7.4

2 ml 1M 維生素 C 原液

4. **200 mM 維生素 C 磷酸鹽緩衝液：**

80 ml Phosphate buffer pH 7.4

20 ml 1M 維生素 C 原液

5. **0.25%還原型谷胱甘肽 GSH 磷酸鹽緩衝液：**

100 ml Phosphate buffer pH 7.4

250 mg 還原型谷胱甘肽

6. **60mM 兒茶酚，鋁箔包住血清瓶避光：**

6.5 g Catechol (Mw = 110.1 g/mol)

800 ml ddH₂O

加 ddH₂O 至 1000 ml

(二) **粗萃取：**為避免生菜表面物質影響實驗結果，福山萵苣葉均以先清水洗淨，並且以廚房紙巾擦乾，分成三組，秤重後，分別加入 1:1 (w/v) 2mM、20mM、或 200mM 維生素 C 磷酸鹽緩衝液，以果汁機打碎 90 秒。以濾紙過濾後，收集濾液，於 4°C 中離心 12,000 × g 15 分鐘。取上清液置於冰上 (圖一)。

(三) **測量上清液中蛋白質濃度：**以布拉德福蛋白質定量法 (Bradford protein assay)，測量粗萃取中是否有蛋白質。即利用考馬斯藍染料在與蛋白質結合後，由紅色轉成藍色，用比色法與標準品 (0 ~ 14 µg/ml Bovine serum albumin; BSA) 比較即可測得樣本中蛋白質濃度。取 1µl 粗萃取於 799 µl H₂O 以及 200 µl Bradford assay 中，震盪混合，以分光光度計紀錄 595 nm 吸光值。







(四) **測量上清液中 PPO 活性：**參考前人研究並調整萃取液的比例(Cabrera et al., 2024)。取 50µl 粗萃取於 250µl 60mM 兒茶酚反應溶液中，在 25°C 反應 10 分鐘，取 200µl 總反應溶於 96 孔盤中，以分光光度計紀錄 410 nm 吸光值。

(五) **紀錄變色時程及部位：**萵苣清洗後擦乾，浸泡不同的溶液 (純水，2 mM、20 mM、200 mM 維生素 C 磷酸鹽緩衝液，0.25%還原型谷胱甘肽磷酸鹽緩衝液)，

稍微擦後，存於單獨的保鮮盒中，每天以解剖顯微鏡觀察，拍照一個禮拜。

五、改良 PPO 活性測量步驟

- (一) **樣品來源**：解剖維管束或少量周圍髓組織，秤重後均分 0.2 g 組織於 1.5ml 試管中。加入 200 μ l 各種萃取液，以微型杵壓碎組織，於 4°C 中離心 12,000 \times g 15 分鐘。取上清液置於冰上（圖二）。
- (二) **測量上清液中蛋白質濃度**：以布拉德福蛋白質定量法（Bradford protein assay），與標準品（0 ~ 14 μ g/ml Bovine serum albumin; BSA）比色，測得樣品中蛋白質濃度。取 1 μ l 粗萃取於 799 μ l H₂O 以及 200 μ l Bradford assay 中，震盪混合，以分光光度計紀錄 595 nm 吸光值。
- (三) **測量上清液中 PPO 活性**：參考前人研究並調整萃取液的比例(Cabrera et al., 2024)。取 50 μ l 粗萃取於 250 μ l 60mM 兒茶酚反應溶液中，在 25°C 反應 10 分鐘，取 200 μ l 總反應溶於 96 孔盤中，以分光光度計紀錄 410 nm 吸光值。

1.		取葉柄中維管束，均分成小塊。
2.		取1cm厚的莖，均分成小塊。
3.		取等重樣品，加入萃取液，以微型杵搗碎。
4.		搗碎後萃取液無變色。
5.		離心 $10,000 \times g$, 15min, 4°C ，放置冰上，確保蛋白質活性。
6.		取上清液與兒茶酚反應，於96孔盤測吸光值。

圖二、改良版粗萃取實驗流程（圖片為作者製作）。

六、探討生菜變色和細胞死亡的關係





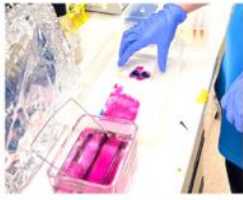

（一）伊文斯藍染色：利用伊文斯藍染劑無法穿透活細胞細胞膜的原理，以藍色染色分辨死亡細胞(Iakimova & Woltering, 2018)。葉柄切片以 0.25%（w/v）伊文斯藍水溶液染劑，染色 10 分鐘，浸泡水中 15 分鐘退染，以顯微鏡觀察，照相紀錄。

（二）萵苣組織石蠟包埋：以解剖顯微鏡觀察的影像，比較文獻中的解剖組織圖片，雖然能判斷維管束和髓的位置，但萵苣的組織結構圖片卻非常缺乏，因此，為了確認更細部的組織位置，我們選擇自行製作台灣福山萵苣的莖和葉柄的組織切片，染色觀察。莖及葉柄切片（約 0.3~0.5cm 厚），浸泡於 10%福馬林，於 4°C

隔夜。第二天置換成 pH7.4 磷酸鹽緩衝液，浸泡 10 分鐘，重複此步驟三次。於組織脫水機脫水，步驟如下：75% 乙醇 1h、80% 乙醇 1h、90% 乙醇 1h、100% 乙醇 1h 三次、二甲苯 1h 三次、真空滲蠟 1h 兩次。

(三) **萬芎組織切片**：將組織包埋於石蠟中，帶石蠟凝固後即可切片。本研究嘗試利用木工刨刀切片，相較於切片機容易操作。切片置於 45°C 清水上伸展，用載玻片將切片撈起後晾乾隔夜（圖三）。

(四) **AB-PAS 染色**：AB-PAS 染色是一種組織化學染色方法，用於區分植物細胞壁中的多醣類。該方法結合了 Alcian blue （AB）對酸性多醣類（呈藍色）以及 PAS（過碘酸-Schiff）染色對中性多醣類（呈紫紅色）的染色效果，使研究者能更清楚地觀察這些碳水化合物在植物組織中的分布情形(Zhang et al., 2023)。石蠟切片使用 1% Alcian blue 染色 10min, 自來水洗至玻片流水呈無色。接著泡入 0.5% 高碘酸溶液浸染 15 min，經純水浸洗 3 次，每次約 10 s。接著切片泡入 Schiff 試劑（提前恢復至室溫）中加蓋避光浸染 30 min，流水沖洗 5 min。最後，切片依次入 100%乙醇脫水 5 min 三次；經二甲苯透明 5 min 二次，然後用中性樹膠，加上蓋玻片完成封片（圖三）。

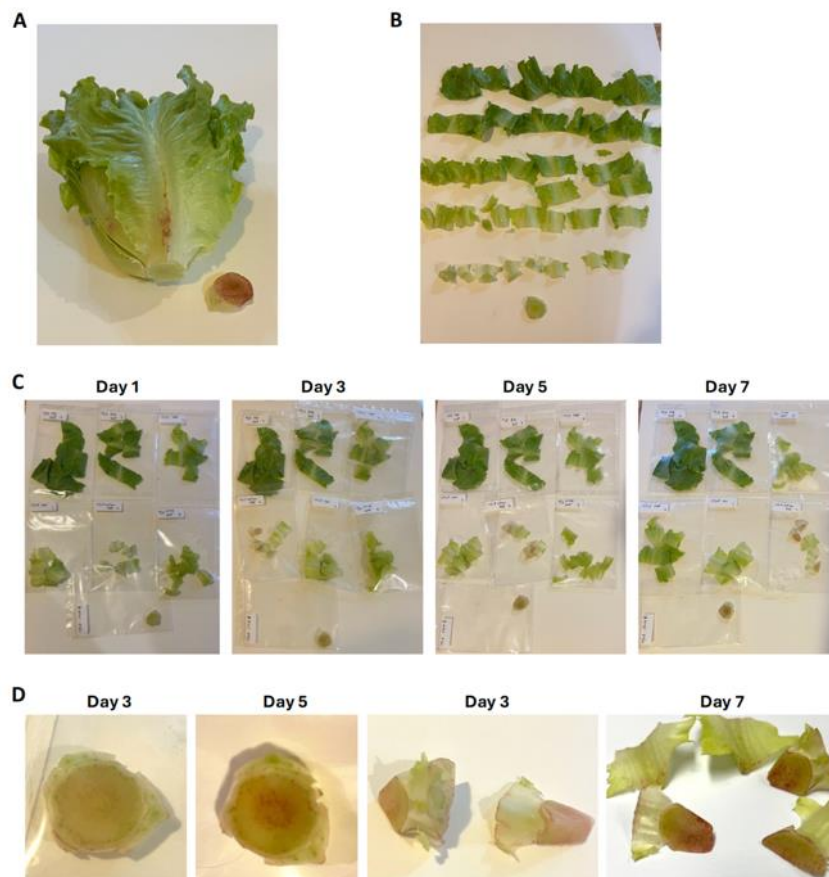
<p>1.</p> 	<p>葉柄和莖脫水後 以石蠟包埋。</p>
<p>2.</p> 	<p>以刨刀切薄片。</p>
<p>3.</p> 	<p>於溫水展片後， 以載玻片撈起後 風乾。</p>
<p>4.</p> 	<p>組織切片脫臘， 再水化。</p>
<p>5.</p> 	<p>以 AB-PAS染劑 組染色。</p>
<p>6.</p> 	<p>組織切片脫水後 ，封片觀察。</p>

圖三、組織切片染色流程（圖片為作者製作）。

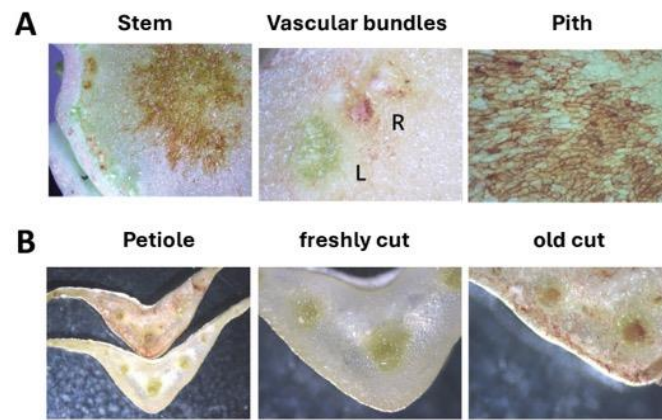
伍、研究結果

一、生菜的莖和葉柄中的維管束在第三天即變色

在解剖構造上，萵苣莖部與葉柄的維管束（vascular bundles）結構明顯，由木質部（xylem）與韌皮部（phloem）構成。實心莖內的維管束呈環狀分布於的皮層（cortex）之內，最中心則為髓（Pith）。在紀錄最佳觀察的生菜種類及部位的實驗中，觀察台灣福山萵苣的莖部以及接近莖的葉柄部分，發現冷藏 3 天後葉柄開始出現變色（圖四），且越靠近莖的部位越容易觀察變色的情形。舊葉比新葉變色情形顯著（圖四 C）。莖部變色部位（圖四 D）以維管束居多（圖五 A）。位於中央的髓細胞壁變色也較細胞其他部位變色明顯（圖五 A）。已經切段的葉柄（Petiole），再由中間切開，觀察新切面（freshly cut）未變色。但已經暴露 7 天的舊切面（old cut），在邊緣及維管束都已經變色（圖五 B）。



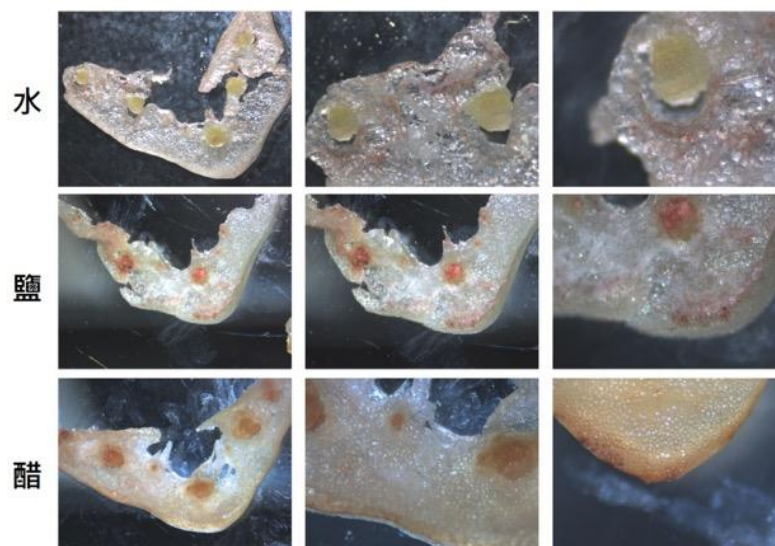
圖四，觀察台灣福山萵苣不同部位變色情形。(A-C) 萵苣未清洗，切塊分部位收入 PP 夾鏈袋，冰 4°C 冰箱，每天拍照紀錄一個禮拜。(D) 莖部變色較葉子明顯。第三天莖部開始出現紅褐色。(圖片為作者製作)



圖五、觀察第七天萵苣莖及葉柄變色情形。(A) 莖 (Stem) 的維管束 (Vascular bundles) 及髓 (Pith) 的細胞壁均變色。部分維管束 (R, stem bundle) 已經變色，而有些維管束 (L, leaf bundle) 尚未變色。(B) 已經切段的葉柄 (petiole)，再由中間切開，觀察新切面 (freshly cut) 及舊切面 (old cut) 變色情形。(圖片為作者製作)

二、鹽水及食醋無法抑制生菜變色

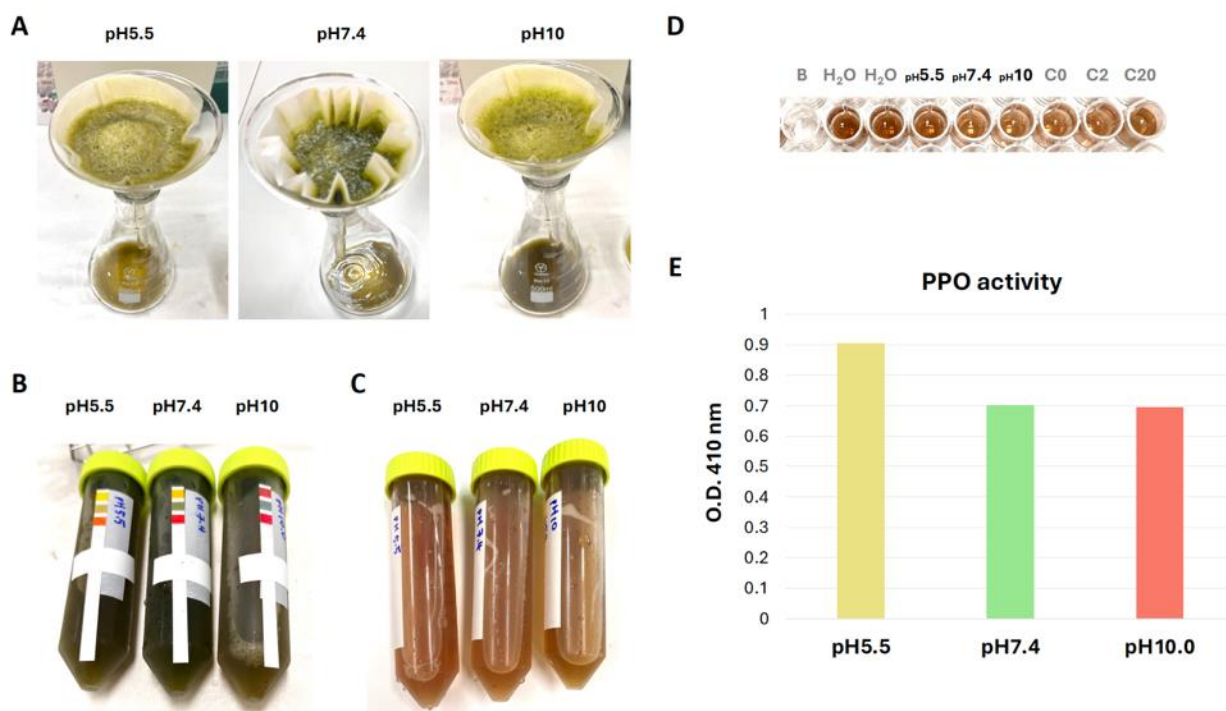
萵苣未清洗，切片的葉柄部位分別浸泡清水或鹽水或食醋 5min，擦乾後收入 PP 夾鏈袋，存於冰箱 5 天，和只用清水泡過的生菜比起來，鹽水浸泡反而加速生菜變紅。相反的，醋水浸泡確可以延緩生菜的變色。但是，五天後，鹽水和清水浸泡的生菜變化不大，醋水浸泡卻不但變紅，還變褐色 (圖六)。結果和預期不同。



圖六、測試延緩生菜變色的方法。未清洗，切片的葉柄部位分別浸泡清水或鹽水或食醋存於冰箱 5 天，以解剖顯微鏡拍照。(圖片為作者製作)

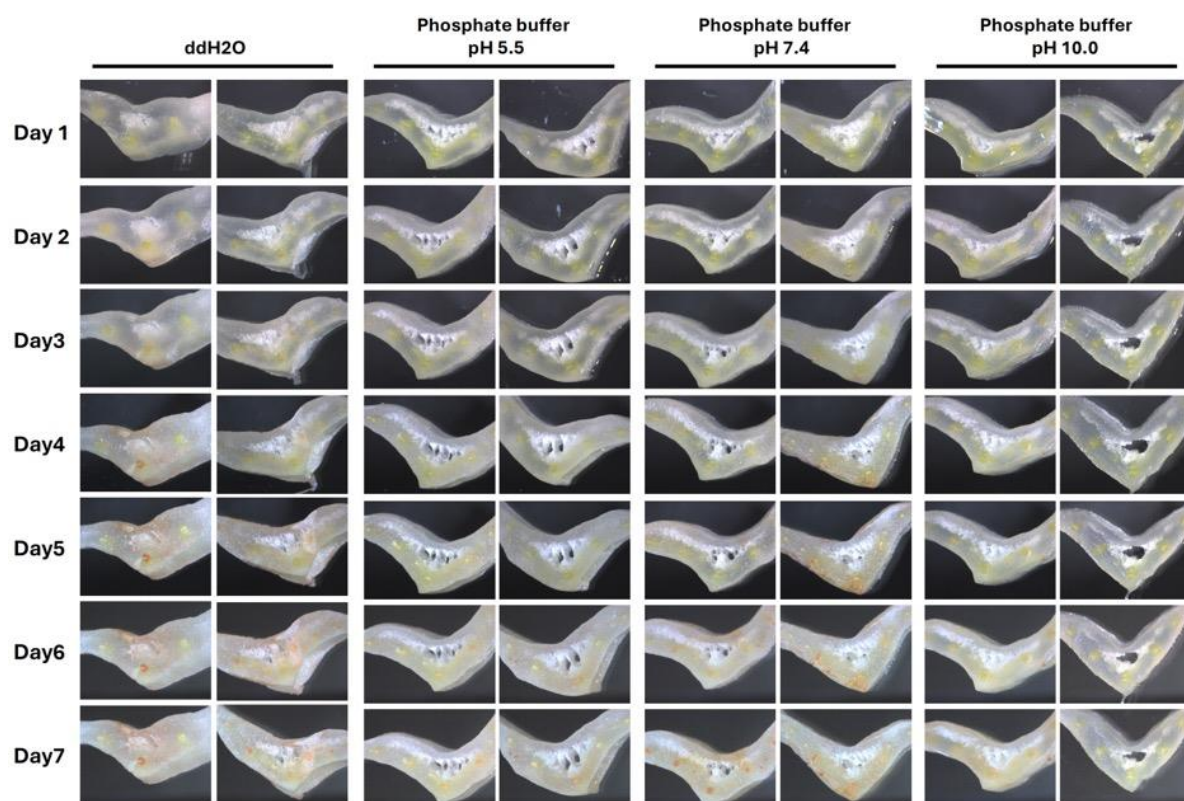
三、鹼性環境能夠抑制生菜變色

- (一) 果汁機攪拌 90 秒鐘，所有組別一開始攪拌的菜汁是翠綠色，漸漸變成墨綠色，最後離心完的上清液是咖啡色。變色速度非常快（圖七 A~C）。
- (二) PPO 活性是 $\text{pH } 5.5 > \text{pH } 7.4 \approx \text{pH } 10$ （圖七 D 和 E）。但是上清液本身已經呈紅褐色，兒茶酚變色成黃色的鄰苯醌可能無法精確觀察，因此在研究方法五中改良 PPO 活性測量方法。

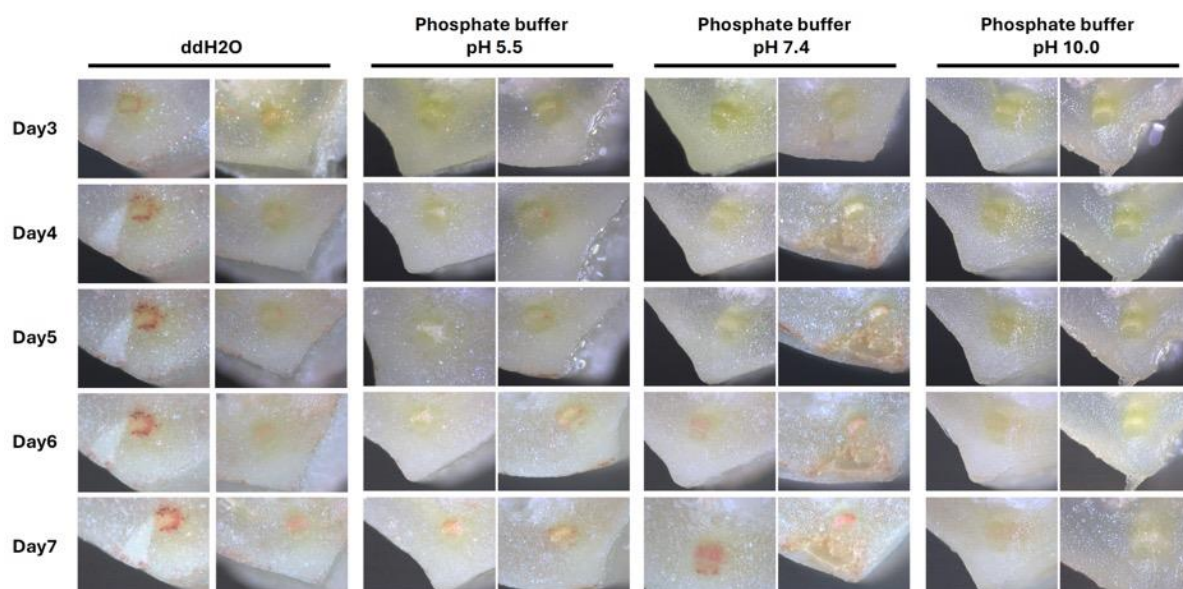


圖七、以不同酸鹼度的磷酸鹽緩衝液粗萃取。(A) 以果汁機打碎 90 秒。以濾紙過濾。(B) 收集濾液於離心管，以 pH 值試紙確認萃取液的酸鹼度。過濾完鮮綠色已經變成墨綠色。(C) 離心完後取得的上清液，呈現紅褐色。(D) 96 孔盤測量與兒茶酚反應後的產物吸光值。(E) 以 410nm 吸光值代表 PPO 的活性。(圖片為作者製作)

- (三) 萵苣清洗後擦乾，切片浸泡不同的溶液（純水、pH 5.5、pH 7.4、pH 10 磷酸鹽緩衝液），稍微擦後，存於單獨的保鮮盒中，每天以解剖顯微鏡觀察，拍照一個禮拜。發現第三天開始出現顏色變化，以維管束部位變色程度最明顯，但形成層幾乎不變。變色由快到慢為純水 > pH 7.4 > pH 5.5 > pH 10（圖八，九）。



圖八、觀察不同酸鹼度對萵苣葉柄變色的影響。葉柄切片浸泡不同的溶液（純水、pH5.5、pH7.4、pH10 磷酸鹽緩衝液）後一週的變化。（圖片為作者製作）



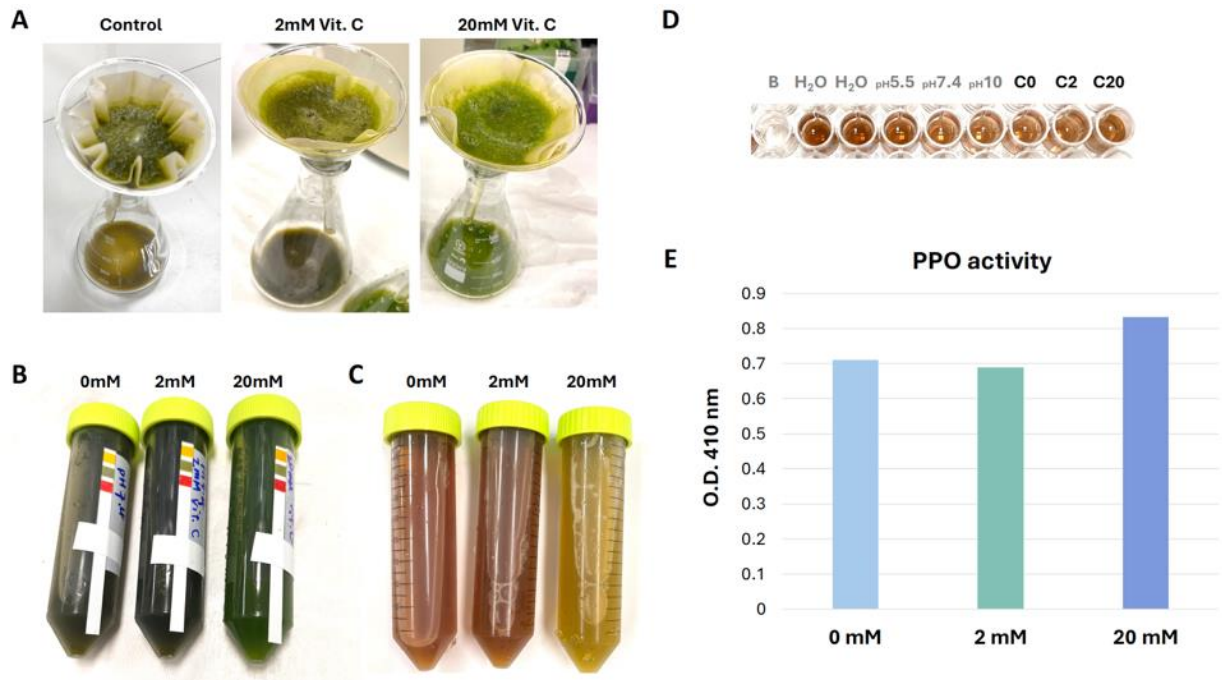
圖九、觀察不同酸鹼度對萵苣葉柄變色的影響。維管束放大圖。葉柄浸泡不同的溶液（純水，pH5.5、pH7.4、pH10 磷酸鹽緩衝液）後，第三到七天的變化。（圖片為作者製作）

四、抗氧化物能夠抑制生菜變色，且 GSH 效果最佳

（一）果汁機攪拌 90 秒鐘，純水及 2mM 維生素 C 組別一開始攪拌的菜汁是翠綠色，

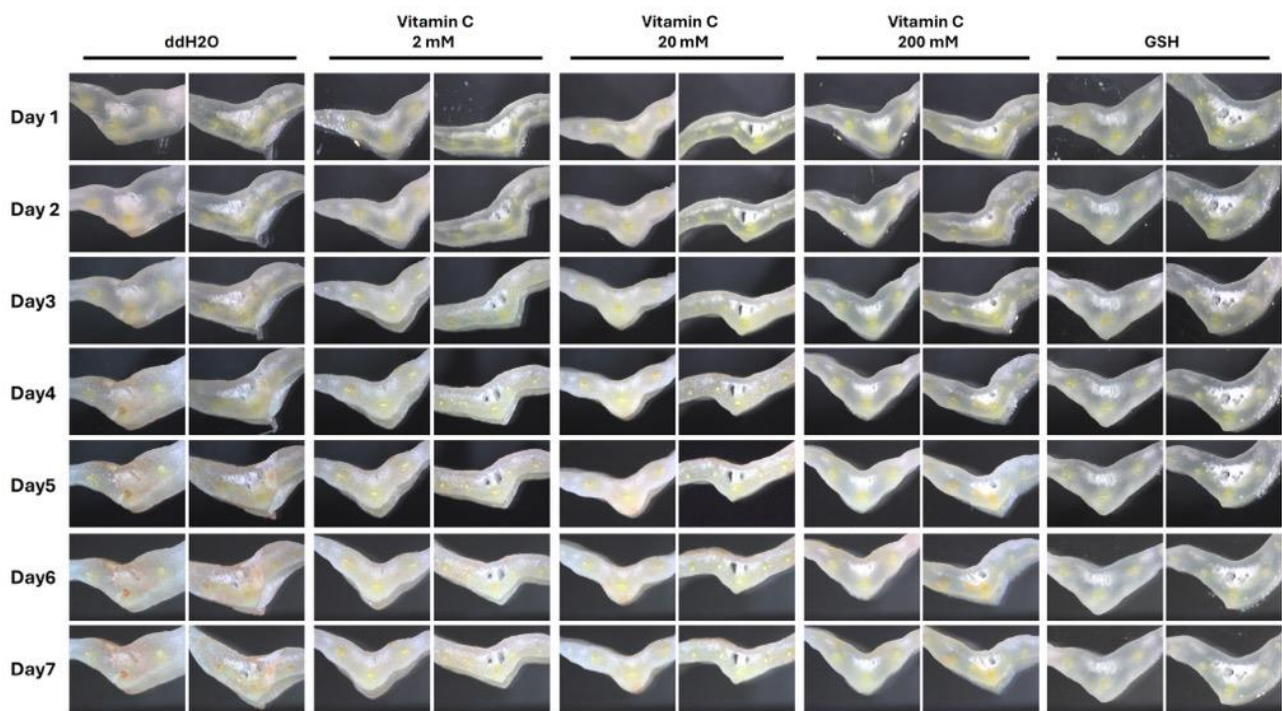
漸漸變成墨綠色，最後離心完的上清液是咖啡色。變色速度非常快。20mM 維生素 C 萃取的變色情形較慢，可見維生素濃度必須高於 20mM 才有抑制變色效果（圖十）。

（二）上清液本身已經呈紅褐色，兒茶酚變色成黃色的鄰苯醌可能無法精確觀察，因此改良 PPO 活性測量方法。

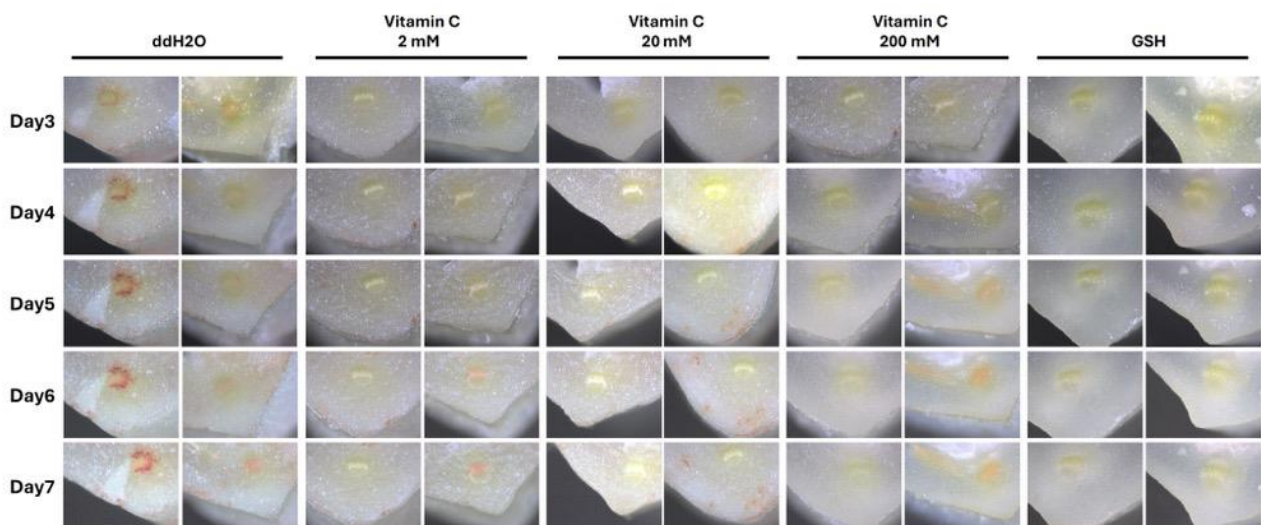


圖十、以不同濃度的維生素 C 磷酸鹽緩衝液粗萃取。(A) 以果汁機打碎 90 秒。以濾紙過濾。20mM 維生素 C 萃取的變色情形較慢。(B) 收集濾液於離心管，以 pH 值試紙確認萃取液的酸鹼度。過濾完鮮綠色已經變成墨綠色。(C) 離心完後取得的上清液，呈現紅褐色。(D) 96 孔盤測量與兒茶酚反應後的產物吸光值。(E) 以 410nm 吸光值代表 PPO 的活性。(圖片為作者製作)

（三）萵苣清洗後擦乾，浸泡不同的溶液（純水、2mM、20mM、200mM 維生素 C、0.25%還原型谷胱甘肽），稍微擦後，存於單獨的保鮮盒中，每天以解剖顯微鏡觀察，拍照一個禮拜。發現變色由快到慢為純水 > 2mM 維生素 C > 20mM 維生素 C > 200mM 維生素 C > 0.25%還原型谷胱甘肽（圖十一、十二）。



圖十一、觀察不同抗氧化物對萵苣葉柄變色的影響。葉柄浸泡不同的溶液（純水、2mM、20mM、200mM 維生素 C、0.25%還原型谷胱甘肽）後，一週的變化。（圖片為作者製作）



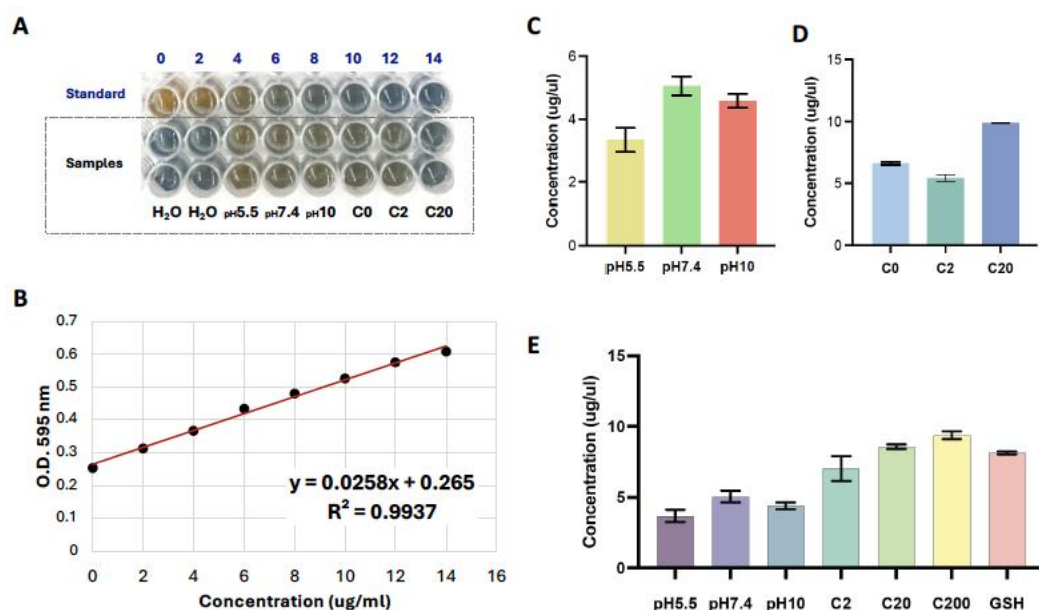
圖十二、觀察不同抗氧化物對萵苣葉柄變色的影響。維管束放大圖。葉柄浸泡不同的溶液（純水、2mM 維生素 C、20mM 維生素 C、200mM 維生素 C、0.25%還原型谷胱甘肽）後，第三到七天的變化。（圖片為作者製作）

五、改良的 PPO 活性測量流程快速且精確

- （一）因為用果汁機打碎，經濾紙過濾後，再離心的萃取步驟太耗時，最後上清液本身已經有褐色，之後用其來測量兒茶酚氧化成的黃色鄰苯醌，結果可能不精確。

因此改良 PPO 活性測量方法。由於前面觀察變色最多的組織是維管束，推測維管束中有最多 PPO。因此選擇解剖維管束及少量周圍髓組織，秤重後均分維管束組織於試管中。加入各種萃取液，壓碎組織，離後取上清液，測量 PPO 活性。如此取出的上清液在測量初期是無色透明，後幾管才慢慢出現淡紅褐色(圖二)。

(二) 布拉德福蛋白質定量法，確認了粗萃取的上清液中含有蛋白質(圖十三)，而且改良版的粗萃取和原本的粗萃取步驟均能得到相當的蛋白質(圖十三 C~E)。

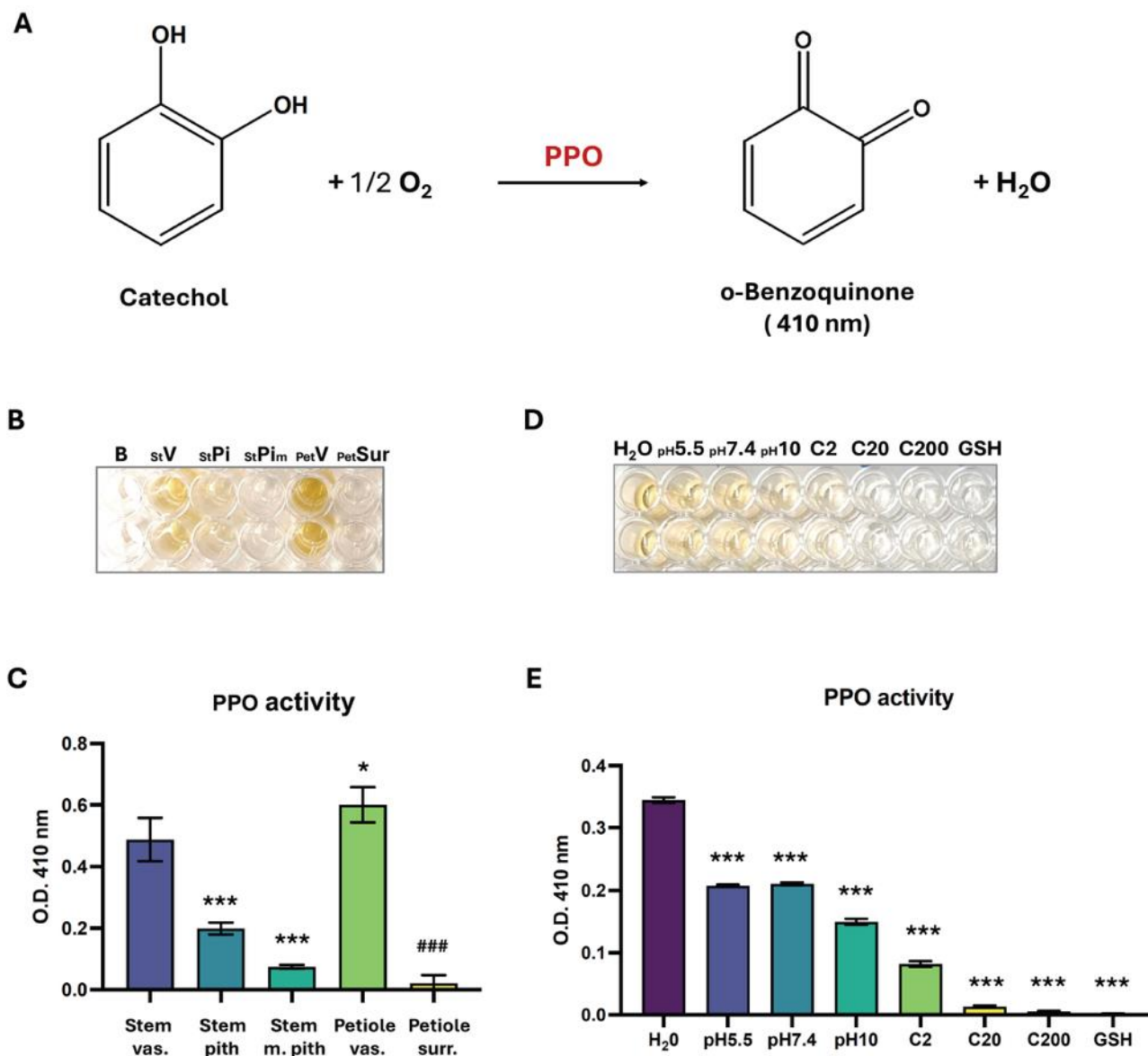


圖十三、布拉德福蛋白質定量結果。(A) 標準品 (0~14 $\mu\text{g/ml}$ 牛血清白蛋白) 和樣品，與布拉德福試劑反應，於 96 孔盤中，以分光光度計測量 595 nm 吸光值。(B) 由不同蛋白質濃度的標準品與所測得的吸光值得到的標準曲線，和使用線性迴歸方法，找到曲線的最佳擬合直線。線性相關係數 >0.99 表示曲線的線性關係較強。利用線性公式可換算樣品的蛋白質濃度。(C 和 D) 原始粗萃取步驟所得之蛋白質濃度。(E) 改良版粗萃取步驟所得之蛋白質濃度。

(三) PPO 氧化兒茶酚，生成鄰苯醌，會吸收波長 410 nm 的光(Palma-Orozco et al., 2014)。

以分光光度計測量的吸光值，代表 PPO 的活性(圖十四 A)。結果顯示，PPO 的活性於不同部位的活性為：莖的表皮+皮層+維管束 \approx 葉柄的維管束 $>$ 莖的髓 $>$ 葉柄的海綿組織(圖十四 B 和 C)。這和我觀察到的變色部位照片結果相符，證實變色和 PPO 的活性呈現相關。此外，PPO 的活性於不同萃取液中的活性為： $\text{H}_2\text{O} > \text{pH } 5.5 \approx \text{pH } 7.4 > \text{pH } 10 > 2 \text{ mM 維生素 C} > 20 \text{ mM 維生素 C} > 200 \text{ mM 維生素 C} > \text{GSH}$ 。可見鹼性環境、高濃度維生素 C，以及 GSH 均可以抑制 PPO 的活性

(圖十四 D 和 E)。



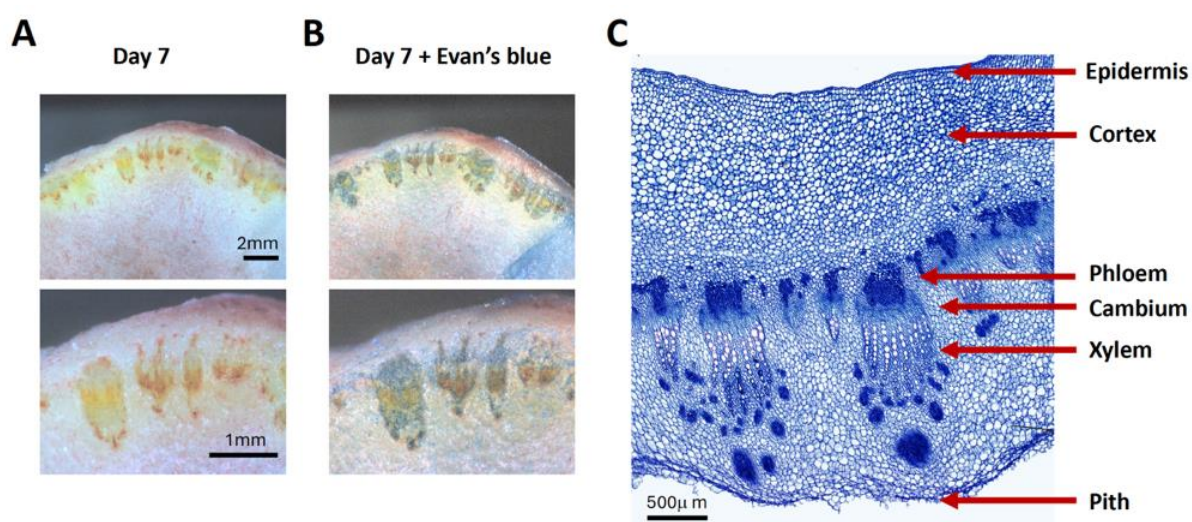
圖十四、改良後 PPO 活性測量結果。(A) 兒茶酚 (Catechol; 臨苯二酚) 經多酚氧化酶 (polyphenol oxidase; PPO) 氧化成鄰苯醌 (o-Benzoquinone)。(B 和 C) PPO 活性測量。解剖組織秤重後分段。每 0.2g 組織加入 200 μ l pH7.4 磷酸鹽緩衝液，以微型杵壓碎組織，離心後置於冰上。取 200 μ l 總反應液於 96 孔盤中，以分光光度計測得波長 410nm 吸光值，代表 PPO 活性。B：空樣品。StV, Stem vas.：莖表皮、皮層、及維管束。StPi, Stem pith：莖較外圍的髓。StPim, Stem m.pith：莖中間的髓。PetV, petiole vas.：葉柄維管束。PetSur, petiole surr.：維管束周圍組織。*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ ，one-way ANOVA，與 Stem vas. 組比較。###, $P < 0.001$ ，one-way ANOVA，與 Petiole vas. 組比較。(D 和 E) 解剖葉柄最中間維管束，秤重後分段。每 0.2g 維管束組織加入 200 μ l 各種萃取液後，以微型杵壓碎組

織，離心後置於冰上。取 200 μ l 總反應液於 96 孔盤中，以分光光度計測得波長 410nm 吸光值，代表 PPO 活性。***, $P < 0.001$ ，one-way ANOVA，與 H₂O 組比較。（圖片為作者製作）

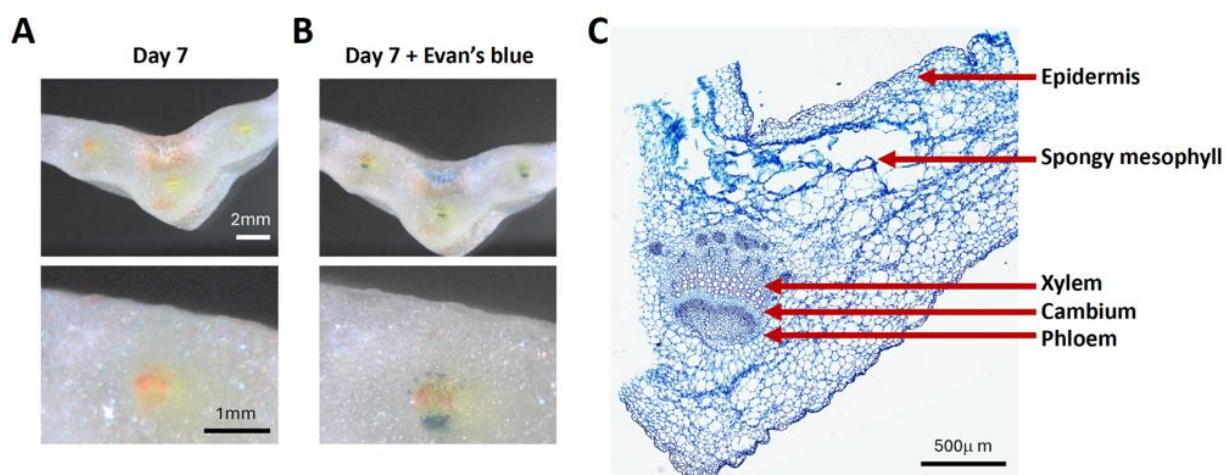
六、細胞變色和細胞死亡並非相互獨立，也非完全關聯

（一）萵苣切片以伊文斯藍水溶液染色後，以顯微鏡觀察，發現藍色死亡細胞和變色細胞位置高度重疊，但是變色細胞不一定就是死亡細胞。莖的維管束變色細胞較多位於木質部，且被染成藍色。韌皮部也有些許變色，有許多死細胞（圖十五）。葉柄的維管束變色細胞較多位於木質部，但大部分未被染成藍色。韌皮部也有些許變色，但很多死細胞（圖十六）。

（二）AB-PAS 染色能進一步區分細胞壁中的多醣類。染色結果顯示，維管束細胞壁中多醣有所不同。形成層和葉柄海綿組織均被染成明顯的藍色，表示這些多醣為酸性多醣。而木質部細胞壁呈紫紅色，以及韌皮部以及莖部的皮層細胞壁則被染成紫色，這表明其內含有中性多醣（如纖維素）（圖十五 C 及十六 C）。

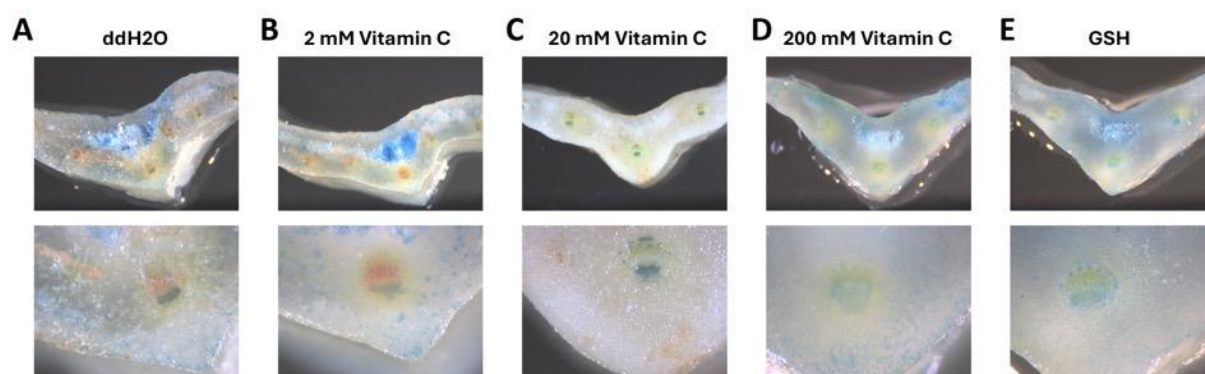


圖十五、伊文斯藍染色萵苣莖部。(A) 莖部切面第七天變色細胞（紅褐色），下圖為維管束周圍放大圖。(B) 莖部切面第七天以伊文斯藍染色的死亡細胞（藍色）以及放大圖。(C) 莖部組織切片以 AB-PAS 染色結果。Epidermis, 上表皮; Cortex, 皮層; Phloem, 韌皮部; Cambium, 形成層; Xylem, 木質部, Pith, 髓。（圖片為作者製作）



圖十六、伊文斯藍染色萬芭葉柄。(A) 葉柄切面第七天變色細胞(紅褐色)，下圖為維管束周圍放大圖。(B) 葉柄切面第七天以伊文斯藍染色的死亡細胞(藍色)以及放大圖。(C) 葉柄組織切片以 AB-PAS 染色節果。Epidermis, 上表皮; Spongy mesophyll, 海綿組織; Xylem, 木質部, Cambium, 形成層, Phloem, 韌皮部。(圖片為作者製作)

(二) 葉柄浸泡不同的溶液浸泡 (純水、2mM 維生素 C、20mM 維生素 C、200mM 維生素 C、或 0.25%還原型谷胱甘肽) 後的第七天，以伊文斯藍水溶液染色後，用顯微鏡觀察，發現海綿組織染成藍色，代表死細胞居多 (圖十七 A 和 B)。維管束韌皮部的死亡居多，但變色的木質部似乎不是死細胞 (圖十七 A 和 B)。20mM、200mM 維生素 C (圖十七 C 和 D) 和 GSH (圖十 E) 組的有些細胞雖然沒有變色，但是是死細胞。



圖十七、抗氧化物對細胞死亡的抑制效果。葉柄浸泡不同的溶液浸泡不同的溶液(純水、2mM、20mM、200mM 維生素 C (vitamin C)、0.25%還原型谷胱甘肽 (GSH) 後第七天，以伊文斯藍水溶液染色死亡細胞。(圖片為作者製作)

陸、討論

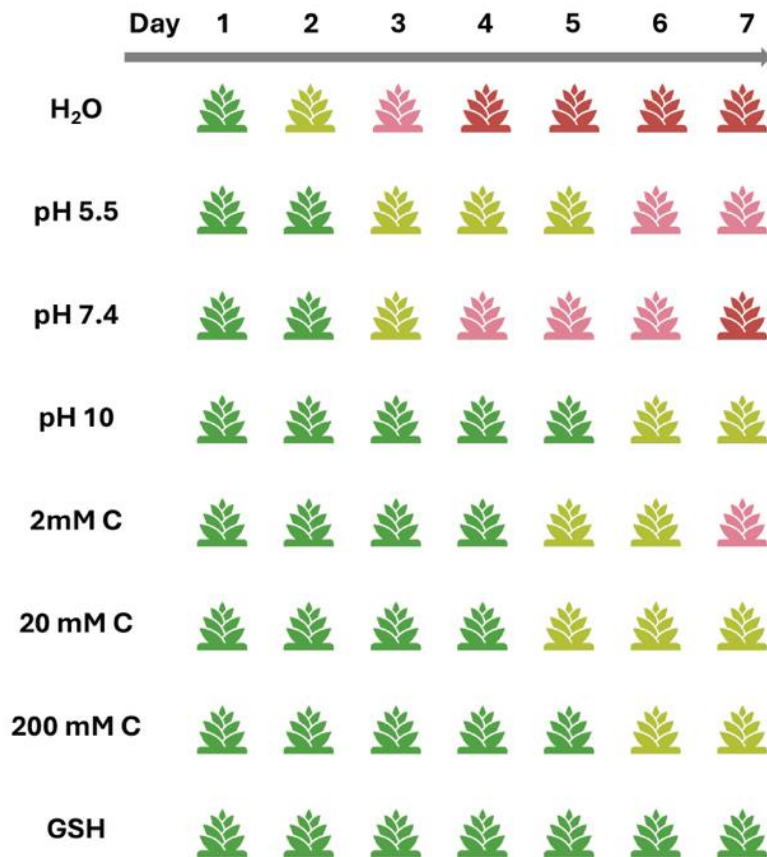
- 一、本研究觀察到莖和葉柄的組織變色情形不同，變色程度由多至寡在葉柄中為：維管束 > 表皮 > 海綿組織，而莖部則是：維管束 > 髓。而 PPO 活性則是：莖的表皮+皮層+維管束 \approx 葉柄的維管束 > 莖的髓 > 葉柄的海綿組織。變色部位和 PPO 活性相符，**證實生菜葉變色和 PPO 活性大小呈正相關**。另外，在髓的細胞壁觀察到明顯的紅褐色，這和文獻中所述「多酚的分佈著要存於細胞壁」是相符合的。由根部延伸到莖的維管束較快變色，而分支到葉柄的維管束較慢或不變色。此外，維管束中的韌皮部和木質部都看到了變色，唯獨形成層幾乎不會變色。這些現象可能和 PPO 及酚類在萵苣組織中的分佈不同有關。想要知道酵素在細胞內的分佈，需要在組織切片，以免疫染色法，利用辨識 PPO 的抗體標記 PPO 的位置後觀察。而酚類化合物則可以利用 Millon's reagent 染色觀察(Zhang et al., 2023)。這部分可以在未來繼續研究。
- 二、在粗萃取中，觀察到原本鮮綠的菜汁在 90 秒間迅速褐變，這可能因為打汁的過程破壞了大量的細胞，胞器受損後，原本存在液泡和細胞壁中的多酚，和原本大多在葉綠體中的 PPO 混合，直接氧化成紅褐色。因次，離心後上清液本身已是褐色。由於隨後的 PPO 活性測試中，兒茶酚氧化後的**鄰苯醌是黃色的**，可能無法精確觀察，也可能會影響吸光值得測量。因此，為了加速取得組織中的 PPO，本研究改良了 PPO 粗萃取的方法。由於前面觀察變色最多的組織是維管束，推測維管束中有最多 PPO。因此選擇解剖出「維管束」及「周圍組織」，秤重後均分維管束組織於試管中。加入各種萃取液，直接以微型杵壓碎組織，離心後取上清液。如此取出的上清液在測量初期均是無色透明，一天之後才慢慢出現淡紅褐色。總而言之，**萃取 PPO 的流程越快速，測量 PPO 活性也越準確**。
- 三、此次測驗萃取液都是用 0.1 M 磷酸鹽緩衝液。0.1 M 磷酸鹽緩衝液是植物細胞的等張溶液，與水不同，它可以防止細胞因滲透作用而破裂或萎縮，是一種對細胞無毒的配方。因此可以避免實驗因為水的關係，讓細胞破裂或萎縮而影響實驗結果。而此次抗氧化物實驗選擇 pH7.4 的磷酸鹽緩衝液，比較接近一般細胞生理酸鹼度。此外，維生素 C（抗壞血酸）和還原型谷胱甘肽 GSH 溶於水均為酸性，為了控制實驗的 pH 值，因此選擇將這兩種抗氧化物溶於 pH7.4 的磷酸鹽緩衝液中，並用 pH 值試紙確認每管萃取液的 pH 值都相近，再進行實驗，確保變因只有抗氧化物，而不是酸鹼度。

四、這次測試酸鹼度及抗氧化物對萵苣變色的影響，發現效果最好的是還原型谷胱甘肽 **GSH**。還原型谷胱甘肽是一種三肽，由麩胺酸、半胱胺酸及甘胺酸所構成。在植物中，還原型谷胱甘肽參與調節活性氧壓力：經由谷胱甘肽-抗壞血酸循環，能夠防止活性氧和過氧化物對重要細胞造成的損害(Hoque et al., 2024)。細胞死亡時，受損的細胞膜完整性破壞，過氧化氫 H_2O_2 和活性氧積累，而還原型谷胱甘肽能還原這些過氧化物，抑制褐變(Iakimova & Woltering, 2018)。

五、變色細胞不一定就是死亡細胞，GSH 處理後的有些細胞雖然沒有變色，但是是死細胞。推測可能的原因為：刀切面雖然會破壞細胞膜造成細胞死亡，但若是細胞胞器中沒有酚類，或沒有儲存 PPO 的葉綠體（維管束呈現綠色），仍然不會變色。

六、由於文獻對於萵苣的莖和葉的組織圖非常缺乏，為了精確標示變色部位，本研究自行製作台灣福山萵苣的組織切片加以染色，辨別變色細胞及死亡細胞確切的組織。但因操作組織切片機需要經過認證訓練，也有一定危險性，遂改以木工刨刀取代。刨刀切片的厚薄不一，邊緣容易不完整，需要練習才能得到尚可的薄片。而 AB-PAS 染色的組織切片也顯示，細胞壁有不同的多醣。而且台灣福山萵苣有一些特別的組織結構，和文獻上許多植物的構造很不相同，有一些未解的組織結構留待未來可再深入探討。

柒、結論



圖十八、延緩生菜變色的方法及時程示意圖。(圖片為作者製作)

經過這幾個月實驗，將生菜在不同條件下的變色時程總結為上圖（圖十八）。我得知變色的生菜，真的可能已經放了幾天了！將來還是選擇新鮮洗滌，瀝乾切好的生菜食用會為佳。維生素 C 或 GSH 都是市售的保健品，容易取得，若不得已，可以將切好的生菜，浸泡含維生素 C 或 GSH 的水溶液後瀝乾，存於保鮮盒中，保持低溫，儘快食用，就可以安心享用鮮脆美味的生菜了！

捌、參考資料及其他

- 一、<https://www.mcgill.ca/oss/article/nutrition-you-asked/why-does-lettuce-turn-brown>
- 二、Bar, F. M. A., Fatah, N. H. A., Amen, Y., Halim, A. F., & Saad, H. E. A. (2023). Genus (Asteraceae): A Comprehensive Review. *Records of Natural Products*, 17(2), 201-231.
<https://doi.org/10.25135/rnp.350.2205-2474>
- Cabrera, M., Muhammad, S., Rodriguez, E., & Sommerhalter, M. (2024). Biochemical Laboratory Experiments on Polyphenol Oxidase. *Journal of Chemical Education*, 101(8), 3500-3505.
<https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.4c00533>
- Hoque, M., Jony, M., Das, A., Shaffique, S., Rahman, M., Sharif, I., & Ahsan, S. (2024). Coordination of elicitors and ascorbate-glutathione cycle: A vital nexus for mitigating post-harvest injury and losses of cultivated fruits. *Plant Trends*, 2(2). <https://doi.org/10.5455/pt.2024.03>
- Hunter, P. J., Atkinson, L. D., Vickers, L., Lignou, S., Oruna-Concha, M. J., Pink, D., Hand, P., Barker, G., Wagstaff, C., & Monaghan, J. M. (2017). Oxidative discolouration in whole-head and cut lettuce: biochemical and environmental influences on a complex phenotype and potential breeding strategies to improve shelf-life. *Euphytica*, 213(8), 180.
<https://doi.org/10.1007/s10681-017-1964-7>
- Iakimova, E. T., & Woltering, E. J. (2018). The wound response in fresh-cut lettuce involves programmed cell death events. *Protoplasma*, 255(4), 1225-1238.
<https://doi.org/10.1007/s00709-018-1228-y>
- Kaya, E. D., & Bagci, O. (2021). Purification and biochemical characterization of polyphenol oxidase extracted from Kirmizi Kismis grape (*Vitis vinifera* L.). *J Food Biochem*, 45(2), e13627.
<https://doi.org/10.1111/jfbc.13627>
- Moon, K. M., Kwon, E. B., Lee, B., & Kim, C. Y. (2020). Recent Trends in Controlling the Enzymatic Browning of Fruit and Vegetable Products. *Molecules*, 25(12).
<https://doi.org/10.3390/molecules25122754>
- Palma-Orozco, G., Marrufo-Hernandez, N. A., Sampedro, J. G., & Najera, H. (2014). Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mango (*Mangifera indica* cv. Manila). *J Agric Food Chem*, 62(40), 9832-9840. <https://doi.org/10.1021/jf5029784>
- Saltveit, M. (2018). Pinking of lettuce. *Postharvest Biology and Technology*, 145, 41-52.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.06.001>
- Zhang, Y., Liu, Y., Wang, B., Fu, M., Liu, P., & Wei, J. H. (2023). Structure and histochemistry of the stem of *Dracaena cambodiana* Pierre ex Gagnep. *Microsc Res Tech*, 86(10), 1333-1344.
<https://doi.org/10.1002/jemt.24317>
- 十二、褐癍世界～蘋果汁褐化現象之探討，中華民國第四十四屆中小學科學展覽會，高中組化學科

【評語】 030309

1. 從生活中的觀察進行題目的發想，從觀察到生菜變色，並且針對其提出明確的疑問，以及旁徵博引進行一定程度的文獻探討，進而有想要找出解決方法的想法，這研究精神值得鼓勵。
2. 在實驗歷程中，能主動發現問題、進行粗萃取程序的改良，並應用不同染色技術來深入觀察變色情形，展現良好的問題解決能力與實驗操作能力。使用的還原型谷胱甘肽應屬實驗級試劑，建議以檸檬汁或茶多酚等可食性抗氧化物替代，增強實用性。
3. 部分圖表若能標示標準誤及樣本數，清楚註明顯著性，會增加學術信度。多數關鍵實驗有使用統計檢定並呈現 P 值與 ANOVA 結果，顯示基礎數據處理能力良好。但部分照片僅作質性比較則較可惜。
4. 撰寫少部分段落用語偏口語，改為「本研究結果顯示」，將更具科學敘述。
5. 若能補充每組實驗之原始數值表，例如每次測定吸光值、蛋白質濃度、顏色變化時間於附錄中，將有助於評估結果之信賴度。
6. 照片解析度清晰，若能於放大圖加上箭頭或標籤指示變色區、細胞死亡區等，將更具說服力。

7. 在討論的部分，若是能夠加入一些應用上的討論，便可以增加該主題的實用性質，像是具體提出說浸泡在什麼樣濃度的抗氧化劑以及浸泡多少時間可以達到最佳的效果。

作品海報



生菜變色的秘密

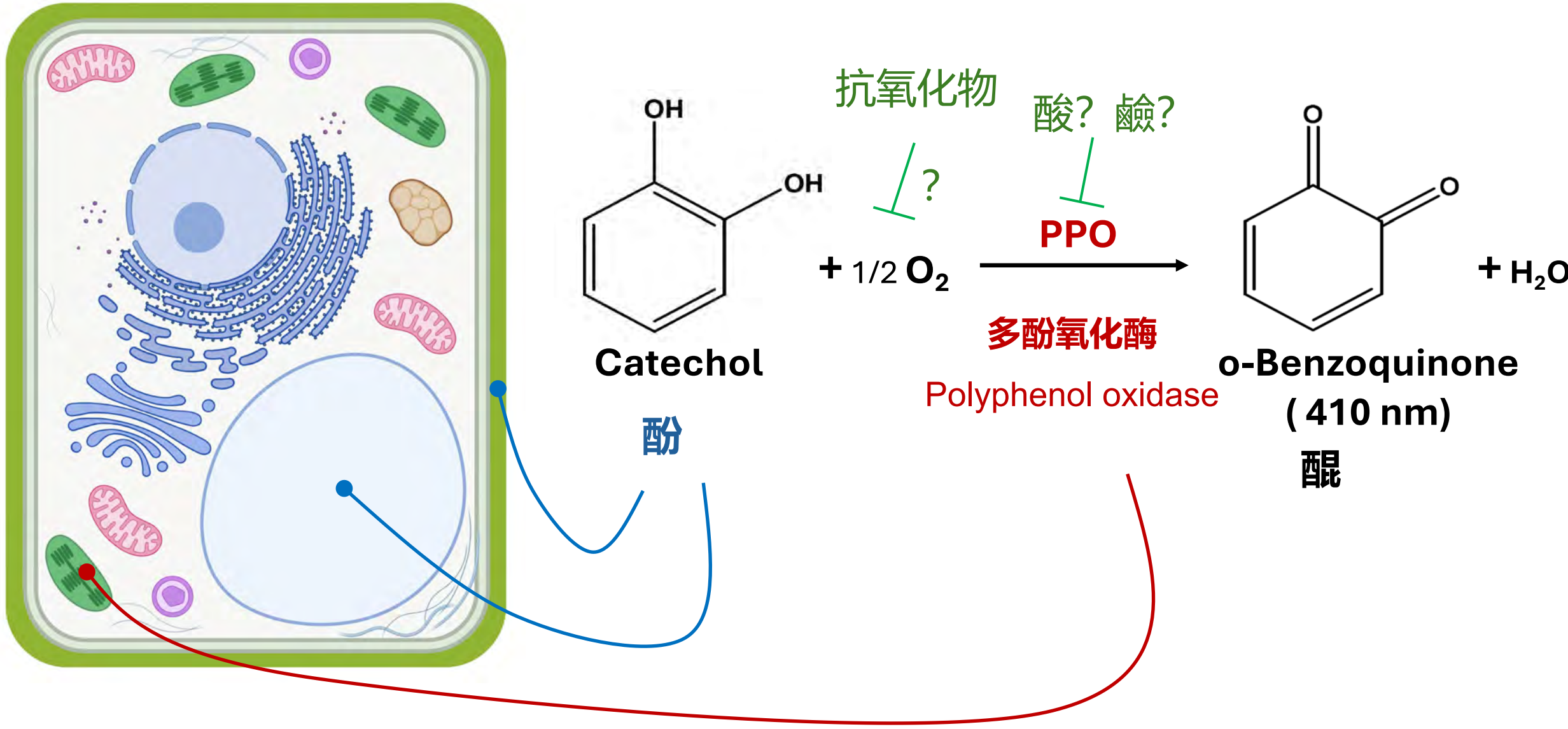
摘要

蔬果收成後變色的關鍵特徵是酵素催化褐變，主要由**多酚氧化酶 (PPO)** 催化**酚**化合物，氧化產生**醌**，伴隨非酶促反應，導致這些化合物聚合成深色色素。本研究主要探討**台灣福山萵苣變色**的原因及其緩解。首先，本研究觀察到植物組織莖和葉柄中，**維管束的韌皮部**最容易變色。接著證實了**鹼性**環境會抑制PPO的活性，而抗氧化劑**抗壞血酸**（即維他命C）和**還原型谷胱甘肽**(Glutathione, GSH)可以抑制褐變。此外也進一步**改良粗萃取PPO**的步驟，利用**兒茶酚**作為反應物，測量產物**鄰苯醌**的吸光質，**量化PPO的活性**。最後，利用**伊文斯藍**染色細胞膜損傷，以及組織切片觀察，發現切面變色的細胞為木質不和韌皮部，但變色細胞並不一定為死亡的細胞，死亡的細胞也不一定會變色。綜上所述，本研究證實萵苣變色的部位PPO活性較高，且可以利用抗氧化劑抑制變色。

研究動機

酚類化合物是透過植物的次級代謝途徑合成的，主要存於**液泡**或**細胞壁**，**PPO**存在許多植物中**葉綠體**。刀切等物理損傷會破壞傷口表面的細胞**胞器隔間**，致PPO和酚類的釋放和混合，且細胞膜損傷會引起**細胞損傷**或**死亡**。目前已知**酸鹼度**可能會影響PPO對反應物的親和力。**抗氧化劑**可以與氧氣反應。抗壞血酸和GSH是被廣泛研究的抗氧化劑。但是，目前尚未知道維他命C和GSH是否能抑制台灣福山萵苣變色。

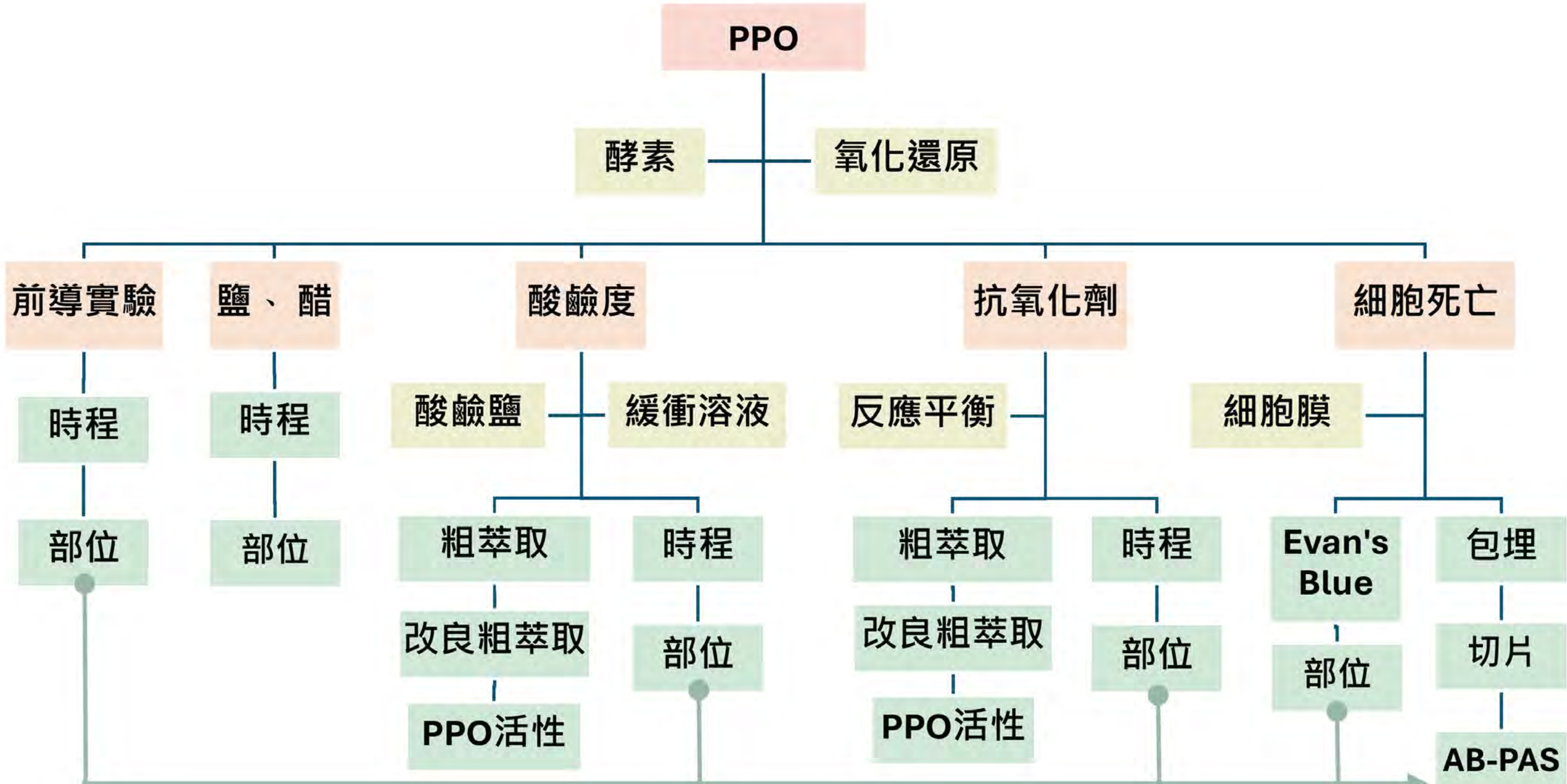
生菜變色的氧化還原反應



研究目的

「探討生菜變色的原因，以及延緩生菜變色的方法」

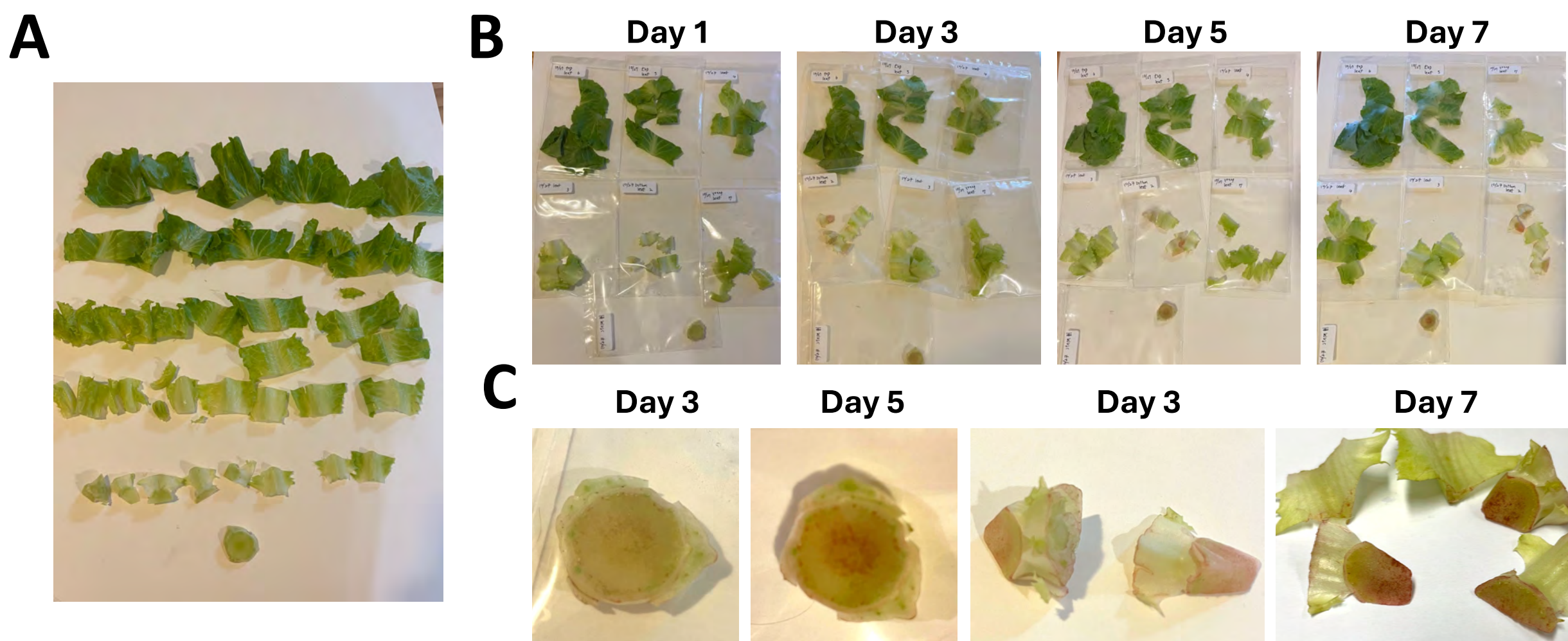
生活經驗	• 生菜切面變色是不新鮮嗎？
文獻探討	• 多酚氧化酶及抗氧化物對氧化還原反應的影響
課本相關知識	• 酵素催化，氧化還原，維管束及細胞膜
目標一	• 紀錄生菜變色 部位 以及 時程
目標二	• 紀錄鹽水及食醋抑制生菜變色的效果。
目標三	• 探討 酸鹼性 對生菜變色的影響。
目標四	• 探討 抗氧化物 抑制生菜變色的效果。
目標五	• 探討生菜變色和 細胞死亡 的關係。



研究方法

- PPO活性測量：取50μl粗萃取與250μl 60mM兒茶酚，反應10分鐘，以分光光度計測量410 nm吸光值。
- 布拉德福蛋白質定量：利用考馬斯藍結合蛋白質而由紅色變藍色，以分光光度計測595nm吸光值，與標準品比色，測得樣品中蛋白質濃度。
- 偵測死亡細胞：葉柄切片以0.025% (w/v) 伊文斯藍 (Evan’ s blue) 水溶液染色，染成藍色即死細胞。
- 植物組織標本：莖及葉柄於10%福馬林固定後石蠟包埋，再以刨刀切片製成標本玻片，以Alcian Blue-PAS染組織中的酸性及中性多糖類物質。

前導實驗


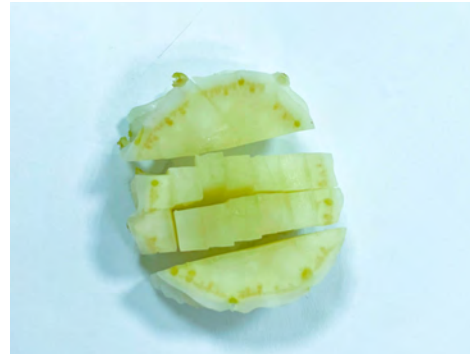


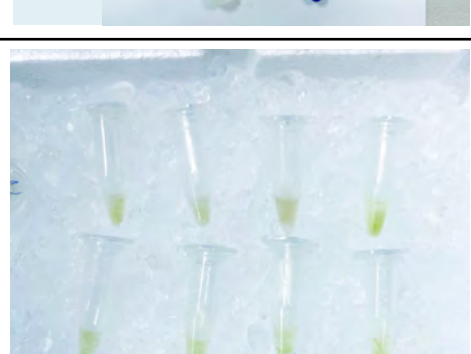
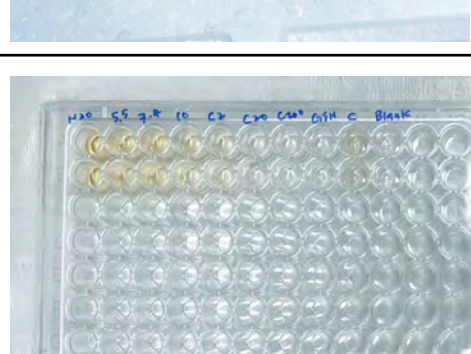


圖一、確認台灣福山萵苣不同部位變色時程。(A)萵苣切塊。(B)分部位收入PP夾鏈袋存於冰箱，拍照紀錄一個禮拜。(C)第三天莖部開始出現紅褐色。莖部和葉柄變色較葉子明顯。




粗萃取流程

1.  配製萃取液	7.  平衡離心管重量
2.  福山萵苣以清水洗淨擦乾，秤重	8.  離心10,000 × g, 15min, 4℃
3.  加入1:1(w/v) 萃取液，以果汁機打碎90秒。	9.  確認上清液與沉澱物分離
4.  以濾紙過濾	10.  離心管放置冰上，確保蛋白質活性
5.  收集濾液至錐形瓶	11.  以移液管取出含有PPO的上清液
6.  濾液移至離心管	12.  確認上清液與沉澱物分離

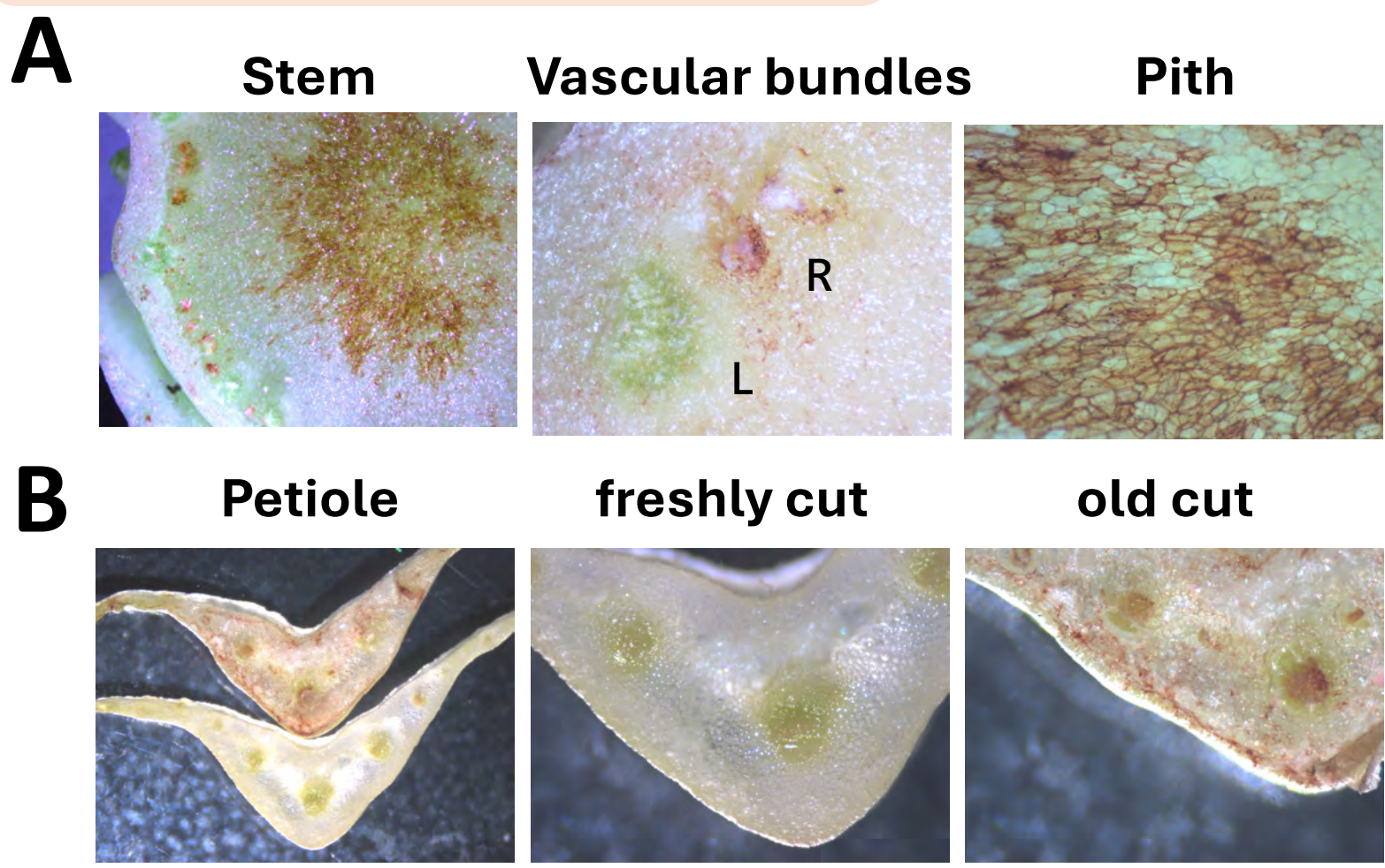
改良粗萃取流程

1.  取葉柄中維管束，均分成小塊。	
2.  切1cm厚的莖，均分成小塊，分三區取樣品。	
3.  取等重樣品，加入萃取液，以微型杵搗碎。	
4.  搗碎後萃取液無變色。	
5.  離心10,000 × g, 15min, 4℃，放置冰上，確保蛋白質活性。	
6.  取上清液與兒茶酚反應，於96孔盤測吸光值。	

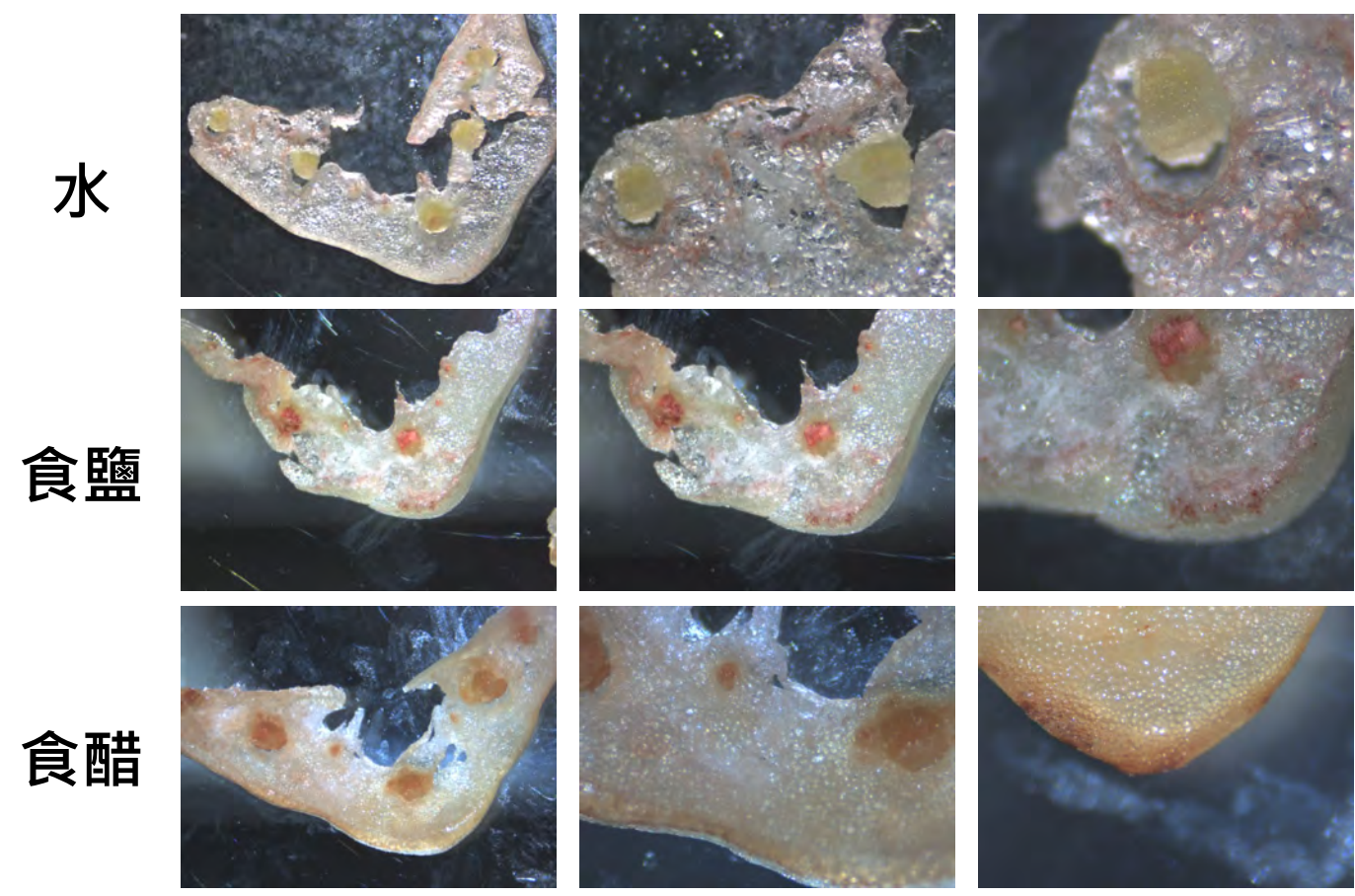
組織切片染色流程

1.  葉柄和莖脫水後以石蠟包埋。	
2.  以刨刀切薄片。	
3.  於溫水展片後，以載玻片撈起後風乾。	
4.  組織切片脫臘，再水化。	
5.  以 AB-PAS染劑組染色。	
6.  組織切片脫水後，封片觀察。	

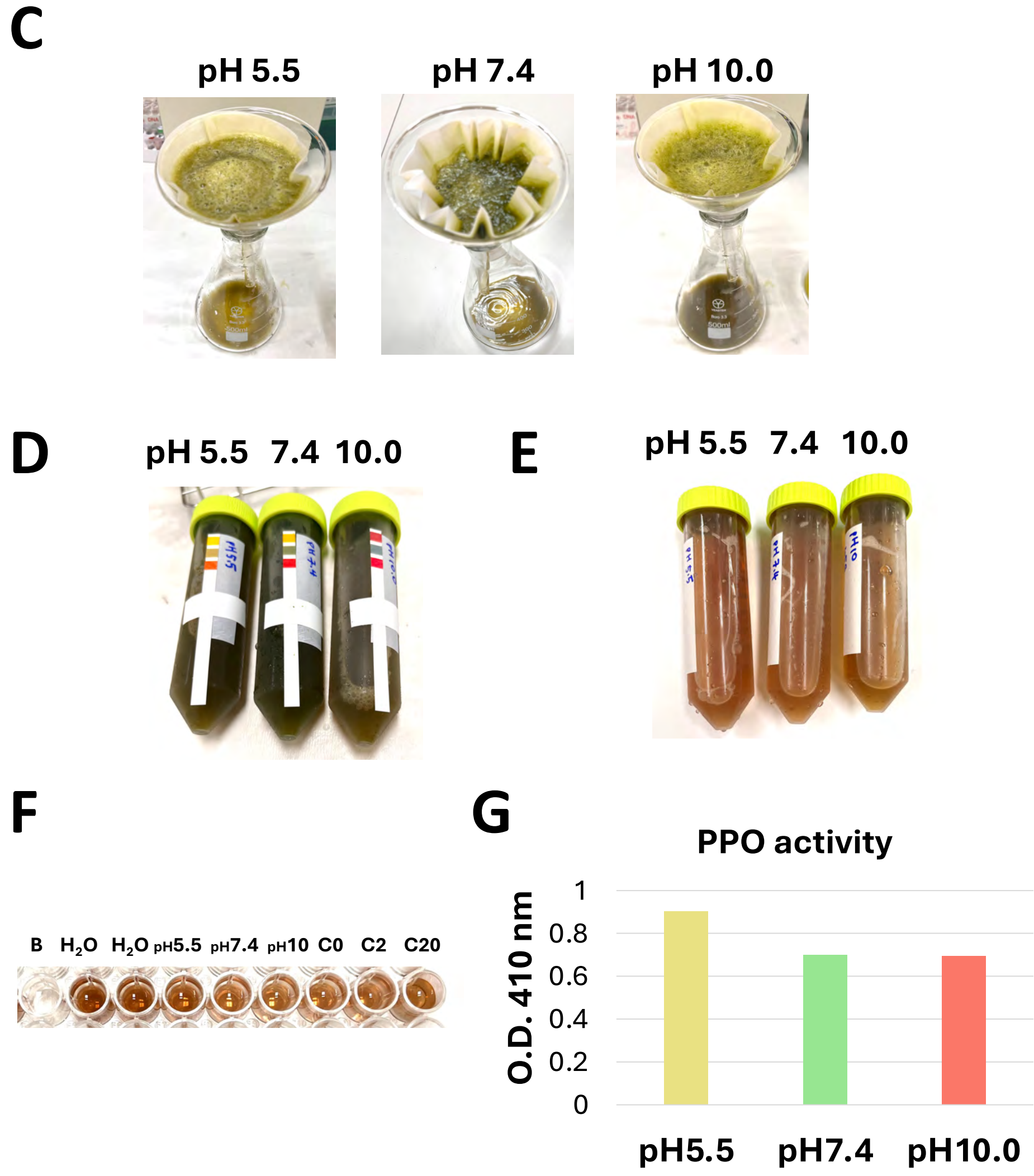
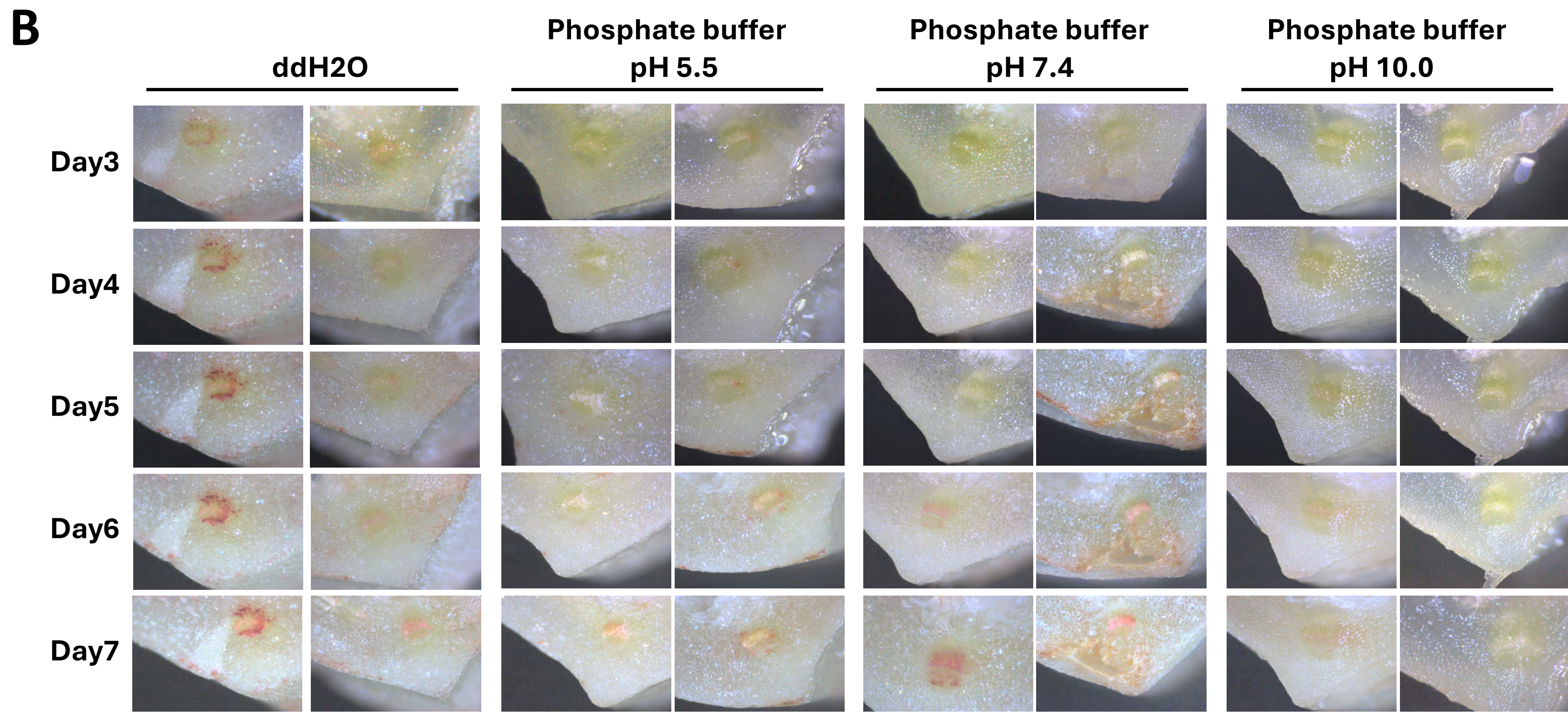
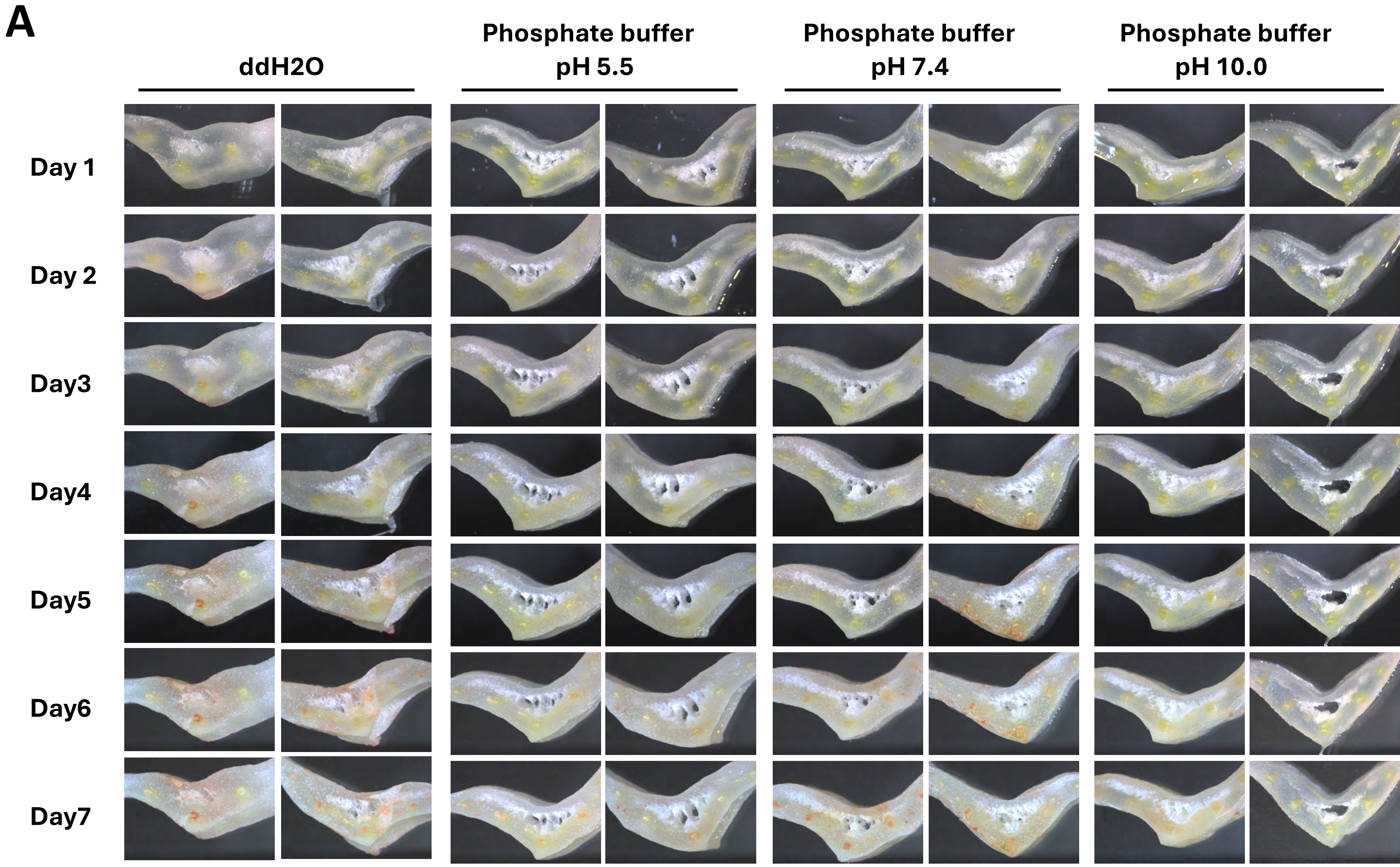
研究結果



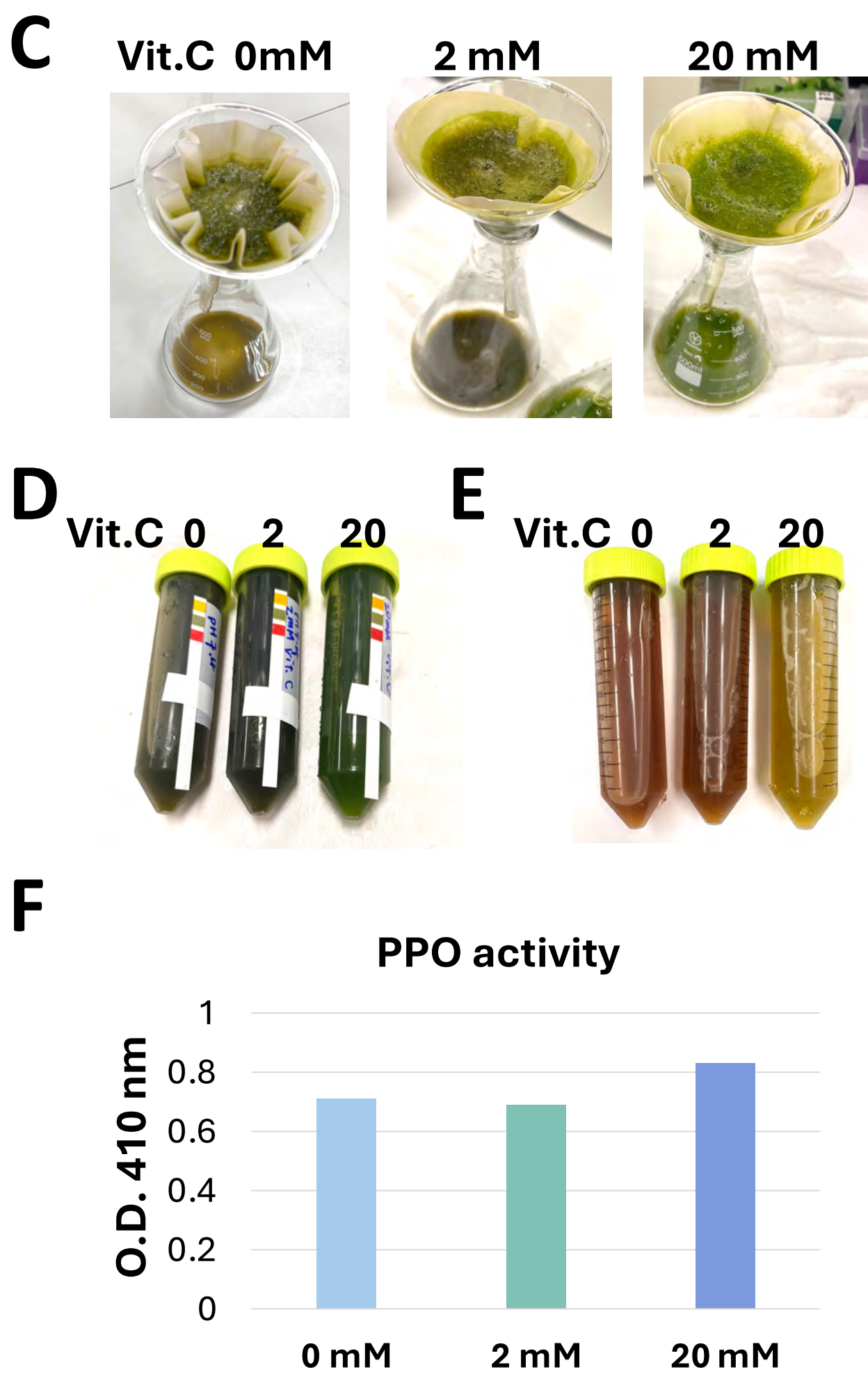
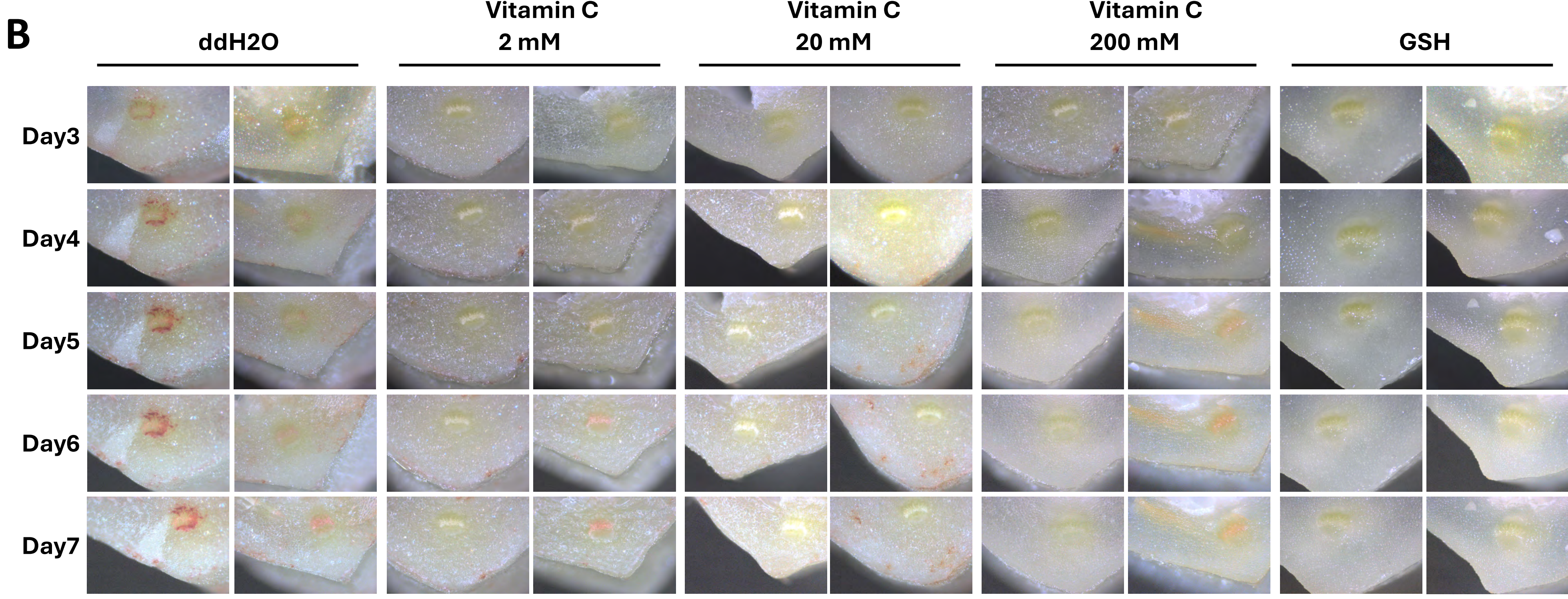
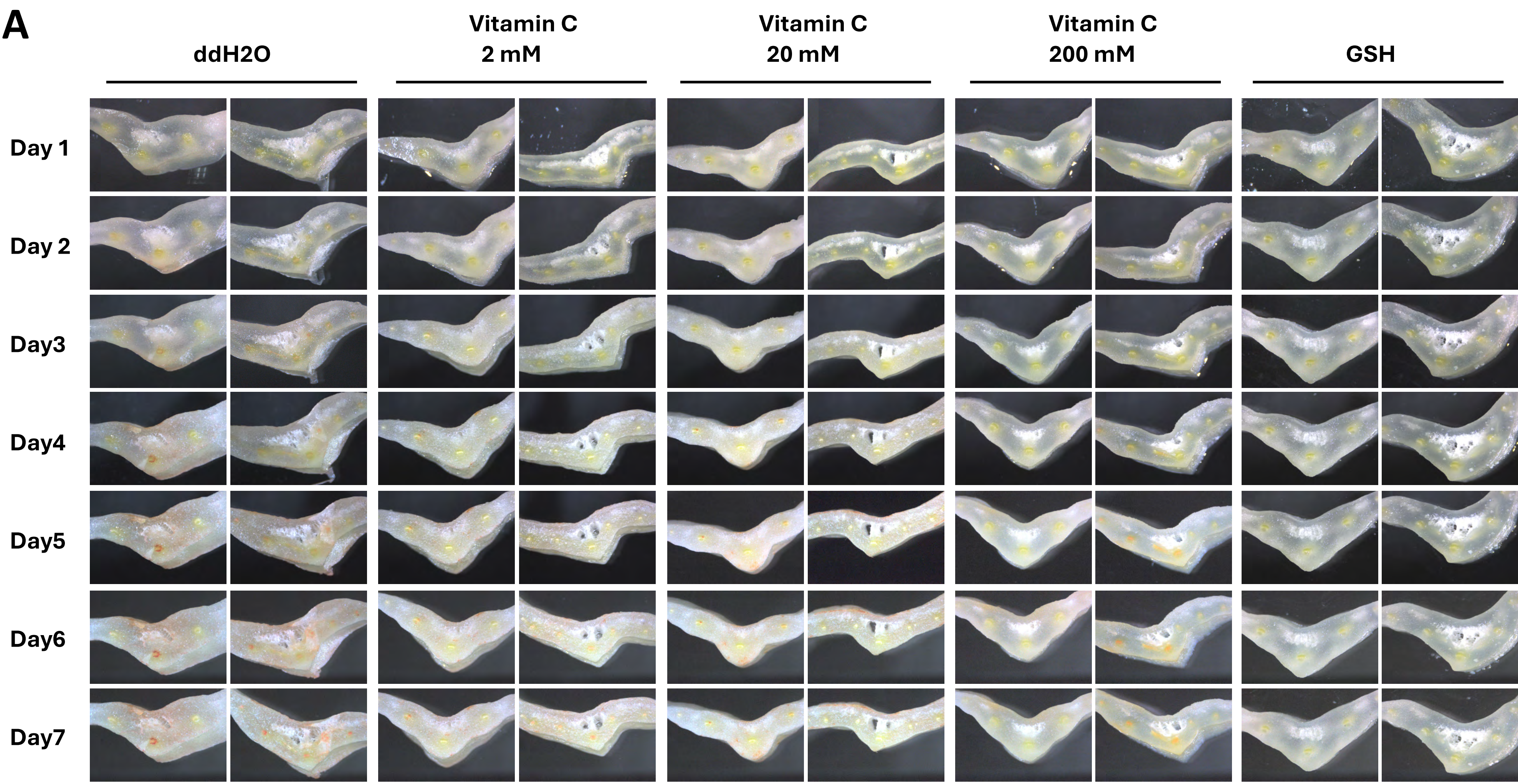
圖二、第七天莖及葉柄變色情形。(A) 莖 (Stem) 的 維 管 束 (Vascular bundles)及髓(Pith)的細胞壁均變色。部分維管束(R, stem bundle)已經變色，而有些維管束(L, leaf bundle)尚未變色。(B)已經切段的葉柄(petiole)，再由中間切開，觀察新切面(freshly cut)及舊切面(old cut)變色情形。



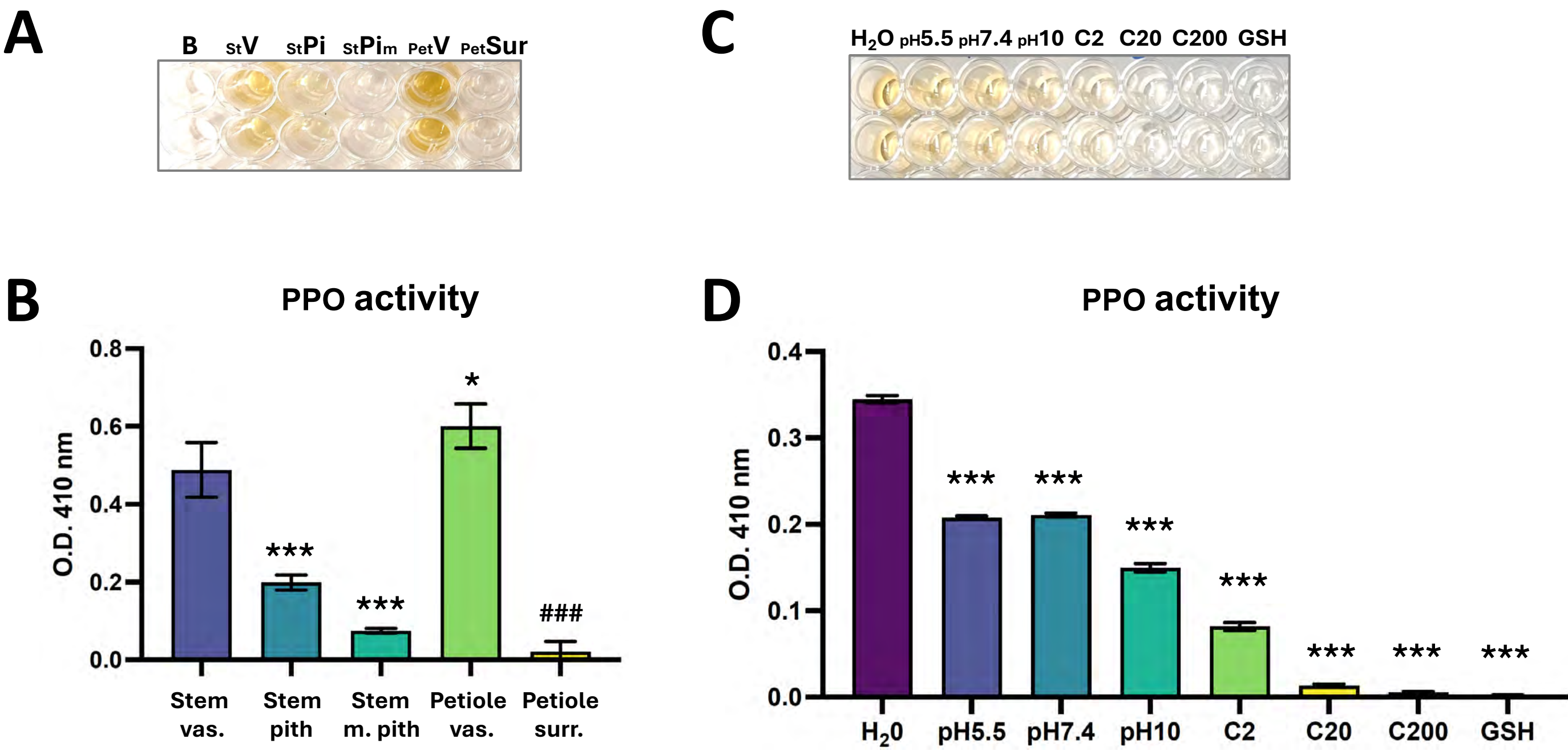
圖三、測試延緩生菜變色的方法。0.9% (w/v) 鹽水浸泡5min過的生菜維管束變紅，5% (v/v) 醋水浸泡5min過的不但變紅，還變褐色，結果和網路訊息不同。



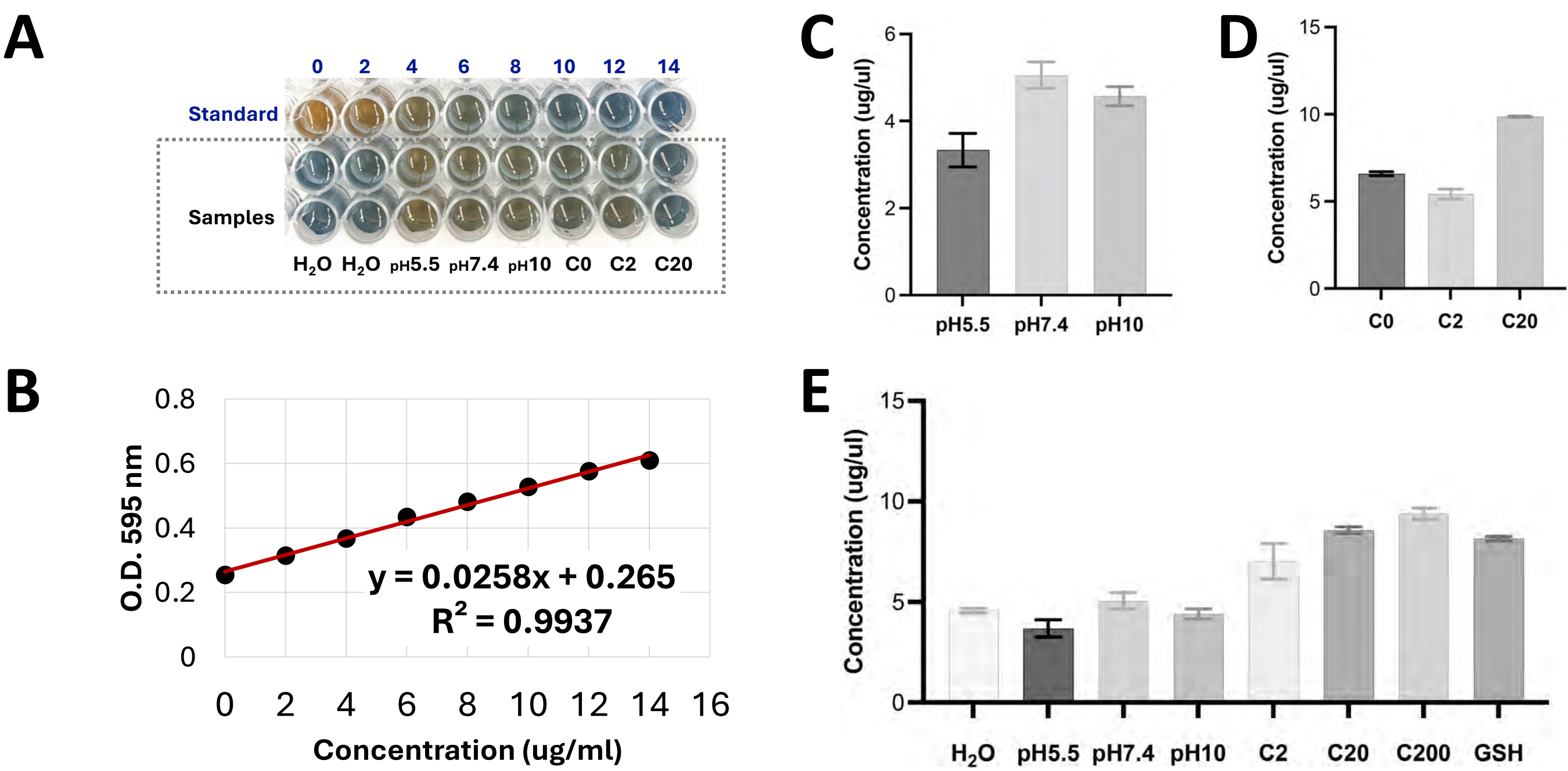
圖四、酸鹼度對萵苣葉柄變色的影響。(A) 葉柄切片浸泡不同的溶液(純水、 pH5.5、 pH7.4、 pH10.0 磷酸鹽緩衝液)後一週的變化。第三天開始出現顏色變化，以維管束部位變色程度最明顯。變色快到慢為 水 > pH7.4 > pH5.5 > pH10。(B) 第三到七天的維管束放大圖。(C)以不同酸鹼度的磷酸鹽緩衝液粗萃取。果汁機打碎90秒以濾紙過濾，收集濾液。過濾完綠色濾液已經變成墨綠色了。(D)以pH值試紙確認萃取液的酸鹼度。(E)離心完的上清液本身呈紅褐色。(F) 上清液與兒茶酚反應後的產物於96孔盤中。(G)測量410nm吸光值代表PPO的活性。兒茶酚變色成黃色的鄰苯醌可能無法精確觀察，因此在研究中改良PPO活性測量方法。



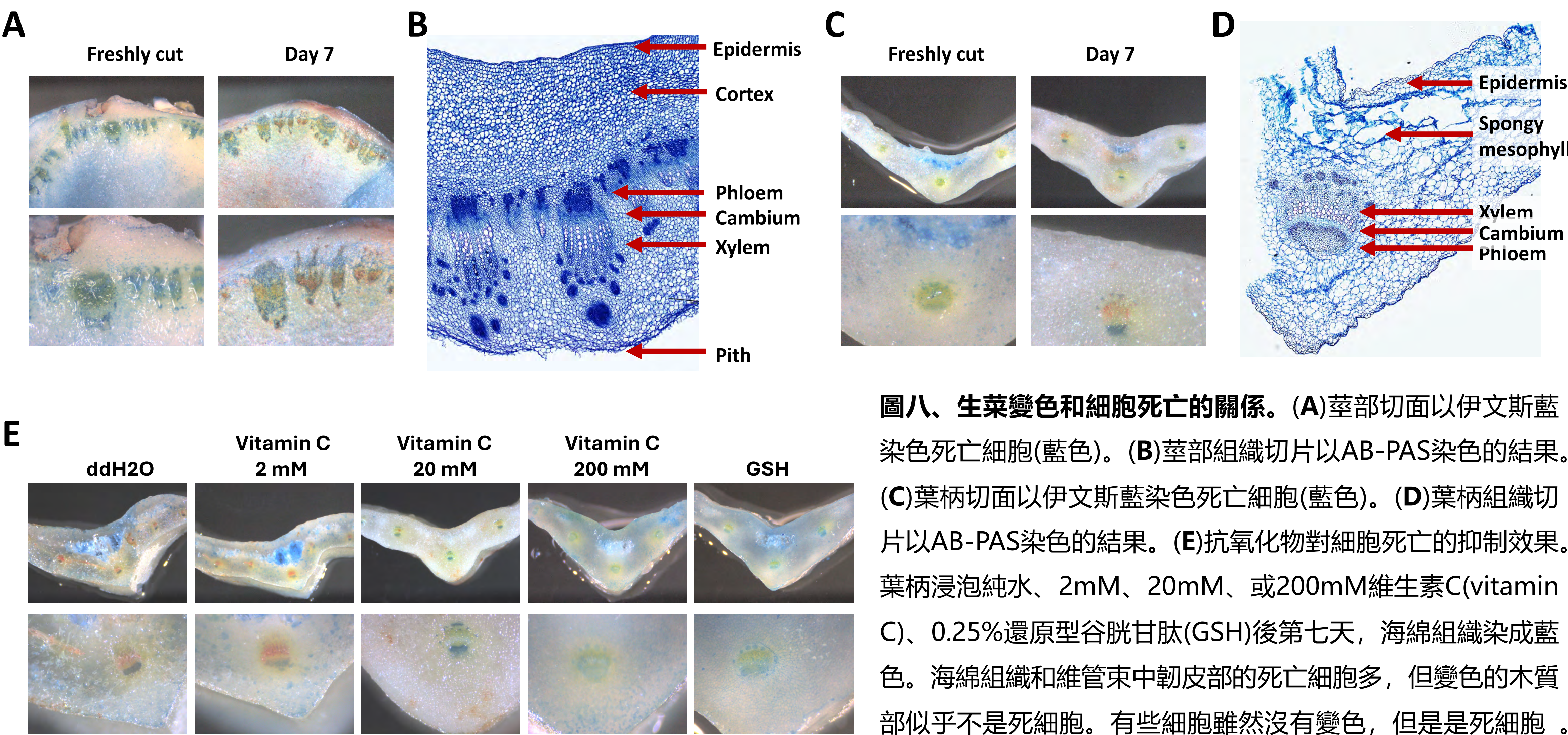
圖五、抗氧化物對萵苣葉柄變色的影響。(A) 葉柄浸泡不同的溶液 (純水、2mM、20mM、200mM維生素C、0.25%還原型谷胱甘肽)後，一週的變化。變色快到慢為純水 > 2mM 維生素C> 20mM 維生素C> 200mM維生素C > 0.25%還原型谷胱甘肽。(B)第三到七天的維管束放大圖。(C)以不同濃度的維他命 C 磷酸鹽緩衝液粗萃取。20mM維生素C萃取的濾液變色情形較慢。(D)以pH值試紙確認萃取液的酸鹼度。(E) 離心後上清液本身已經呈紅褐色。(F)以410nm吸光值代表PPO的活性。



圖六、改良後PPO活性測量。(A, B)解剖莖(stem)中的表皮、皮層、及維管束(vascular bundle; vas)、較外圍的髓(pith) 和中間的髓(middle pith; m. pith)、葉柄(petiole)中間維管束(vascular bundle; vas)、周圍海綿(spongy)組織，秤重後分段。每0.2g維管束組織加入200μl pH7.4磷酸鹽緩衝液，加入兒茶酚反應，測410nm吸光值。*, P<0.05; ***, P<0.001，與Stem vas.組比較。###, P<0.001，與Petiole vas.組比較。(C, D)解剖葉柄最中間維管束，秤重後分段測得410nm吸光值，代表PPO活性。***, P<0.001，與H₂O組比較。



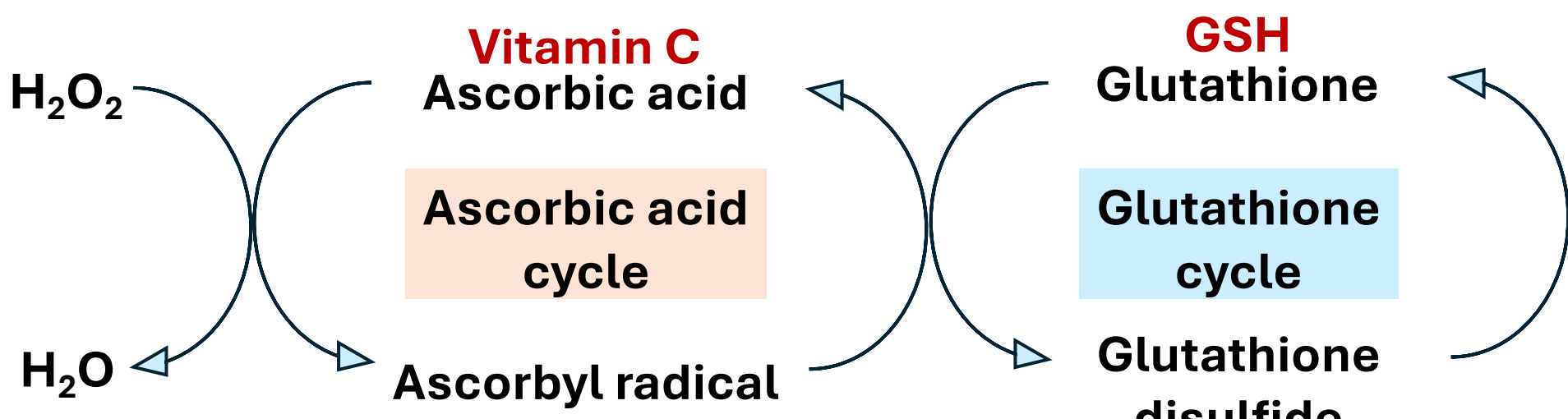
圖七、改良後蛋白質濃度定量。(A)以布拉德福法定量蛋白質濃度：利用考馬斯藍與蛋白質反應而由紅色變藍色，以分光光度計測595nm吸光值，與標準品(Standard, 0~14 μg/ml 牛血清白蛋白)比色，測得樣品(Samples)中蛋白質濃度。(B)由標準品所測得的吸光值得到的標準曲線，使用線性迴歸方法，找到曲線的最佳擬合直線。R² 線性相關係數 > 0.99 表示曲線的線性關係較強。利用線性公式可換算樣品的蛋白質濃度。(C, D)原始粗萃取步驟所得之蛋白質濃度。(E)改良版粗萃取步驟所得之蛋白質濃度。



圖八、生菜變色和細胞死亡的關係。(A)莖部切面以伊文斯藍染色死亡細胞(藍色)。(B)莖部組織切片以AB-PAS染色的結果。(C)葉柄切面以伊文斯藍染色死亡細胞(藍色)。(D)葉柄組織切片以AB-PAS染色的結果。(E)抗氧化物對細胞死亡的抑制效果。葉柄浸泡純水、2mM、20mM、或200mM維生素C(vitamin C)、0.25%還原型谷胱甘肽(GSH)後第七天，海綿組織染成藍色。海綿組織和維管束中韌皮部的死亡細胞多，但變色的木質部似乎不是死細胞。有些細胞雖然沒有變色，但是是死細胞。

討論

- 葉柄中變色程度多寡為：**維管束 > 表皮 > 海綿組織**，而莖部則是：**維管束>髓**。PPO活性則是：**莖的表皮+皮層+維管束 ≈ 葉柄的維管束 > 莖的髓 > 葉柄的海綿組織**。變色部位和PPO活性相符，**證實生菜葉變色和PPO活性大小呈正相關**。這些現象可能和PPO以及酚類的分佈不同有關。
- 粗萃取時鮮綠的菜汁在90秒間迅速褐變，可能是因為高速攪拌的過程破壞了大量的細胞，釋出許多酚類，在接觸氧氣和PPO反應而變色。且過濾和平衡離心管較費時，使得上清液本身褐色，並且可能會影響吸光值。為了**加速取得組織中的PPO**，本研究改良了粗萃取的方法，離心後取出的上清液在測量是無色透明的，一天之後才慢慢出現淡紅褐色。**萃取PPO過程越快速，測量PPO活性也越準確。**
- 0.1M**磷酸鹽緩衝液**是能保持一定範圍酸鹼度的等張溶液，可以防止細胞因滲透作用而破裂或萎縮，**避免讓細胞破裂或萎縮而影響實驗結果**。而pH7.4比較接近一般細胞生理酸鹼度。抗壞血酸和還原型谷胱甘肽溶於水均為酸性，為了控制實驗的pH值，因此選擇將這兩種抗氧化物溶於pH7.4的磷酸鹽緩衝液中，**確保變因只有抗氧化物，而不是酸鹼度**。
- 避免莖變色**效果最好的是還原型谷胱甘肽GSH**。還原型谷胱甘肽是一種三肽，由麩胺酸、半胱胺酸及甘胺酸所構成。在植物中，還原型谷胱甘肽參與調節活性氧壓力：細胞中經由**谷胱甘肽-抗壞血酸循環**，能夠防止**活性氧和過氧化物**對細胞造成損害。細胞死亡時受損的細胞膜完整性破壞，過氧化氫和活性氧積累，而還原型谷胱甘肽能還原這些過氧化物，抑制褐變。
- 變色細胞不一定是死亡細胞，而且死細胞也不一定會變色**。推測可能的原因為：刀切面雖然會破壞細胞膜造成細胞死亡，但若是細胞胞器中沒有酚類，或沒有儲存PPO的葉綠體(維管束呈現綠色)，仍然不會變色。



結論

Day	1	2	3	4	5	6	7
H ₂ O							
pH 5.5							
pH 7.4							
pH 10							
2mM C							
20 mM C							
200 mM C							
GSH							

參考資料

- <https://www.mcgill.ca/oss/article/nutrition-you-asked/why-does-lettuce-turn-brown>
- Hunter, P. J., et.al. (2017). Oxidative discolouration in whole-head and cut lettuce: biochemical and environmental influences on a complex phenotype and potential breeding strategies to improve shelf-life. Euphytica, 213(8), 180.
- Iakimova, E. T., & Woltering, E. J. (2018). The wound response in fresh-cut lettuce involves programmed cell death events. Protoplasma, 255(4), 1225-1238.
- Moon, K. M., et. al. (2020). Recent Trends in Controlling the Enzymatic Browning of Fruit and Vegetable Products. Molecules, 25(12).
- 褐蘋世界～蘋果汁褐化現象之探討, 中華民國第四十四屆中小學科學展覽會, 高中組化學科

本研究所有圖片都為作者製作。