

台灣二〇〇五年國際科學展覽會

科 別：生物化學

作品名稱：竹筍老化之謎

得獎獎項：大會獎第三名

學 校：臺北市立內湖國民中學

作 者：鍾介恆

評語與建議事項：

竹筍的老化呈現一個經濟作物上的問題，作者嘗試瞭解老化的機制，並觀察如DNA斷裂，及二維電泳的分析，未來的發展可仔細考慮。



對於現在就讀國二的我，每個禮拜能從繁忙的學校生活和考卷堆裡，抽出幾天的時間，到處處有新鮮事物的實驗室裡做實驗，真是一大幸福！

因為從小就對綠色的東西有莫名的喜愛，所以我就選擇綠色的植物來研究。我最喜歡的科目就是生物，這和從小在樓上的花圃種東西時得到的經驗有很大關係，由此可證「**Learning by doing.**」是不變真理。此外，我平常還喜歡用看書、看電影、運動來消耗空閒時間。

我能順利的進行實驗和完成研究報告，最要感謝台大王愛玉教授的熱心指導，以及犧牲很多時間帶我做實驗的葉勝雄學長，還有實驗室裡其他的學長學姊，若沒有他們，我的研究就一定難產了，我衷心感激他們。

摘要

本研究是在探討收割後的綠竹筍(*Bambusa oldhamii*, green bamboo)的老化(aging)現象。一般人說的竹筍老了，通常是指竹筍的質地變硬，口感變差，此即是竹筍硬化的現象，而硬化的主因可能是竹筍受到逆境(stress)的刺激後，影響了基因表現的形態，導致纖維素和木質素的增加。

竹筍採收後以不同方式處理，觀察切面的變化後發現，以 0.2 M 蔗糖水浸泡 48 小時後的竹筍，其切面比浸泡於水中或置於空氣中的竹筍切面較白，筍尖較綠且沒有枯萎的情況。

不管是浸泡糖水、水或置於空氣中，都無法防止竹筍的硬化，但浸水和糖水可延緩竹筍硬化的情形，可見要防止竹筍老化，基本上要從抑制合成纖維素與木質素的酵素來著手。

抽取竹筍切面處組織中的 DNA 並以 DNA 電泳分析之後發現，竹筍的 DNA 有被降解成小片段的現象，其大小差不多是 180 bp 的倍數，可見竹筍遇到逆境時也可能會有類似 PCD (programmed cell death, 細胞程序性死亡) 的現象。

抽取不同處理竹筍的蛋白質進行 2D 電泳，比較電泳結果發現，三種處理的竹筍的共同點在於減少的蛋白質幾乎都分布在等電點較低的部分。增加的蛋白質大多數分布在等電點較高的區域，這些增加的蛋白質可能和竹筍老現象與 PCD 有關。

本研究還有兩個方向可以繼續延伸研究，第一個是將 2D 電泳上有明顯差異的蛋白質色點挖出，進行蛋白質定序，再從資料庫中比對，推測可能是何種蛋白質。第二個是研究抑制竹筍合成纖維素和木質素的酶的方法，保持竹筍的口感，使竹筍能成爲一種能外銷的食品。

一、前言

(一)研究動機

世界上竹子有千種以上，台灣有五十餘種。竹有防風、防洪、家用、工業用、及食用等等。蘇東坡更有：「寧可食無肉，不可居無竹」之說，可見竹子在中國文化中扮演非常重要角色。

竹子的嫩芽—竹筍，在夏天是一種常見且美味的蔬菜，但竹筍買回來後不馬上煮，質地變化很快，口感會由脆變硬，由微甜變苦，這是竹筍採收後的老化現象。竹農們採收竹筍後，有時會把竹筍泡到水裡或在切面抹鹽，希望能保持竹筍的口感，但這樣真的可以防止竹筍老化嗎？

(二)研究目的

- 1、竹筍為什麼會老化(硬化)？
- 2、竹筍老化後的蛋白質有什麼改變？
- 3、竹筍老化是不是與細胞凋亡有關？

二、研究方法及過程

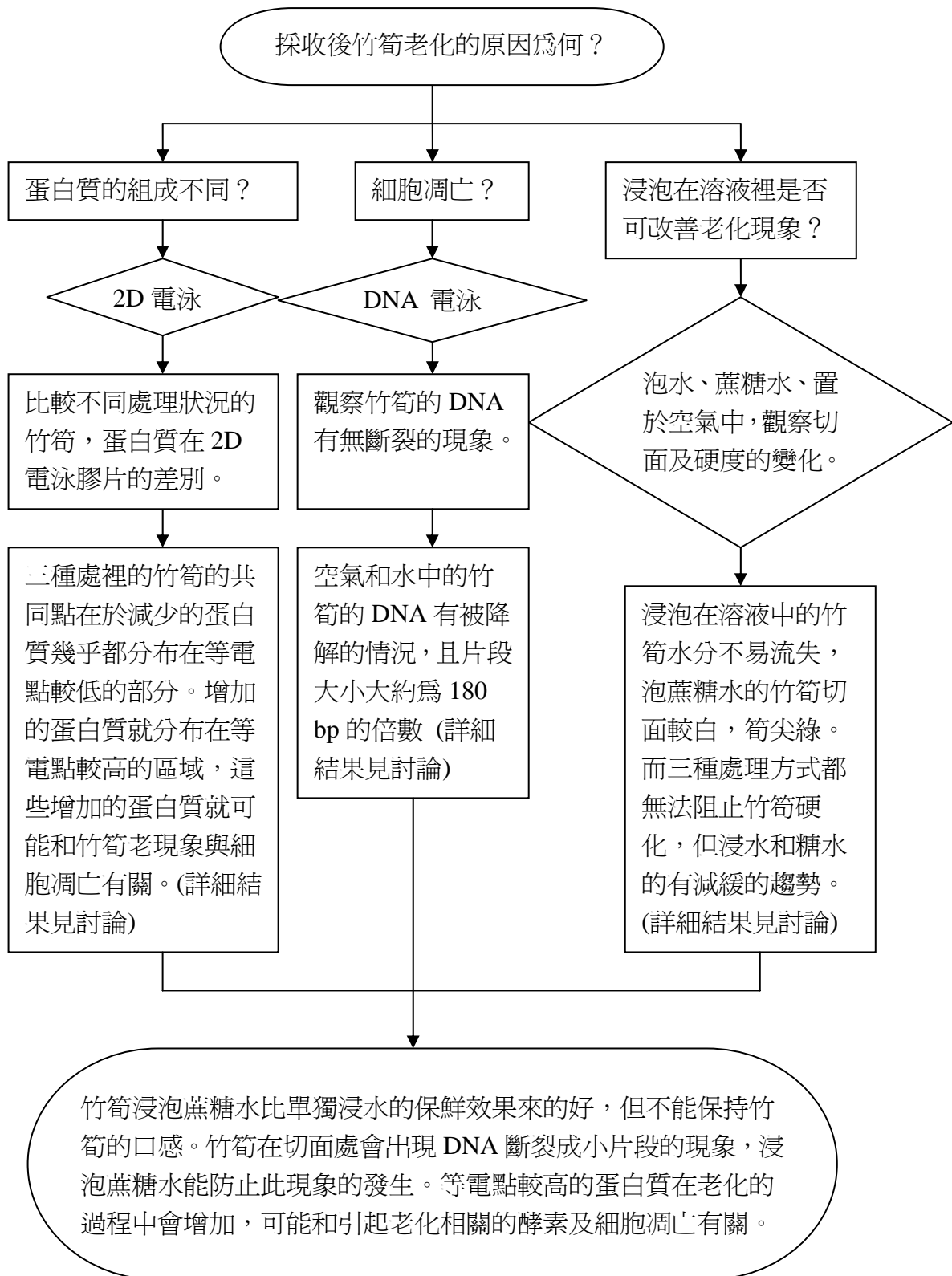
(一)研究設備

微量滴管、低溫高速離心機、果汁機、研鉢、直立式電泳槽、平面式電泳槽、震盪器(vortex)、震盪器(belly dancer)、微量離心管、培養皿、紗布、電子天平。

(二)研究材料

- 1.新鮮綠竹筍
- 2.無菌水
3. 0.2 M 蔗糖水
4. 液態氮
5. 100%, 70%酒精
6. phenol
7. 3 M 醋酸鈉 (NaOAc)
8. TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA)
9. TAE (40mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) 電泳緩衝液
10. 溴乙錠 (ethidium bromide, EtBr)
11. 2%瓊脂糖 (agarose) 電泳膠片
12. Tris-HCl buffer (50mM, pH 8.0, 含 1 mM EDTA, 0.07% 2-mercaptoethanol)
13. TCA (含 10% acetone, 0.07% 2-mercaptoethanol)
14. 2D 電泳 sample buffer (7 M Urea, 2 M Thiourea, 0.4% Triton X-100)
15. 10% SDS PAGE (製備方法依莊(2000)所列方法進行)
16. Tes buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 5mM EDTA, 2% [w/v] SDS)

(三)研究過程



圖一、研究流程圖

(四)研究想法及設計

- 1、觀察筍農及菜市場的菜販，他們會在竹筍的切面處抹鹽或泡到水中。這令我想到以前生物課中學過，植物和動物的細胞泡入水中會膨脹，放入濃度高的鹽水中會脫水，而動物的細胞在生理食鹽水中，液體的交換就平衡。植物經光合作用產生的糖會被轉換成較穩定的蔗糖經由韌皮部運送到植物各部位，推測蔗糖水可能可以當作「植物的生理食鹽水」。
- 2、生物個體的改變與蛋白質有很大的關係，可能竹筍採收後細胞中代謝作用快速改變，會產生出新的蛋白質，也有些蛋白質會受到抑制，這可能和竹筍纖維化，導致口感變差及味道變苦有關。
- 3、當動物受到逆境、細胞老化或是其他原因時，它會讓自己的 DNA 遭到降解，發生程序系的死亡 (PCD)，分解成好幾個小碎片，最後被巨噬細胞吞食。而在植物的方面，被病菌感染時，四周的細胞會用 PCD 來隔離被感染的細胞，使病菌不會再感染其他組織。竹筍由母體被切下，切面會快速硬化，但內部組織的變化較緩和。竹筍被由母體切下，就是遭受到一種逆境，因此推測竹筍的老化可能是利用一種細胞凋亡的作用來隔離逆境造成的影響。

(五)、研究方法

A. 浸泡竹筍實驗的方法：

- 1.從傳統市場買回新鮮綠竹筍後把它清洗乾淨。
- 2.在水中切除切面以上 1 cm 的部分。(見圖十四)
- 3.把竹筍放入分別裝有無菌水和 0.2 M 蔗糖水的培養皿中，讓浸泡液淹過竹筍切面 2cm。還有一組為直接放在空氣中，不浸泡任何溶液 (見圖十五)，和一個控制組 (控制組，見圖十七)。
- 4.分成 2、6、12、24、48 小時等六個時段採樣，且每隔 3 小時換一次浸泡液以避免微生物滋生 (見圖十六)。

爲了方便後續實驗，給了 15 個樣品編號，見下表一。

表一、竹筍樣品編號表。

處理方式 處理時間 (h)	空氣	水	0.2 M 蔗糖 水
2	1	2	3
6	4	5	6
12	7	8	9
24	10	11	12
48	13	14	15

B. 測量竹筍採收後硬度的變化的方法

- 1.竹筍分別放在空氣、水和蔗糖水中。爲了方便比較硬度改變的趨勢，將原先採樣的時段改爲間距相等的 10、20、30、40 和 50 小時。
- 2.在完成浸泡時段後，取出竹筍，用塑膠製的鑽子鑽下長度約 1cm 的竹筍條(見照片二十)。
- 3.竹筍條放在電子天平上歸零，用刀子切，記錄切斷那一刻所需的力量(見照片二十一)，再減去實驗前 (控制組) 的數據，做爲竹筍老化變硬的情形。

C. 蛋白質抽取的方法 (實驗方法依 Coffeen, Wolpert (2004))

- 2.竹筍秤重，加入 6 倍體積的 Tris-HCl buffer，用果汁機高速打兩分鐘。
- 3.靜置 30 min 後用四層紗布過濾。
- 4.用低溫高速離心機離心 30 min (4°C , 8000 rpm)，上清液就是竹筍蛋白質粗抽液。
- 5.以 3 倍體積的冰冷 TCA/acetone 溶液沉澱蛋白質，混合液放在 -20°C 冰箱靜置 45 min。
- 6.以 2000 g 離心 10 min。
- 7.取沉澱蛋白質，以 acetone 清洗三次以上。要進行蛋白質電泳時再以 sample buffer 溶解。

D. 細胞凋亡實驗的方法

- 1.取出約 1cm^3 的竹筍樣本，用液態氮研磨，加入 200 μl 的 Tes buffer 和 200 μl 的 phenol，用震盪器 (vortex) 混合均勻，離心 10 min。
- 2.在微量離心管裡，會有三層溶液，DNA 水層、蛋白質和 phenol 層，吸取上半部的 DNA 水層，加入 2.5X 的 100% 酒精和 0.1X 的 3 M NaOAc 混合均勻，放入 -20°C 冰箱 10 min，待 DNA 沉澱。
- 3.以 12000 rpm 離心 15 min，用 70% 酒精清洗三次。
- 4.將沉澱乾燥。加入 20 μl 的 TE 回溶。再加入 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 RNase A。最後以 1.5% agarose gel 進行電泳。

三、研究結果及討論

研究結果一：浸泡竹筍實驗。(見表二、圖十四、十五、十六、十七、十八)

表二、浸泡液及浸泡時間對竹筍切口影響之觀察紀錄表

處理時間 (h) \ 處理方式	置於空氣中 (室溫下)	浸於無菌水	浸於 0.2M 蔗糖水
2	切口還是濕潤的，小顆粒有點凹陷，較不容易刮出刮痕。	與控制組差異不大，較不容易刮出刮痕。	與未處理差異不大，較不容易刮出刮痕。
6	切口變得乾燥，微微的凹凸不平，原先的小顆粒凹陷成小孔。	與處理 2h 時無太大的差異。竹殼膨脹呈波浪狀，輕輕一碰就脫落了。	與處理 2h 時無太大的差異。但在切時比 2h 時的難切，可能是因為此株竹筍本來就較老的緣故。
12	切口完全乾燥，顏色變成淡褐色，明顯凹凸不平，但只有表面乾燥而已。在切成小塊後可以微微的看見一條條的纖維。	切口一樣無特別的改變，比其他兩種處理白，有兩層竹殼變皺膨起。	切口表面變成微微的波浪狀，再切時有一種脆脆的感覺，順著纖維就很好切，還會有「嘶」的聲音。
24	切口變成深褐色，完全乾燥，摸了有粗粗的感覺，有一些小小的纖維突出。竹筍尖端原本是綠的地方乾枯。	切口顏色白且光滑，是與最初的對照組感覺差異最小的一個結果。竹殼也和前三個處理時間一樣膨脹。竹筍的尖端乾枯，但還是綠的。	切口外緣有一點淡淡的褐色，但切口還是光滑。在切時的感覺很像軟一點的蘋果，脆脆的。竹筍尖端綠且光滑，還保持剛買回來時的樣子。

48	整枝竹筍縮水，竹殼脫落，纖維變得非常粗，切下去都會有喳喳聲，這可能和脫水有關。竹筍尖端整個乾掉，變成土黃色的。	切口整個從外緣變成咖啡色，有一股像消毒水的味道，切起來硬硬的，纖維較粗。尖端縮水，帶點土黃的綠。	比處理 24 小時的顏色深一點，中心還是白的。纖維也變得較粗，比 24 小時的難切。尖端保持著 24 小時的樣子。
----	---	--	---

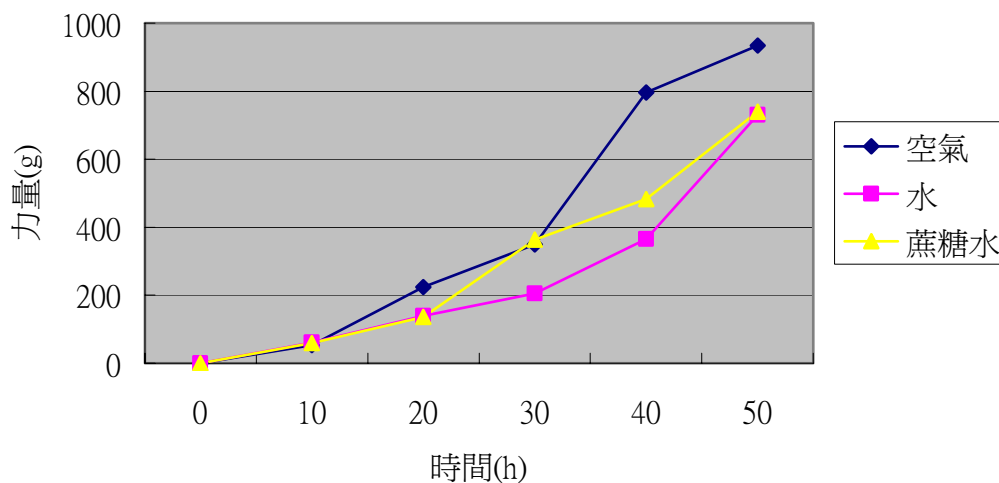
討論：

- (一) 不同的浸泡液及浸泡時間確實會影響竹筍切面的變化。放在空氣中的竹筍在經過四十八小時後可以看清楚有一條條的纖維（見圖十九），還有它的含水量明顯的變少了，變成乾扁扁的，水分流失非常多。
- (二) 浸泡在水和蔗糖水裡的竹筍水分流失的現象就沒這麼明顯（見圖十九），但浸水的竹筍切面變成深褐色的，而泡蔗糖水的竹筍顏色從 6 小時後就沒有明顯的變化，不過這種現象可能是因為有細菌滋生的關係，所以是否真的有差異還要從蛋白質 2D 電泳及 DNA 是否有降解情形的實驗中來判斷，不過用水和蔗糖水來浸泡竹筍可以防止水分的流失，可能可以保持竹筍的口感。
- (三) 植物行光合作用產生的糖會轉為較穩定的蔗糖，經由這個形式從維管束的韌皮部傳送到個體的各部位進行利用，或合成成澱粉儲存起來。在竹筍從地下莖冒出來時，許多的蔗糖會運輸到竹筍幼芽上，提供生長時所需要的養分。因此推測這糖水可能就像植物的生理食鹽水，可以讓植物細胞不會缺乏水分和養分，所以從外表看來，浸泡蔗糖的竹筍老化現象較不明顯。
- (四) 由 張 (1994) 得知，竹筍不同部位，粗纖維的含量也不一樣，本研究採樣的部位為粗纖維含量最高的部分(18.1±0.5%D.W.)

研究結果二、竹筍在收割後的硬度變化。(見表三，圖二，照片十、十一)

表三：以不同方式處理不同時間竹筍，切割時所需要的切力（單位：g）。

空氣					
實驗次數 處理時間(h)	1	2	3	4	平均
10	10	67	48	63	38
20	20	87	148	363	298
30	30	187	348	463	398
40	40	787	798	863	738
50	50	787	948	1063	938
水					
實驗次數 處理時間(h)	1	2	3	4	平均
10	10	30	104	49	64
20	20	83	207	155	112
30	30	222	281	171	145
40	40	428	476	409	149
50	50	725	1048	572	578
蔗糖水					
實驗次數 處理時間(h)	1	2	3	4	平均
10	10	55	39	66	76
20	20	258	110	-15	194
30	30	390	413	272	379
40	40	740	424	371	399
50	50	1511	512	438	501

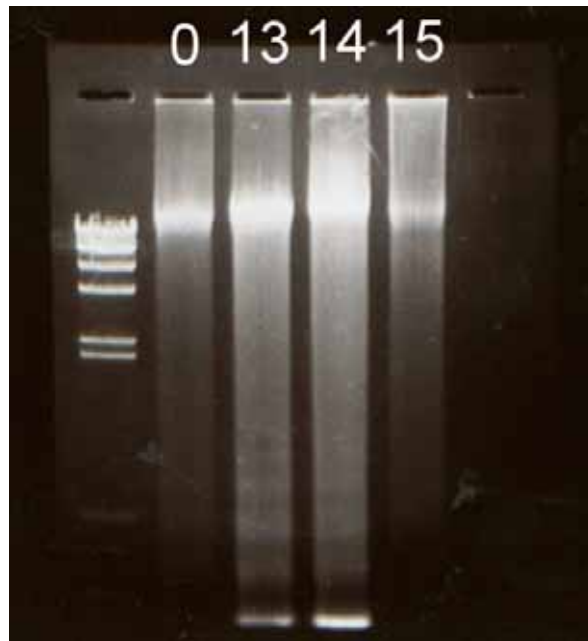


圖二、三種不同處理方式的竹筍硬度變化表。

討論：

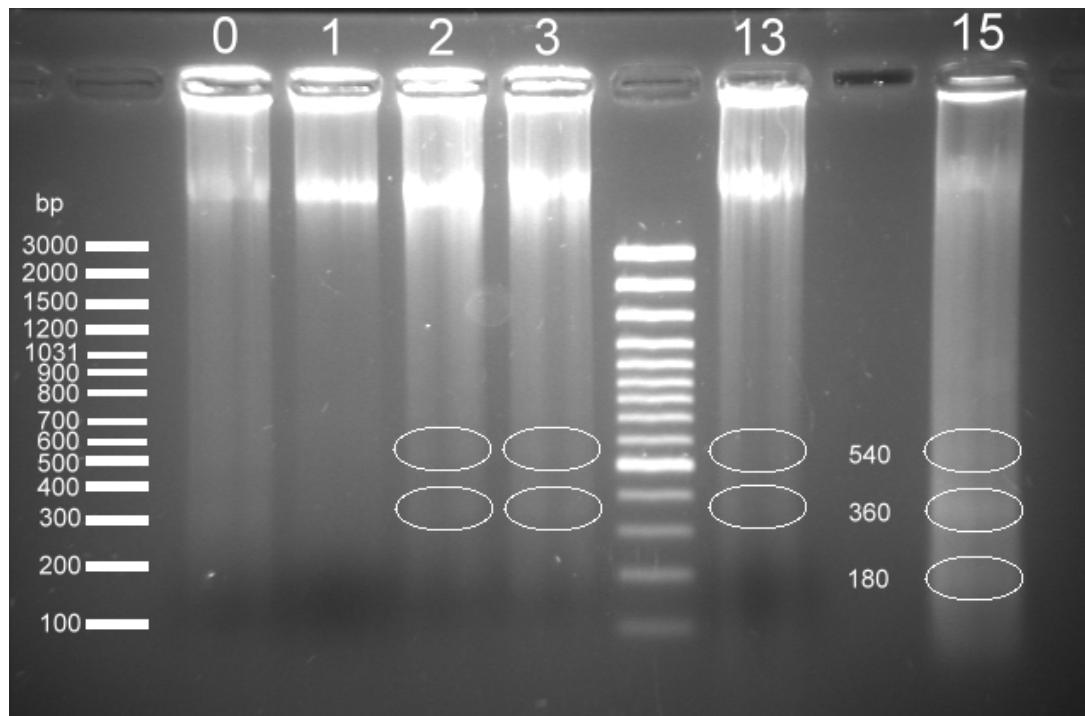
- (一) 比較圖二可以發現，不管是浸蔗糖水、水或不處理，都無法阻止竹筍纖維化。但浸水和蔗糖水可延緩纖維化的現象，放在空氣中的竹筍在 50 小時時比另外兩個處理硬得多。
- (二) 水處理的竹筍的硬度變化趨勢較平緩。蔗糖水處理的在 20~30 小時時突然增加了 200 g 左右，之後變化趨勢就平緩下來，在 50 小時時的硬度和水差不多。放在空氣中的竹筍分別在 10~20、30~40 小時時，硬度有大幅度的增加，30~40 小時增加了 420 克左右。三種處理方式的最後硬度為放在空氣中的最硬。
- (三) 使竹筍口感變差的最主要可能原因是由於木質素和纖維素的增加。會發生這種狀況主要是因為採收後的竹筍遇到逆境(stress)，這些逆境包括創傷、水分或糖分的減少，這些逆境對於竹筍就是一種訊號 (signal)，而訊號就會影響到基因表現 (gene expression)，進而影響竹筍細胞中的酵素活性，而酵素的活性改變之後，竹筍個體的生化代謝反應也會改變了。
- (四) 由[張 (1994)]得知，竹筍為禾本科多年生單子葉植物，維管束數散生，竹子的莖很強韌，是因為富含木質素。在竹筍長成竹子的過程中，纖維細胞和維管束都有木質化的現象。而竹筍在採收後，數小時內維管束及周圍的組織就會纖維化。因此要使竹筍的口感不要變差，可能要從阻止纖維細胞及維管束纖維化著手。

研究結果三、竹筍的老化是否和細胞凋亡有關？



圖三：編號 0、13、14、15 樣品的電泳結果。

0 為控制組，13 為放置於空氣中 48 小時，14 為浸泡於水中 48 小時，15 為浸泡於蔗糖水中 48 小時，最左邊為 DNA marker。編號 13、14 有出現 DNA 降解的情形。

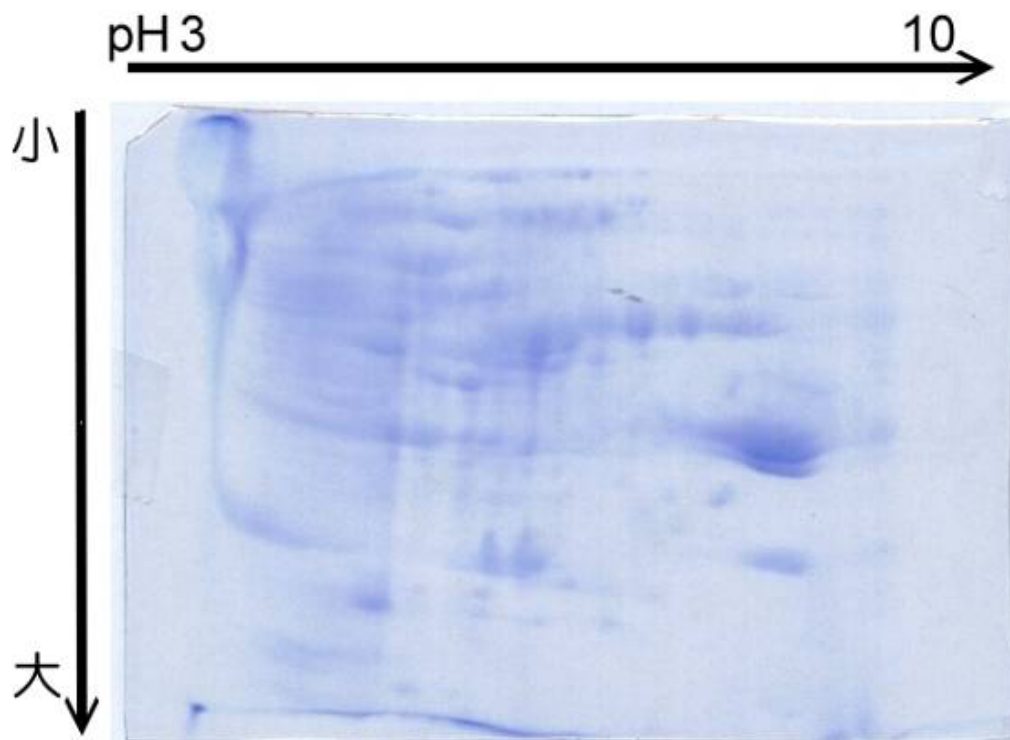


圖四：由 DNA marker 比對被降解的 DNA 片段大小。

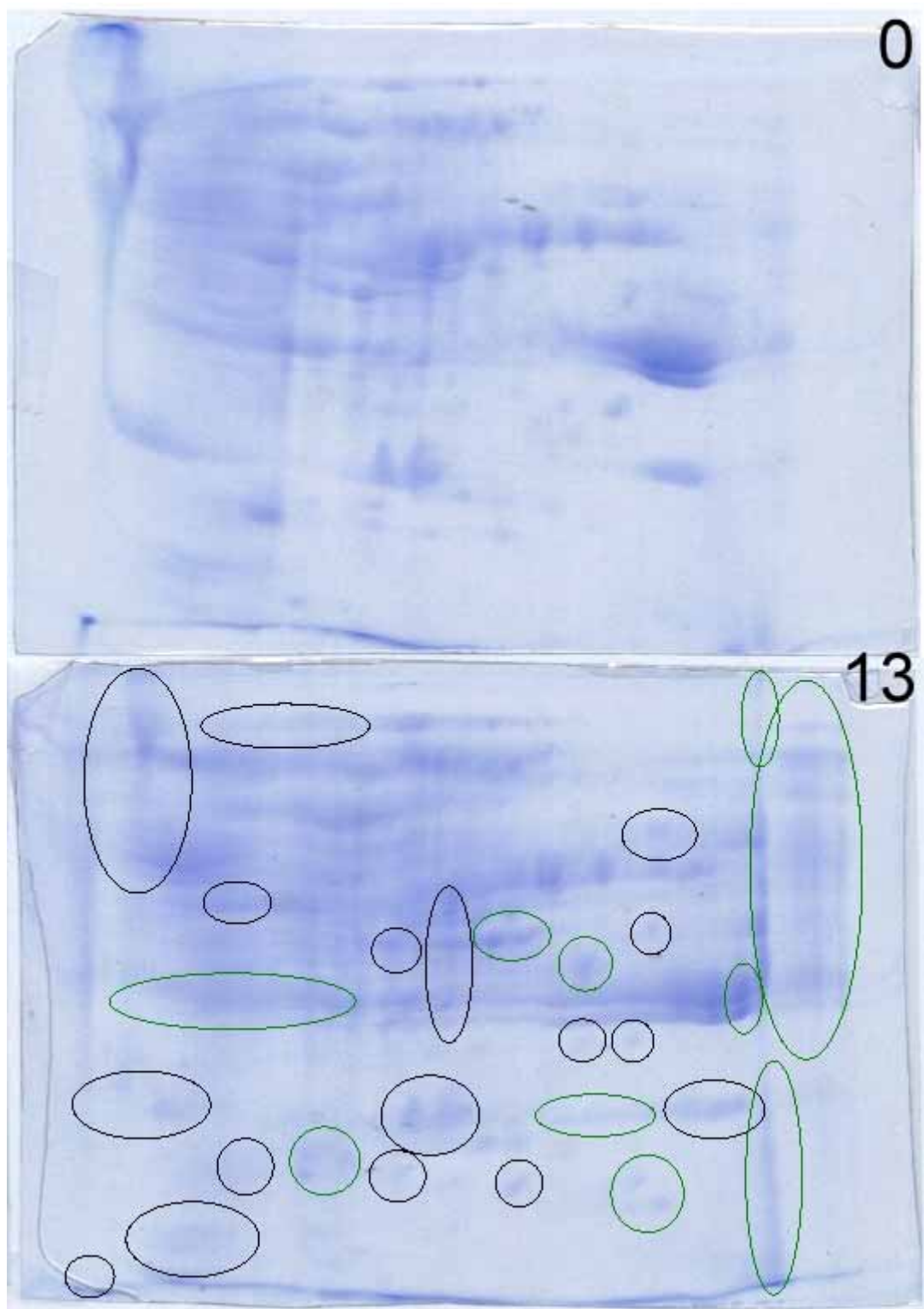
討論：

- (一) 以不同方式處理 2~24 小時樣品的 DNA 色帶的差異不大，但 48 小時的結果就有很明顯的差別 (見圖三)。放在空氣及浸泡於水中的樣品，DNA 都有被降解的情形，推測他們可能有細胞凋亡的現象。而浸泡 0.2 M 蔗糖水的竹筍，DNA 就沒有被降解的情況，與控制組相似。
- (二) 植物也會出現 PCD 的現象，例如，當植物的葉子被病菌感染時，四周的細胞會出現 PCD 來隔離被感染的細胞，由此防止其它部位遭到感染。從實驗結果中發現，採收後的竹筍可能也會有 PCD 的現象，推測是因為竹筍將切口處的細胞進行 PCD，形成一層壁障，來保護內部的細胞。
- (三) 細胞發生 PCD 時，有時可觀察到 DNA 被降解的情形，呈現的 DNA 片段約為 180bp 的倍數。染色體 DNA 在細胞核內，會纏繞在 histone (組織蛋白) 上，形成一串串的結構，稱為 nucleosome (核仁小體) (見圖二十二)，而每一個 nucleosome 的 DNA 長度約為 180 bp。經過比對後，切面的 DNA 確實有出現約為 180 bp 倍數的片段 (見圖四)，由此可證明採收後竹筍的切面可能會出現 PCD 的情形。

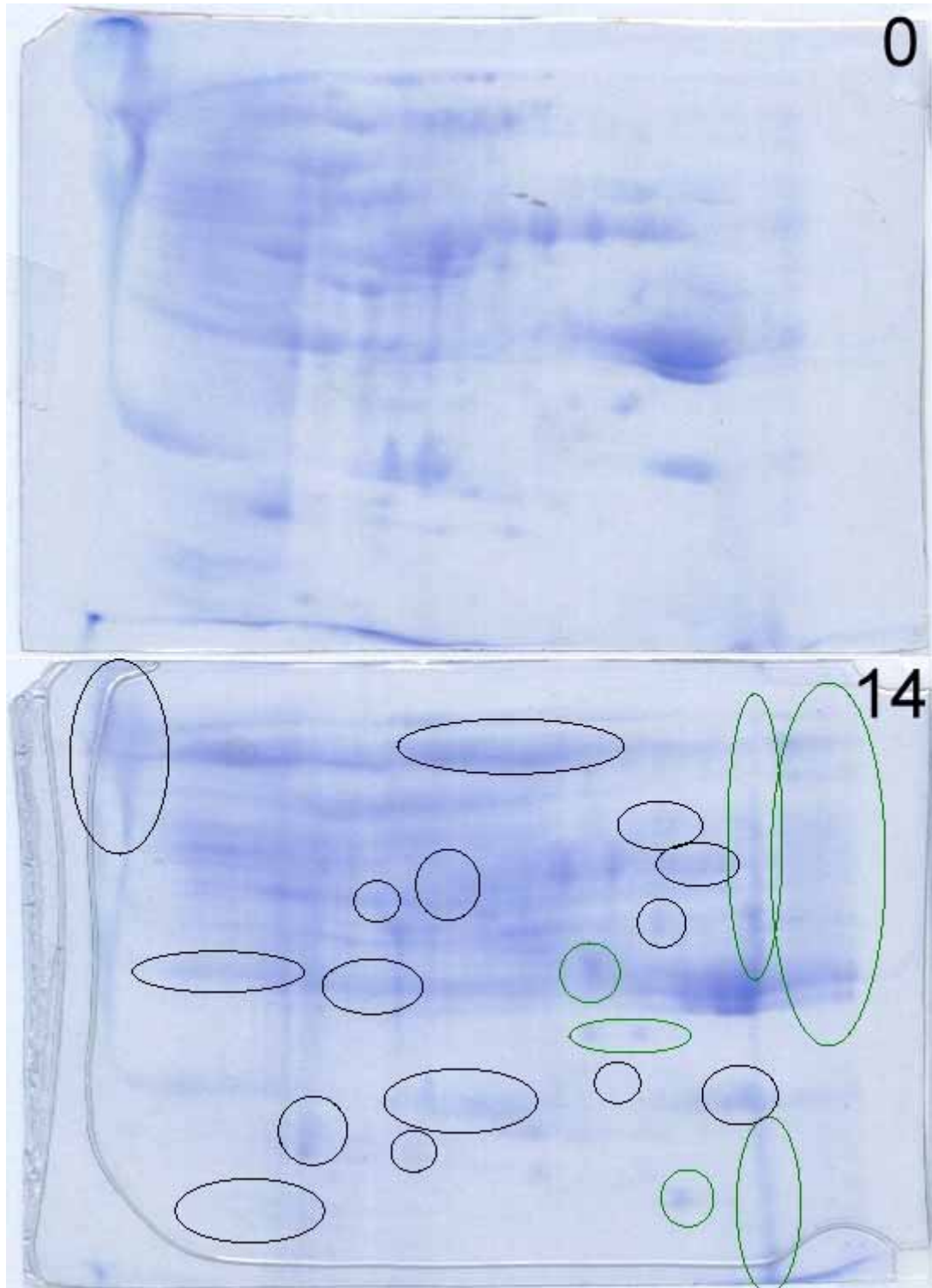
研究結果四、進行蛋白質二次元電泳。



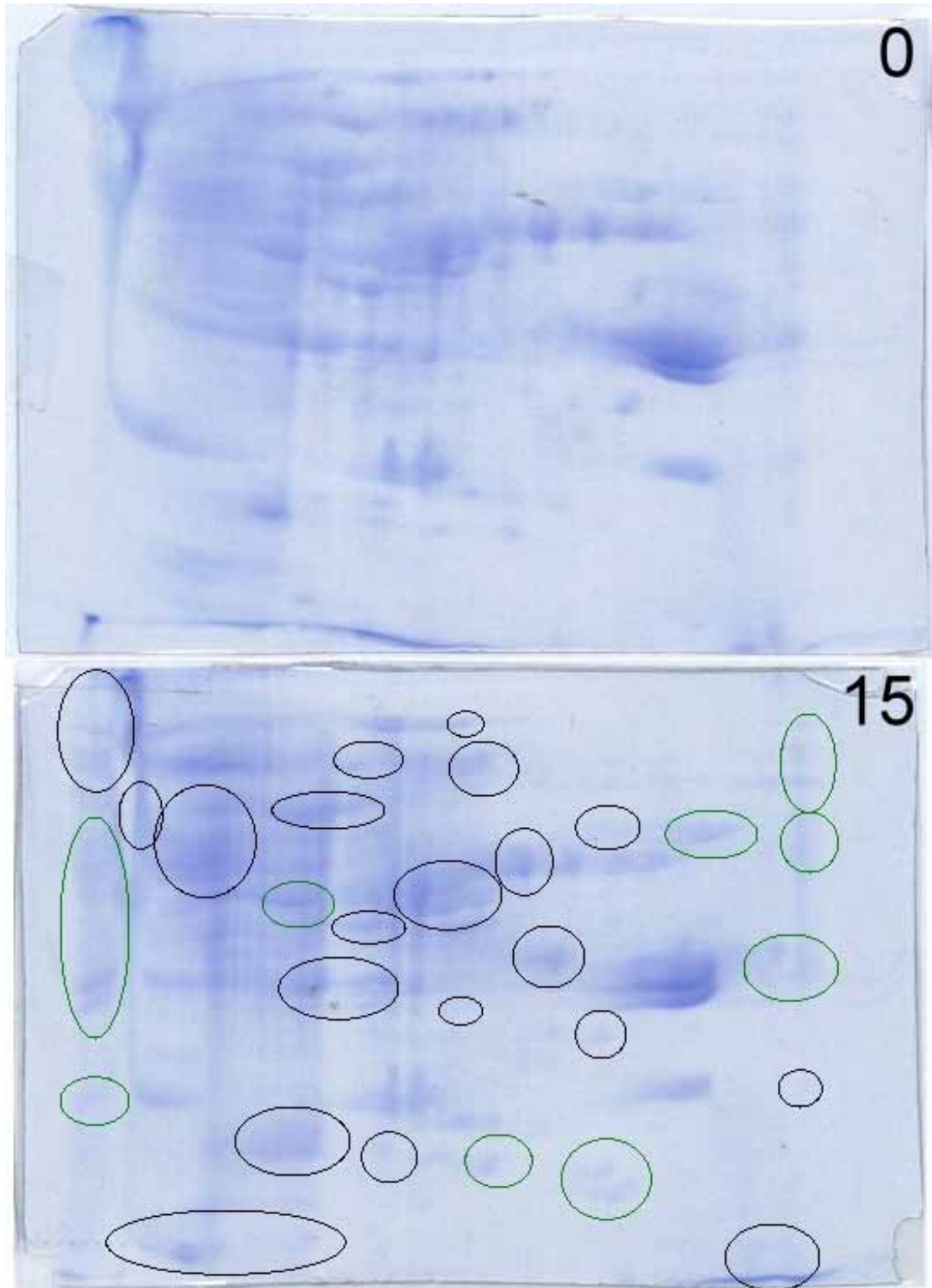
圖五、0(控制組)的 2D 電泳結果。



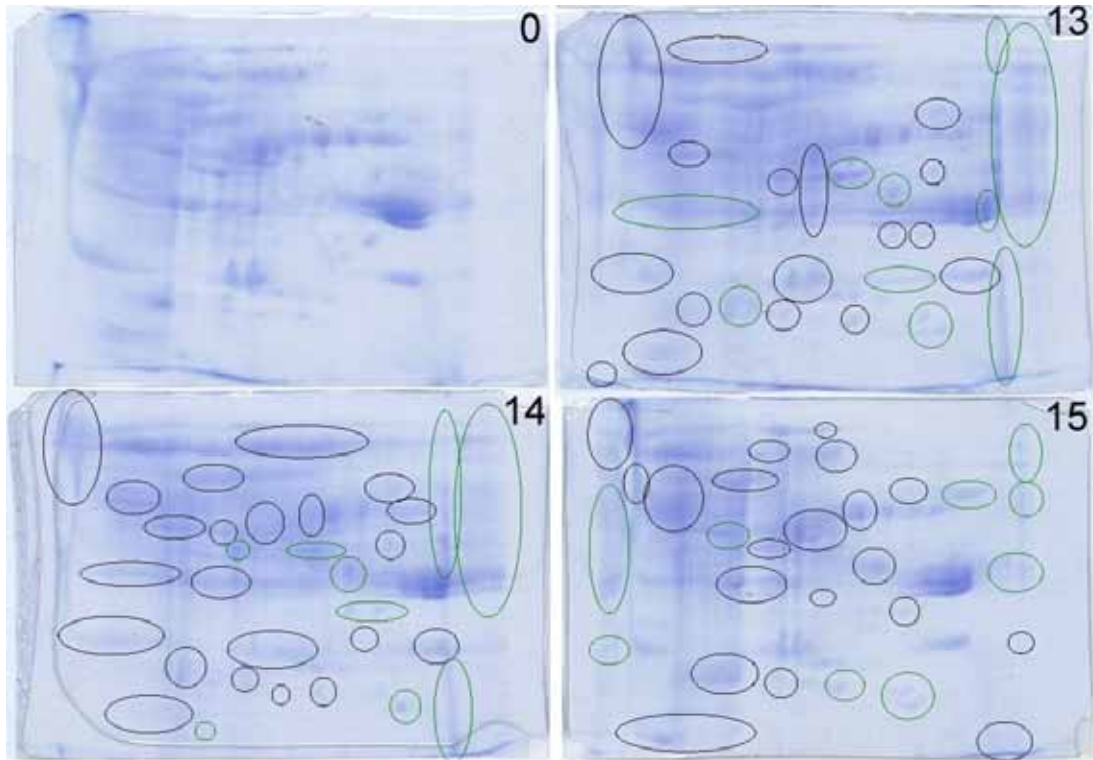
圖六、0(控制組)與 13(空氣處理 48 小時)的 2D 電泳結果比較。



圖七、0(控制組)與 14(水處理 48 小時)的 2D 電泳結果比較。



圖八、0(控制組)與 15(蔗糖水處理 48 小時)的 2D 電泳結果比較。



圖九、0(控制組)與、13(空氣處理 48 小時)、14(水處理 48 小時)、15(蔗糖水處理 48 小時)的 2D 電泳結果比較。

討論：

- (一) 進行 2D 電泳的樣品有四個，0、13、14、15，電泳的結果都有很大的差別。
- (二) 拿編號 15 (蔗糖水處理 48 小時) 與 0 (控制組) 做比較 (見圖八)，發現大部分增加的蛋白質的等電點較低 (綠圈)。15 的左上角等電點較低、分子量較小的部分有很多種蛋白質的量比 0 少了很多 (黑圈)。
- (三) 編號 14 (水處理 48 小時) 與 0 的比較結果 (見圖九) 和圖七很類似，增加的蛋白質等電點高幾乎都比較高，但 14 增加的點比 15 (蔗糖水處理 48 小時) 多。
- (四) 編號 13 (空氣處理 48 小時) 與 0 的比較後發現，在最右邊有出現與 14 相仿的色點，而在 15 的結果上就沒有。(見圖九)
- (五) 由這些實驗結果發現，在竹筍老化的過程中，減少的蛋白質大部分都分布在等電點較低的區域，而增加的蛋白質大部分是分布在等電點較高的區域。
- (六) 2D 電泳的第一次元是將蛋白質依等電點的不同而分開，在丙烯醯胺膠中加入 Ampholyte，在進行電泳時 Ampholyte 會形成連續的 pH 值梯度，蛋白質就會泳動和它等電點相等的 pH 值位置 [莊 2000]。
- (七) 沉澱蛋白質的方法為有機沉澱 (見圖二十三)，使用 TCA/Acetone。TCA 是一種強酸，它會改變蛋白質溶液的 pH 值，蛋白質就會沉澱下來了，但是 TCA 會破壞蛋白質的三級結構，會失去活性，所以用這種方法抽出的蛋白質就無

法測活性。有機溶劑加入蛋白質溶液後，會和蛋白質競爭水分子，最後蛋白質會因互相吸引而聚集在一起而沉澱下來。

(八) 2-mercaptoethanol 一種抗氧化劑，是用來還原雙硫鍵，破壞蛋白質的三級及四級結構(protein folding)，並保護蛋白質不會被氧化，但會讓一些蛋白質變性。

(九) 染膠片的染劑為CBR(Coomassie Brilliant Blue)，它的芳香苯環會與蛋白質的疏水區結合，還有亞硫酸基團(-SO₃²⁻)會和蛋白質的正電荷結合，使蛋白質呈現藍色色帶。

肆、結論與應用

(一)、結論

浸泡在水、0.2 M 蔗糖水和放在空氣中的竹筍，48 小時之後，以浸泡在蔗糖水的竹筍切面的顏色較白且筍尖沒有枯萎或變色。

在測試竹筍硬度的部分，發現在三種處理下，都沒有辦法抑制竹筍質地變硬，但浸水和糖水的可減緩硬化的現象。由此可知，要完全防止竹筍纖維化要從抑制竹筍內參與快速纖維化和木質化的酶著手。

採收後的竹筍在切面處會出現類似 PCD 中 DNA 被降解成 180dp 倍數大小的片斷的現象。

最後在 2D 電泳中發現，竹筍老化後，許多種等電點較低的蛋白質的量會減少，以編號 0 (控制組) 和其他三種處理的樣品比對後發現，增加的蛋白質大多都等電點高，減少的蛋白質等電點大多是較低，這些具差異性的蛋白質可能和竹筍老化及細胞凋亡有關。

(二)、應用

因為竹筍的質地變化很快，因此要成爲一種外銷食品是十分的困難，現在大部分都是用罐裝或冷凍的方式。但冷凍後再解凍，竹筍就會變得軟軟的，原先脆脆的口感就不見了。本研究發現浸泡蔗糖水能延長保持竹筍的新鮮度的時間，在運送的期間就能用它來保持竹筍新鮮，但它不能完全防止竹筍的口感變差。所以，還要找出防止快速纖維化和木質化的方法，兩種方法搭配在一起，就能讓台灣的竹筍以最佳的口感和新鮮度外銷，增加農產品的競爭力

(三)、未來展望

從 2D 電泳的結果可以看出可能有哪些大小或等電點的蛋白質會影響竹筍的老化，但不能判別是何種蛋白質，所以後續研究可把蛋白質挖出來做定序，並藉由資料庫找出是何種蛋白質操控著採收後竹筍的老化。

還有，使竹筍口感變差，主要原因是纖維素和木質素增加的關係，若研究出抑制某些酵素合成這兩種物質的方法，就能保持竹筍的口感。

玖、參考資料

- (一) J. B. Crawford, A. Fallow, K. Kinney, S. Mark, and E. Ward, **Plant Life**, Illustrated encyclopedia of science and nature, Time life, ASIA, 1990.
- (二) 李武建,蕭能 ,余瑞元,陳麗蓉,陳雅蕙,陳來同,袁明秀,宋賢一校閱,生物化學實驗原理和方法,藝軒,2002。
- (三) 莊榮輝,酵素化學實驗,國立台灣大學,2000。
- (四) 薛聰賢,台灣蔬果實用百科, 薛聰賢出版,35~37,1999。
- (五) Peter N. Campbell, Anthony D. Smith, 陳振東翻譯, 生物化學圖解, 藝軒, 2003。
- (六) Cecie Starr, Ralph Taggart 原著,丁澤民,王偉,張世 ,連慧瑞編譯,生物學上冊,藝軒,2001
- (七) 張燦如, 綠竹筍採收後生理與氣調貯藏之研究,國立台灣大學,1994
- (八) Warren C. Coffeen, Thomas J. Wolpert, Purification and Characterization of Serine Proteases That Exhibit Caspase-Like Activity and Are Associated with Programmed Cell Death in *Avena sativa*, *The Plant Cell*, Vol. 16, 857-873, April 2004
- (九) Mary K. Campbell, Biochemistry Third Edition, Saunders College Publishing, 1999
- (十) 莊榮輝,酵素純化與分析,<http://juang.bst.ntu.edu.tw/ECX/index.htm>
- (十一) Nucleosome and Its Incorporation into Chromatin, http://www.albany.edu/~ach_m110/nucleosome.html

Abstract

The purpose of this study is to investigate and analyze the aging of the harvested green bamboo shoots. The research focused on how to prevent the aging of bamboo shoots and why green bamboo shoots become aging. The term “aging” means that the taste of bamboo shoots becomes hardness post harvest.

At first, we tried to find out an anti-aging method, which is not only to keep the green bamboo shoots fresh, but also delicious. The method was to soak bamboo shoots in 0.2 M sucrose, in the water or without any treatment. After 48 hours, the cutting surfaces of bamboo shoots treated with sucrose were whiter, and their outer sheaths were greener than those of shoots soaked in the water or without treatment. The results showed that none of them can stop hardness. But the aging of sucrose- or water-treated shoots was retarded. The results suggest that inhibition of the enzyme activities involving cellulose and lignin synthesis may be required to prevent the aging of bamboo shoot post harvest.

To get insight into the reason why bamboo shoots become hardness, the differences of protein patterns and DNA patterns between aging and fresh green bamboo shoots were analyzed and compared. The DNA from the bamboo tissues near cutting surface was isolated and analyzed by agarose gel electrophoresis. The results showed that DNA from shoots was partially degraded. The fragments appear as a ladder of DNA with sizes in multiples of approximately 180 bp. The presence of the oligonucleosome-size DNA fragments suggest that the cells may undergo programmed cell death (PCD). The degradation of DNA was not observed in shoots treated with sucrose.

By comparing the results of 2-D gel electrophoresis, it was found that some proteins with low pI values decreased or disappeared post harvest, while proteins with increased levels were detected in the high pI area. These changes in these proteins may result in the aging of the bamboo shoots.

Prevention of the aging of green bamboo shoots is not easy. However, I found out from this study that soaking the bamboo shoots in the 0.2 M sucrose was a possible way to preserve them. The cutting surface of sucrose-treated shoots remained white, and the sheaths of the shoots was greener than those treated with other methods. Moreover, the degradation of DNA was not observed. However, it still cannot completely stop the

aging of bamboo shoots. Reducing the enzyme activities involving cellulose and lignin synthesis may be a direct way to prevent the aging of bamboo shoots. It seems like there are many things to discover in the future.

Introduction

Bamboo shoots are one of the common vegetables in the summer in Taiwan. However, the taste of bamboo shoot changes very fast post harvest. It becomes harder and harder in a few hours. This phenomenon is the so-called “aging of bamboo shoots”. The farmers sometimes soak bamboo shoots into the water or apply some salt on the cutting surface to prevent the hardening. But is this method really working?

Objective

1. Why bamboo shoots become aging so fast post harvest?
2. Do the proteins of bamboo shoots change during the aging?
3. Is cell death a reason that bamboo shoots become aging?

Experimental Methods

Treatment of bamboo shoots:

1. Green bamboo shoots were purchased from the market.
2. The base part of each bamboo shoot was cut off in the water.
3. The shoots were soaked in 0.2 M sucrose, water or without any treatment.
4. The soaking liquid was changed every 3 hours. Shoots were collected at 2, 6, 12, 24, and 48 hours after each treatment. The base sections of each sample were cut off and stored in the freezer (-20 °C) immediately.

Table 1. Numbering of green bamboo shoot samples

treatments time (h)	Air	Water	0.2 M sucrose
2	1	2	3
6	4	5	6
12	7	8	9
24	10	11	12
48	13	14	15

Determination of the hardness of bamboo shoot samples:

1. The treatments were same as above but the samples were collected at 10, 20, 30, 40, 50 hours after each treatment.
2. The base section of each shoot was cut into 1-cm stick with plastic awl.
3. The bamboo sticks were put on an electron balance. Then take down the weight when cutting them with knife.

Protein extraction:

1. Bamboo samples were homogenized with 6 vol (v/w) of Tris-HCl buffer in a Warning blender for 2 min, and then centrifuged for 30 min at 4 °C, 8000 rpm.
2. The resulting supernatant was mixed with 3 vol of cold TCA/acetone. The mixture was put at -20 °C for 40 min, and then centrifuged for 10 min (4°C, 2000 xg?)
3. The precipitated proteins were washed with acetone more then three times.

Analysis of DNA degradation:

1. Bamboo shoot samples were ground to a fine powder in liquid nitrogen using a motor and pestle.
2. The powder was mixed with Tes buffer and phenol, and then was centrifuged for 10 min.
3. The aqueous phase was transferred to a clean tube and 0.1 vol (v/v) of Na acetate (3 M, pH 5.2) was added. DNA was precipitated with 2.5 vol (v/v) of cold ethanol at -20 °C for 10 min.
4. After centrifugation for 15 min (12000 rpm), the DNA precipitate was washed with 70% ethanol, and then air dried.

- DNA was dissolved in TE buffer. RNase A (40 $\mu\text{g/ml}$) was added.
- DNA was analyzed by a 2% agarose gel.

Results and discussion

1. Treatment of bamboo shoots

The bamboo shoots that soak in 0.2 M sucrose (treatment 15), water (treatment 14) or just put bamboo shoots in the air at room temperature (treatment 13) for 48 hours were compared.

The cutting surface of treatment 15 was whiter, and the top of the shoots (the sheaths of shoots) were greener than those of treatment 13 and treatment 14. The results suggest that soaking the cutting surfaces of shoots in 0.2 M sucrose can keep the bamboo shoots fresh, and retard their aging.

2. Determination of the hardness of bamboo shoots

Comparing the results showed in Fig 1, none of the treatments can stop the hardening of bamboo shoots. However, the aging of treatment 14 and treatment 15 were retarded. The results suggest that inhibition of the enzyme activities involving cellulose and lignin synthesis may be required to prevent the aging of bamboo shoot post harvest.

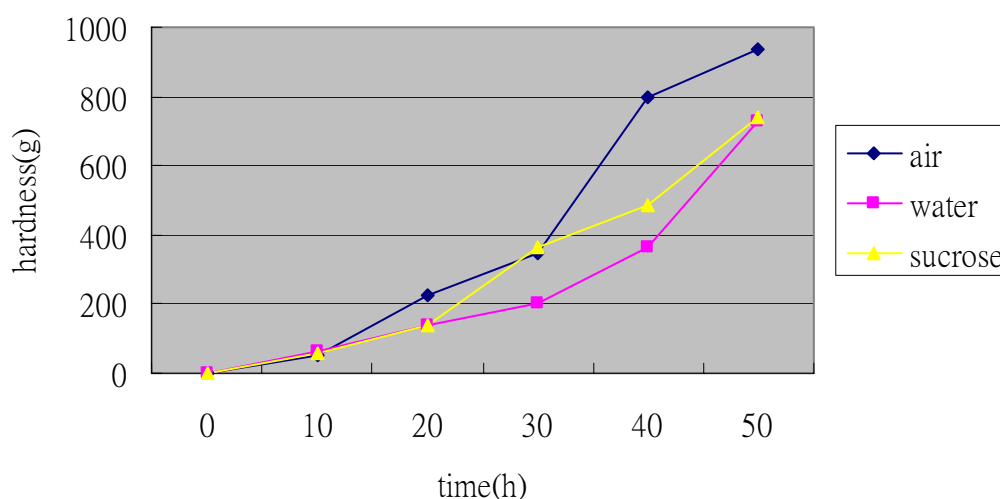


Fig. 1 the comparing of Determination of the hardness of bamboo shoots

3. Analysis of DNA degradation:

The DNA from the bamboo tissues near cutting surface was isolated and analyzed by agarose gel electrophoresis. The results (Fig. 2) showed that DNA from shoots of treatments 13 and 14 was partially degraded. The fragments appear as a ladder of DNA with sizes in multiples of approximately 180 bp. The presence of the oligonucleosome-size DNA fragments suggest that the cells may undergo programmed cell death (PCD).

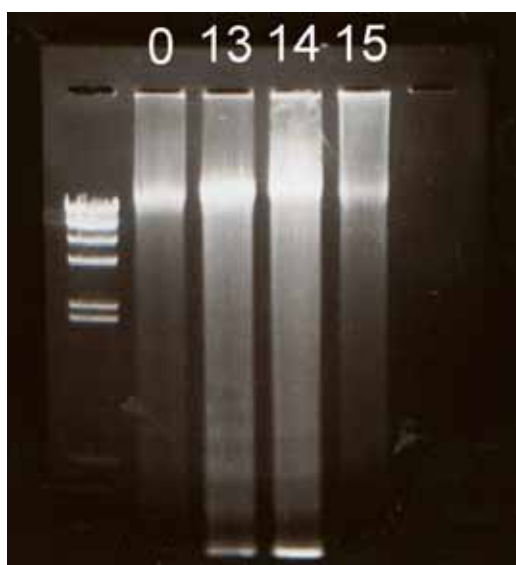


Fig. 2. Analysis of DNA from bamboo shoots treated with different conditions (treatment 0, 13, 14 and 15) by 2% agarose gel electrophoresis.

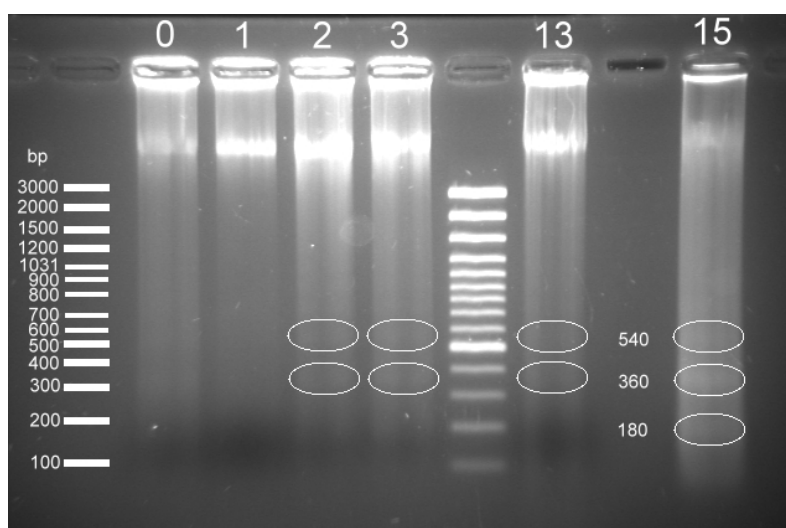


Fig. 3. Estimation of the size of the degraded DNA fragments by compared with DNA markers.

4. 2-D gel electrophoresis

By comparing the results of 2-D gel electrophoresis, it was found that some proteins with low pI values decreased or disappeared post harvest, while proteins with increased levels were detected in the high pI area. The changes in these proteins may result in the aging of the bamboo shoots.

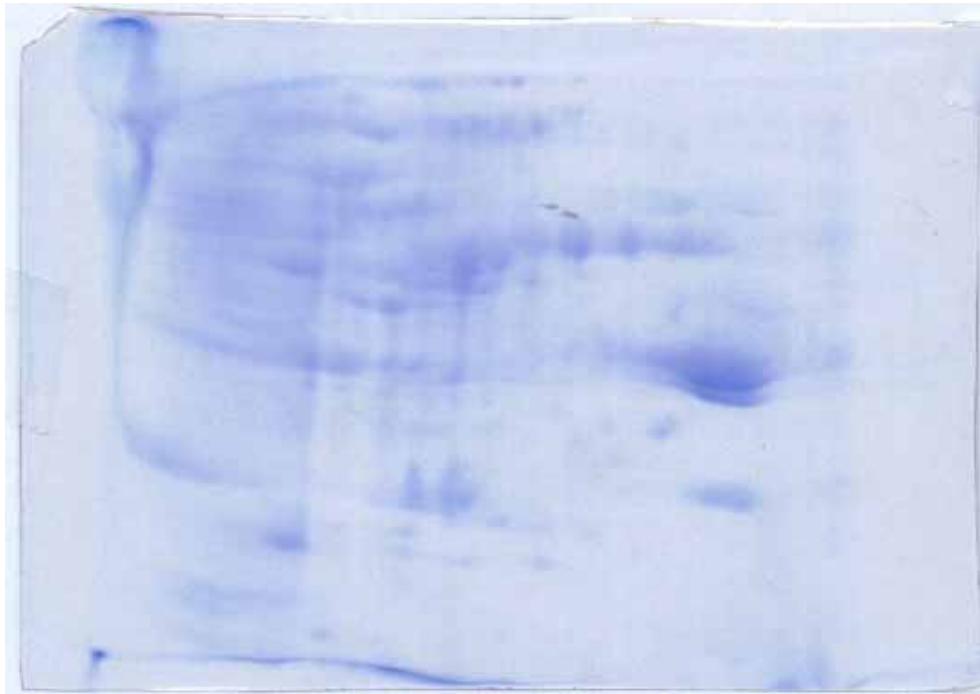


Fig. 4. The 2-D gel electrophoretic pattern of teartment 0 (control).

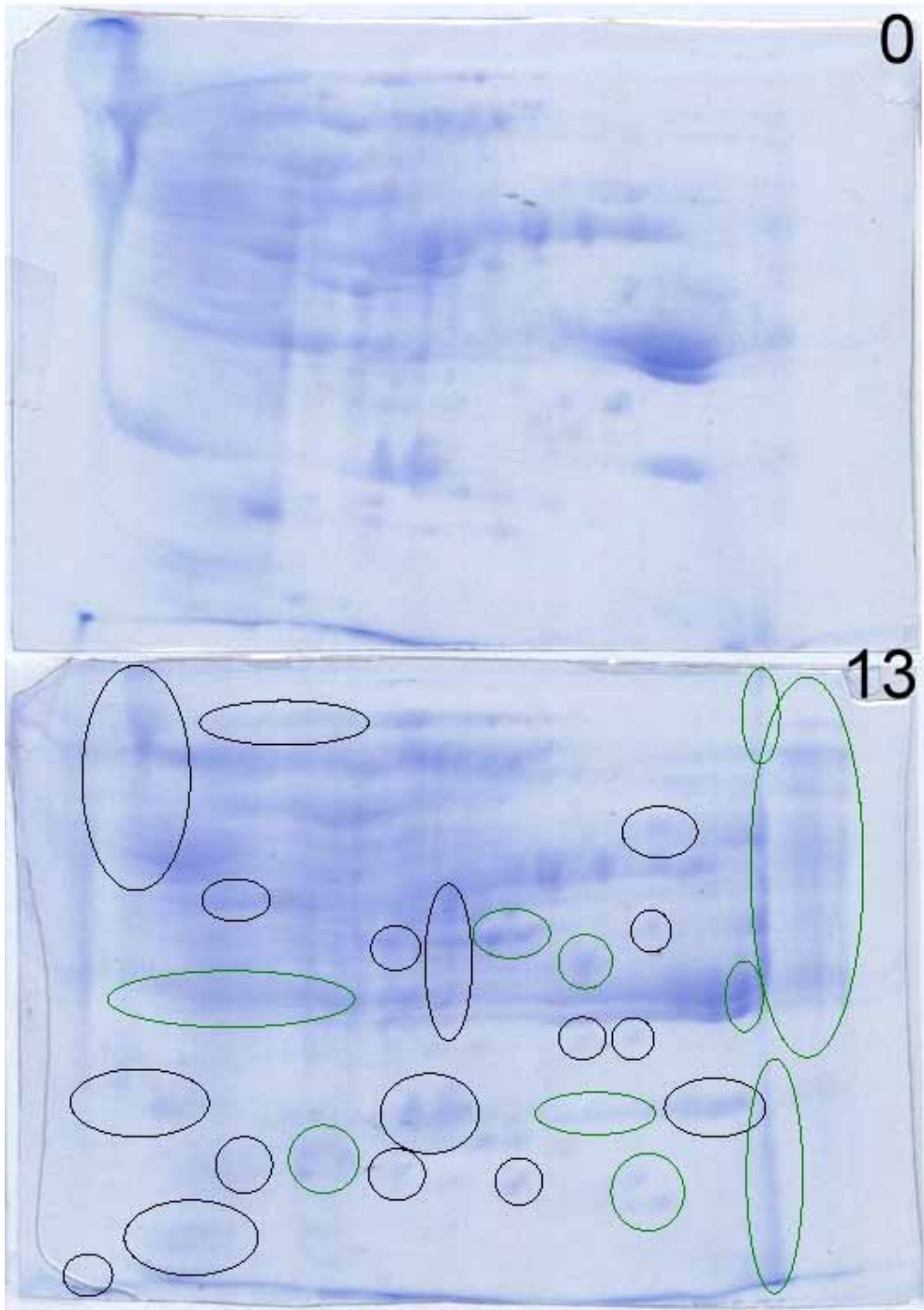


Fig. 5. Comparison of the 2-D gel electrophoretic patterns of treatment 0 and 13.

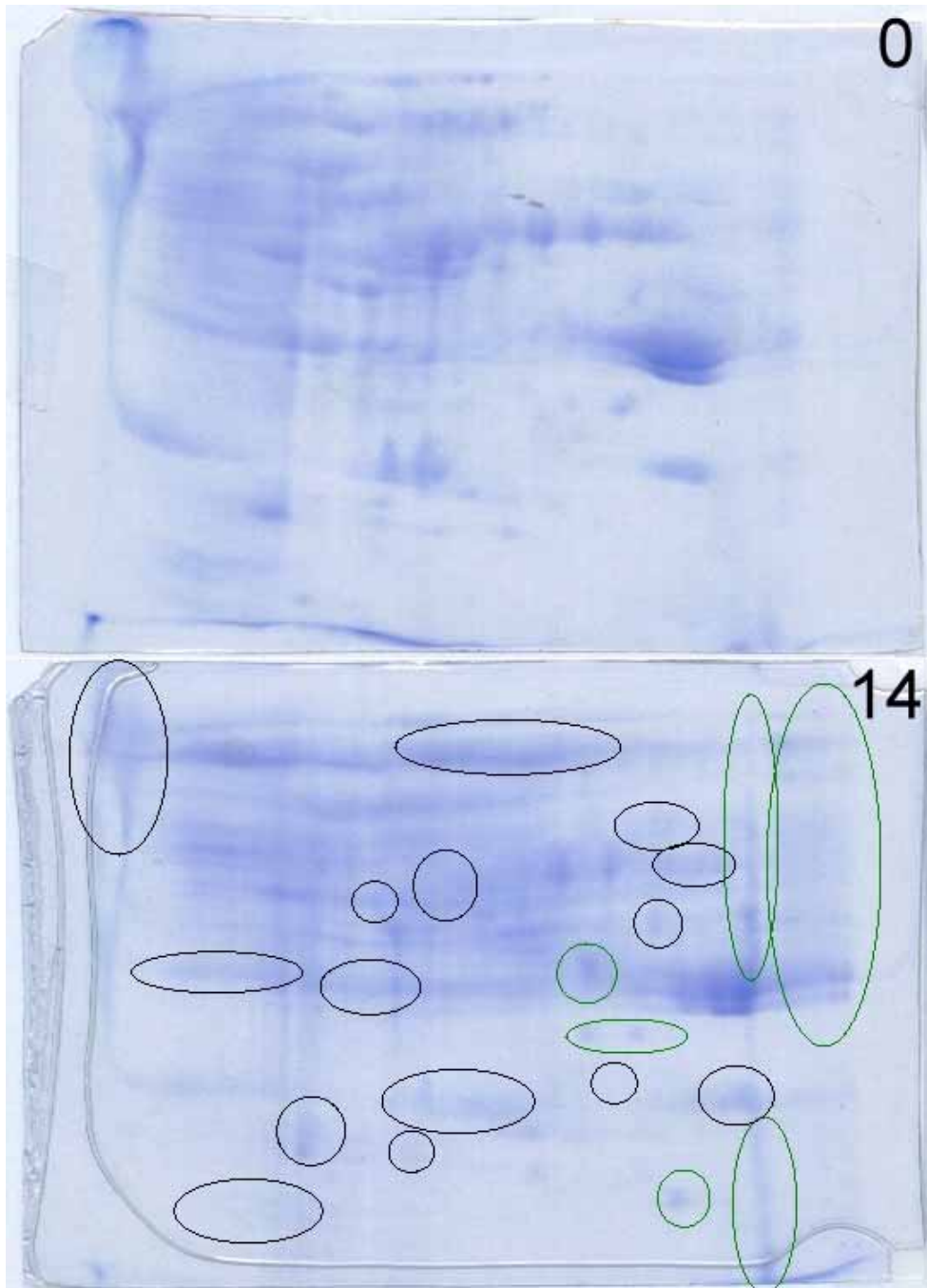


Fig. 6. Comparison of the 2-D gel electrophoretic patterns of treatment 0 and 14.

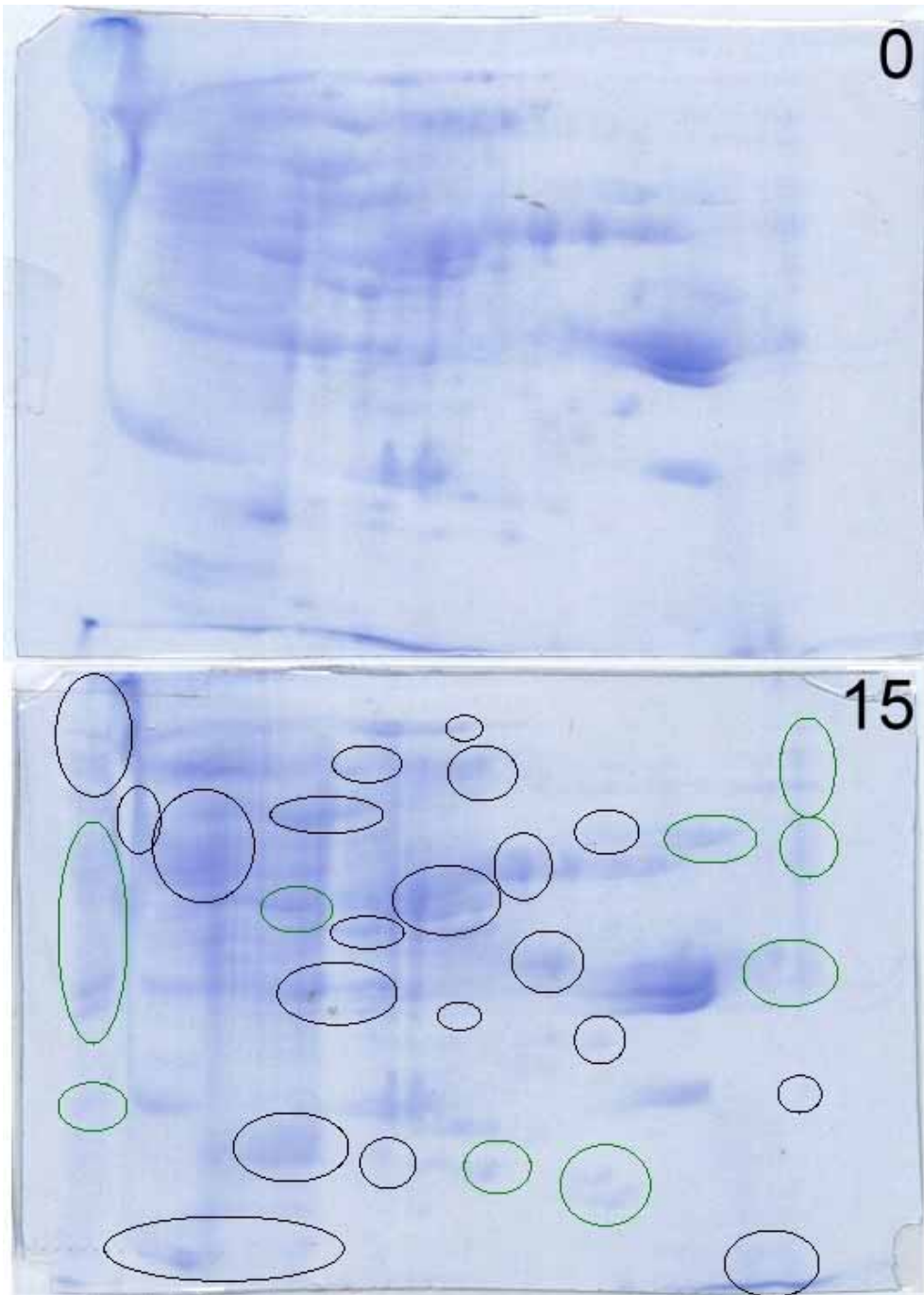


Fig.7. Comparison of the 2-D gel electrophoretic patterns of treatment 0 and 15.

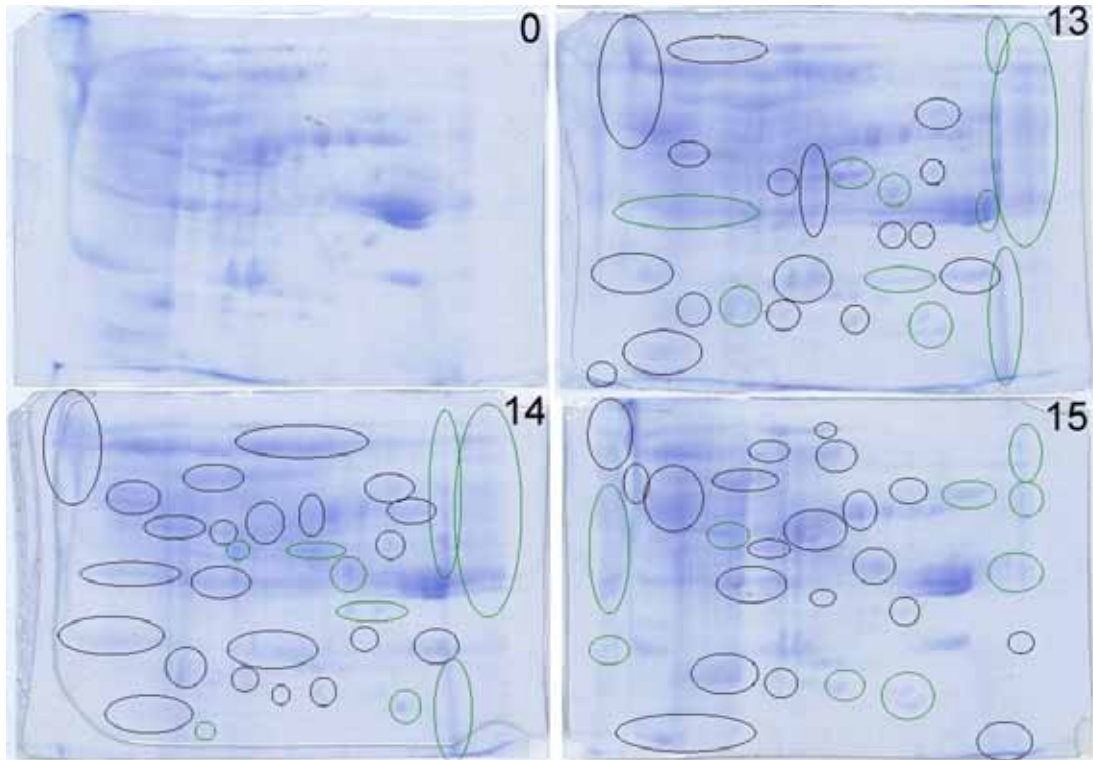


Fig. 8. Comparison of the 2-D gel electrophoretic patterns of treatment 0, 13, 14 and 15.

Conclusion

The cutting surfaces of bamboo shoots that soaked in 0.2 M sucrose (treatment 15) were whiter, and the sheaths of the shoots were greener than the other treatment. Although treatment 14 and treatment 15 could retard the aging of bamboo shoots, the results of hardness determination showed that neither treatment can stop the hardening of bamboo shoots.

The DNA from shoots of treatments 13 and 14 was partially degraded. The fragments appear as a ladder of DNA with sizes in multiples of approximately 180 bp. The presence of the oligonucleosome-size DNA fragments suggest that the cells may undergo programmed cell death (PCD). The degradation of DNA was not observed in treatment 15.

Some proteins with low pI values decreased or disappeared post harvest while proteins with increased levels were detected in the high pI area. The changes in these proteins may result in the aging of the bamboo shoots.

References

1. <http://www.americanbamboo.org/GeneralInfo.html>.
2. Ing-Jueng Liu, enzymes *Engineering*, 2th edition, Central Publisher Co., Taipei, 1994, ISBN 957-637-229-1.
3. Mahlon Hoagland , Bert Dodson, *The Way Life Works*, Commonwealth Publishing Co., Ltd. Taiwan Taipei, 2002, ISBN 986-417-000-7.
4. Jieng-Ae Lin, Mei-Huei Yang, Tie-Chang Liao, Jieng-Ho Hsia, *Chemistry Dictionary*, 2th edition, Gau-Li Publisher Co., Taipei, 2000, ISBN 957-584-088-7.
5. Tsan-Ru Chang, Studies on the Postharvest Physiology and Controlled Atmosphere Storage of Bamboo shoot (*Bambusa oldhami* Munro), Dissertation of national Taiwan university, 1993.
6. Zhong-Ien Liu, Zhie-Ching Lue, *Buzhidao De Shijie*, I-Van Publisher Co., Taipei, 2000, ISBN 957-694-416-3.
7. <http://ccms.ntu.edu.tw/~juang/ECX/Pur2.htm>
8. <http://www.hmb.com.tw/>

附件

圖十~二十三



Photo1. There's a bamboo shoot at the left side of the green bamboo.



Photo2. Comparing with Photo 1, the bamboo shoot have grew for 2 m just in 18 days!



Photo3. The photo is a section of fresh bamboo shoot.



Photo4. The bamboo shoot that became aging.



Photo5. Cut off the section in the water before soaking, that the bundle will be stuff if the bamboo is cut in air.



Photo6. Change the soaking liquid every 3 hours.



Photo7. The shoots were soaked in the soaking liquid.

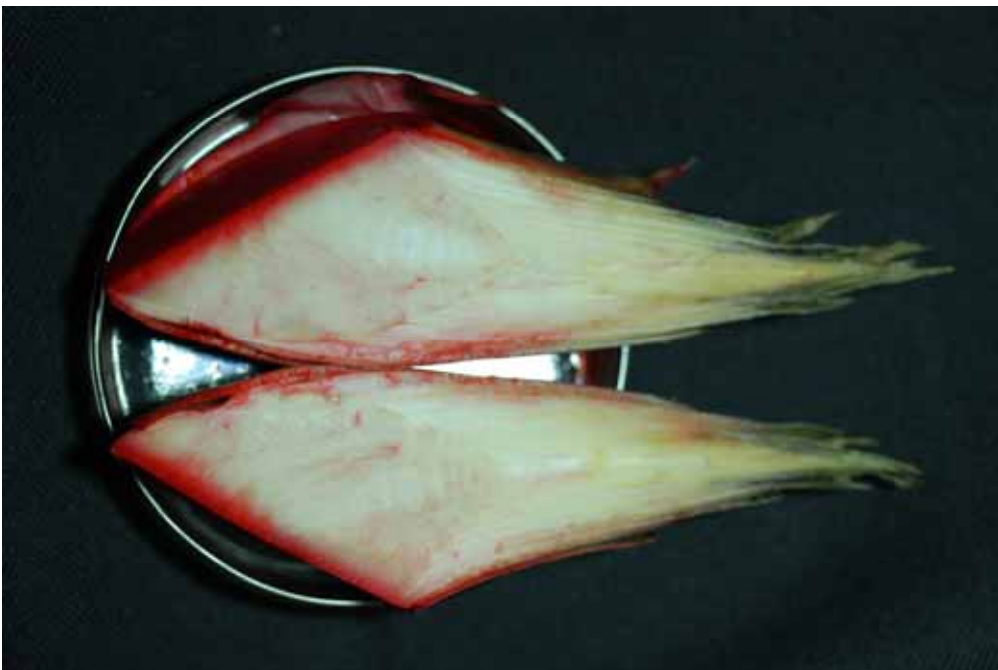


Photo8. The bamboo shoot soaked in the red ink. That the ink just permeate the base part of it.



Photo9. The bamboo shoots during the experiment.



Photo10. The control (treatment 0)



Photo11. The close-shot of bamboo shoot cutting surfaces .



Photo12. From left to right, Treatment 13, 14 and 15. The section of treatment 13 had become dry and wrinkled.



Photo13. The treatment 15's close-shot.



Photo14. The treatment 13's close-shot.



Photo15. Tools of the “Determination of the hardness” and samples.

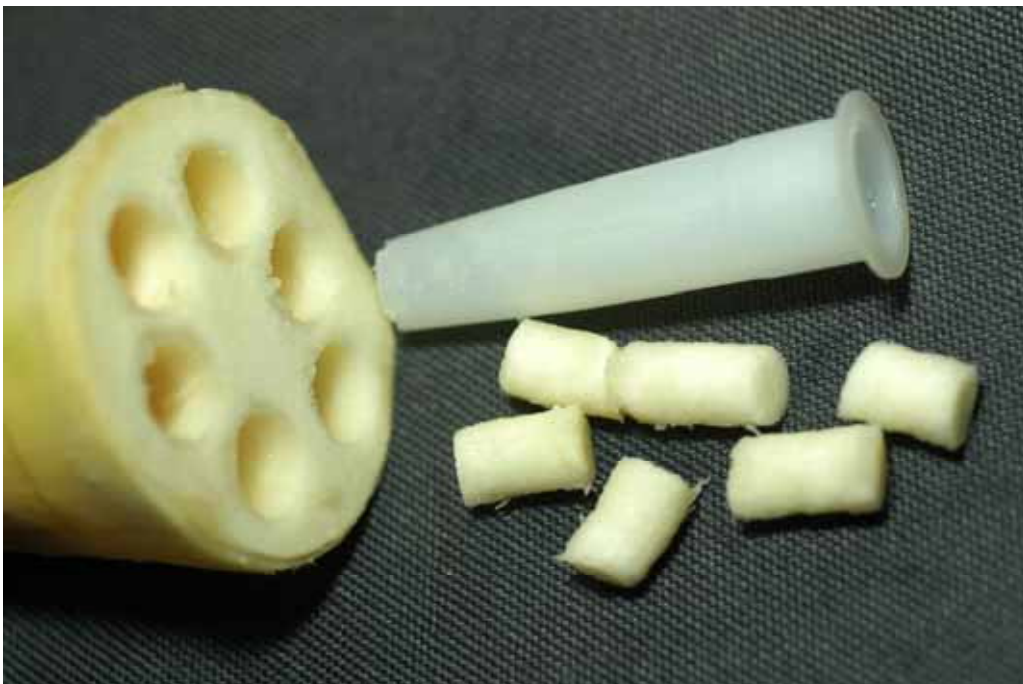


Photo16. The plastic awl and bamboo sticks.



Photo17. The metal awl will let bamboo shoot cleave.



Photo18. The bamboo shoot stick that been cut down by the plastic awl.



Photo19. Cut the stick on the electro-scale to measure the cutting strength.