

# 小麦储藏过程中温度对劣变起始位点及生理酶活性的影响

## Effect of temperature on deterioration site and Physiological enzymes activity during wheat storing

刘伟龙 李翠香 王玉利 胡元森

LIU Wei-long LI Cui-xiang WANG Yu-li HU Yuan-sen

(河南工业大学, 河南 郑州 450001)

(Henan University of Technology, Zhengzhou, Henan 450001, China)

**摘要:** 对小麦在储藏过程中发生生理劣变的起始位点及与呼吸作用相关酶活性变化进行研究。通过设定不同储藏温度对小麦进行正常储藏和人工陈化, 研究小麦储藏变质过程中生理酶活动状态。同时, 显微观察小麦胚结构变化, 确定劣变起始位点。结果表明, 小麦的生理劣变最早发生于胚部组织的根冠部位, 继而向胚根发展, 最后到胚芽。在不同储藏温度下, 小麦在劣变过程中其过氧化氢酶活性逐渐降低, 最后维持在一个较低的水平, 脱氢酶和淀粉酶在储藏初期活性升高, 随后则逐渐降低。在几个设定的储藏温度中, 温度越高, 生理酶活性变化越剧烈。

**关键词:** 小麦储藏; 酶活性; 染色切片; 生理劣变

**Abstract:** The changes were discussed in wheat storage in the initial deterioration site and physiological enzymes activity. The variation of enzymes activity was detected in natural aging and artificial aging wheat by setting three temperature of 30 °C, 40 °C and 50 °C. And the embryo tissue was also observed by microscope to ensure the deterioration region of wheat. The results showed that the physiological deterioration began with the cap of radical, and then extend to the radical, at last reached the plumule. In the process of deterioration at different temperatures, the catalase activity gradually decreased and remains at a very low level in the end. However, the activity of dehydrogenase and amylase increased gradually at the beginning and then dropped down little. In several of storage temperature, the higher the temperature is, the more intense changes of enzyme activity.

**Keywords:** wheat storage; enzyme activity; staining and section; physiological deterioration

小麦在储藏过程中会出现组织结构松弛、呼吸减弱、发芽率降低、粉质变差等物理、化学及生物学劣变现象<sup>[1-4]</sup>。小麦的规模仓储, 特别是种子粮的仓储保鲜工作一直以来都是国内外学者关注的热点问题。研究<sup>[5]</sup>表明, 种子在储藏过程中, 水分含量的多少直接影响了其能量代谢和活性氧化物的积累。S. P. C. Groot 等<sup>[6]</sup>研究发现, 在高氧分压存在的情况下, 即便在低温干燥的环境中储藏种子, 其陈化速度依然加快。在小麦陈化过程中, 其膜系统的通透性会增大, 细胞内溶物大量外渗, 淋出液电导率升高, 最终导致小麦种子活力降低<sup>[7,8]</sup>。当外界环境条件适宜时, 小麦以其自身物质(如蛋白质, 淀粉等)的消耗和转化为基础, 形成引发小麦品质劣变的有毒物质得到积累<sup>[9]</sup>。这些物质对小麦细胞造成极大的毒害作用, 导致细胞膜破裂、蛋白降解、酶活性丧失等生理性变质<sup>[10,11]</sup>。小麦酶活性降低, 呼吸作用下降, 生命活力减弱等, 均是其生理活动的结果, 小麦在储藏过程中其生理活动才是引发其生理性劣变的本质因素<sup>[12,13]</sup>。近 10 年来, 对小麦劣变的研究大都从营养物质转化角度出发, 但小麦劣变过程中生理酶活性如何变动, 小麦劣变的起始位点在哪儿还未明确, 国内外相关课题的研究相对较少。本研究拟从小麦在储藏过程中基本的生理活动出发, 研究小麦生理酶活性变化和劣变的起始位点, 了解小麦储藏的生理变质, 为实现小麦的长期储藏提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

小麦品种: 本实验用强筋小麦品种为郑麦 366 和矮抗 58, 中筋小麦品种为太空 6 号和花培 8 号。待测试小麦种子均购自河南郑州某种子公司;

**基金项目:** 国家自然科学基金项目资助(编号: 31371850); 河南省教育厅自然科学基金项目(编号: 13A210164)

**作者简介:** 刘伟龙(1988-), 男, 河南工业大学在读硕士研究生。

E-mail: liuweilong13@126.com

**通讯作者:** 胡元森

**收稿日期:** 2015-03-15

2,3,5-三苯基氯化四氮唑、3,5-二硝基水杨酸:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

过氧化氢:分析纯,洛阳市化学试剂厂。

1.1.2 主要仪器设备

分析天平:BS124S型,北京赛多利斯仪器系统有限公司;

紫外可见分光光度计:UV-1100型,上海美普达仪器有限公司;

冷冻切片机:CM1850型,美国莱卡仪器有限公司;

恒温培养箱:MJPS-150型,上海精宏试验设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 小麦储藏方法 分别取4个品种小麦各1500g,调整其水分至12%,分装在广口瓶中,每瓶500g。广口瓶用经8%氯化钠、10%甘油溶液浸泡过的12层纱布封口,纱布每7d更换一次,以保证瓶内储藏小麦正常呼吸和水分稳定。将小麦分别置于30,40,50℃恒温培养箱中储藏,每个处理3个重复。储藏期间,定期取样测定各生理酶的活性,并在储藏至6周时,取样对小麦胚进行染色切片观察。

1.2.2 酶活测定方法

(1) 过氧化氢酶:按GB/T 5522—2008执行;

(2) 脱氢酶:参照文献[14];

(3) 淀粉酶:按GB/T8275—2009执行。

1.2.3 冰冻切片制作方法 取3g小麦样品于250mL锥形瓶中,加入50mL蒸馏水,浸泡12h。将吸涨后的小麦籽料用手术刀片沿胚纵向切成两半,置于25mL具塞试管中,用0.3%的2,3,5-氯化三苯基四氮唑溶液(TTC)30℃下染色3h<sup>[15]</sup>,倒掉染色液,再将经染色处理后的样品用冷冻切片机制片,在显微镜下观察小麦胚的着色情况。

2 结果与分析

2.1 不同储藏温度下小麦过氧化氢酶活性变化

由图1~3可知,过氧化氢酶活性随储藏时间延长而逐渐降低,最后维持在一个较低的水平。初始储藏时,过氧化氢酶活性较高,随后其活性逐渐下降,尤其在高温陈化阶段,活性下降明显。从4个小麦品种看,在50℃储藏时,硬麦矮抗58的过氧化氢酶变化幅度最大,消耗2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液的量从开始时的2.05 mL下降到了0.30 mL(图3)。该酶在30℃和40℃储藏时结果与50℃变化趋势相似(图1~2),暗示矮抗58小麦品种过氧化氢酶活性对热的敏感性高,作为种子粮储藏应避免长时间暴露于高温中。而硬麦郑麦366在3个储藏温度下过氧化氢酶活性变化幅度最小,较有利于长期储藏。

高温条件下酶活性变化最快,说明储藏温度对小麦生理酶活性变化起重要作用。汪海峰等<sup>[16]</sup>的研究也发现了类似情形,储藏初期,由于温度、湿度的升高,小麦的呼吸增强,酶活性较大,可能会产生一些不稳定的中间产物,并易于分解

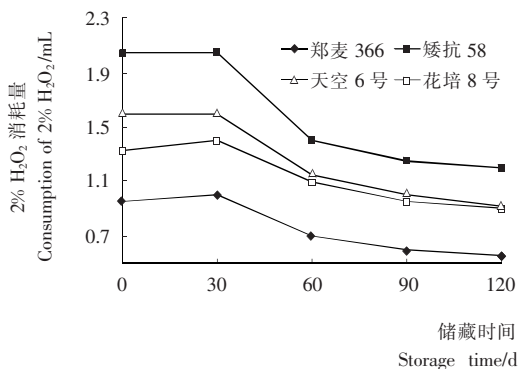


图1 小麦30℃储藏时过氧化氢酶活性变化

Figure 1 Catalase activity of storing wheat at 30℃

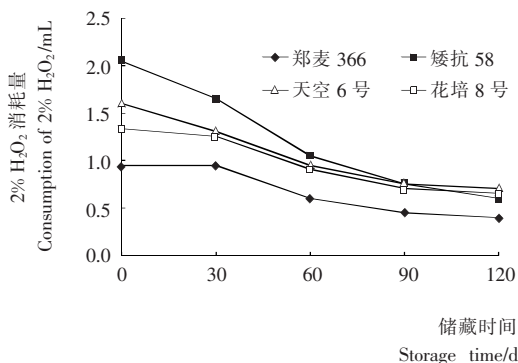


图2 小麦40℃储藏时过氧化氢酶活性变化

Figure 2 Catalase activity of storing wheat at 40℃

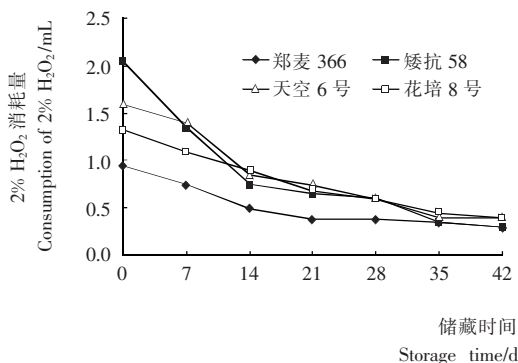


图3 小麦50℃储藏时过氧化氢酶活性变化

Figure 3 Catalase activity of storing wheat at 50℃

为醛酮类化合物,随着底物的不断消耗,过氧化氢酶的活性会逐渐降低。随着时间延长,醛酮类物质继续积累,剩余底物不断减少,酶活性变化的速度也逐渐降低,并最终维持在一个较低水平(图1~3)。

2.2 不同储藏温度下小麦脱氢酶活性变化

脱氢酶是细胞呼吸链的主干酶系,在生物体内催化有机物氧化脱氢,并将其传递给受氢体,其活性强弱直接反映细胞生理活性的强弱<sup>[17]</sup>。

由图4~6可知,小麦脱氢酶活性在储藏初期逐渐升高,达到最大值后又开始逐渐降低。储藏温度愈高,脱氢酶活性

达到高值的时间愈短,随后的下降速度也愈缓慢。这种情形可能与小麦的后熟生理有关。本试验选用新收获种用小麦,在储藏初期,基础生理活动强。本试验设置的 3 个储藏温度均较田间及室温储藏高,其呼吸速率、生理活动也趋于活跃,高温环境下的后熟时间缩短。当后熟作用完成时,小麦生理酶活性下降,高温对各种生理酶进一步抑制,小麦活力逐渐降低。

4 个小麦品种中,中筋小麦品种花培 8 号脱氢酶活性变化幅度相对较小,小麦活力下降较慢,而其他小麦品种在 3 个温度下酶活力下降都较快。在 50 °C 高温储藏 6 周,4 种小

麦脱氢酶活性都处在一个非常低的水平,对 4 种小麦进行发芽率测试,发芽率均在 5% 以下,这暗示高温储藏 6 周后小麦基本失去活力。这一结果与张林等<sup>[18]</sup>的研究一致,脱氢酶活性与小麦种子活力呈正相关,小麦陈化过程中脱氢酶活性降低,小麦也逐渐失去活力。

### 2.3 不同储藏温度下小麦淀粉酶活性变化

由图 7~9 可知,小麦淀粉酶活性在储藏开始有升高趋势,在 30 °C 及 40 °C 下储藏 60 d、在 50 °C 下储藏 14 d 后,其活性又逐渐降低。在 30 °C 和 40 °C 条件下,强筋小麦品种郑麦 366 和矮抗 58 较中筋品种淀粉酶活性变化幅度相对较小,暗示强筋小麦品种中的淀粉酶活性丧失相对较少,利于

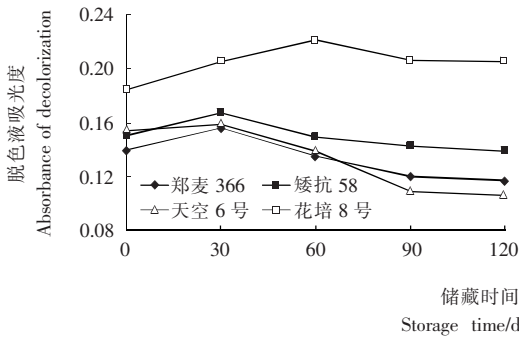


图 4 小麦 30 °C 储藏时脱氢酶活性变化

Figure 4 Dehydrogenase activity of storing wheat at 30 °C

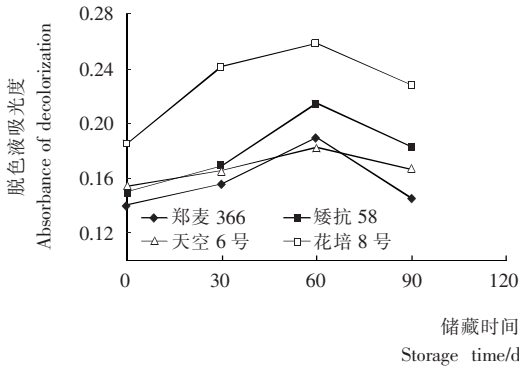


图 5 小麦 40 °C 储藏时脱氢酶活性变化

Figure 5 Dehydrogenase activity of storing wheat at 40 °C

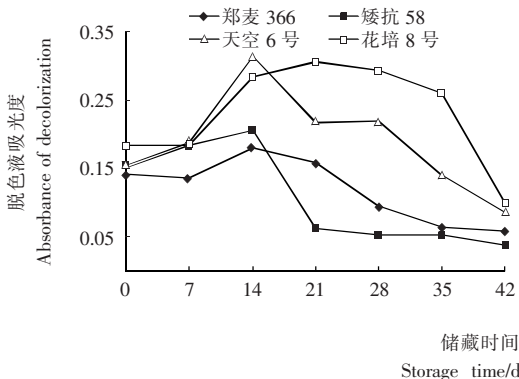


图 6 小麦 50 °C 储藏时脱氢酶活性变化

Figure 6 Dehydrogenase activity of storing wheat at 50 °C

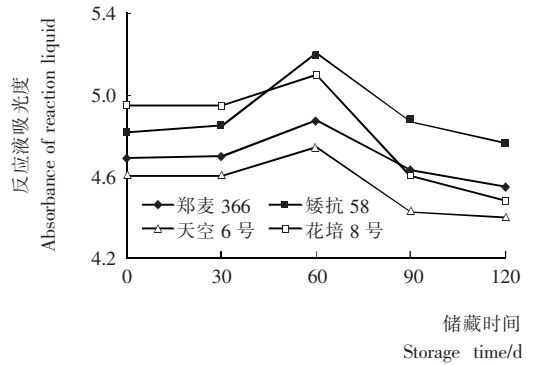


图 7 小麦 30 °C 储藏时淀粉酶活性变化

Figure 7 Amylase activity of storing wheat at 30 °C

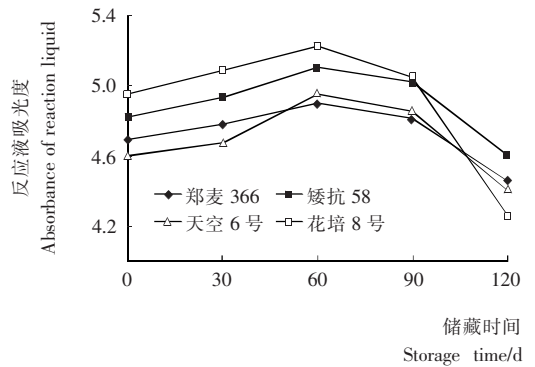


图 8 小麦 40 °C 储藏时淀粉酶活性变化

Figure 8 Amylase activity of storing wheat at 40 °C

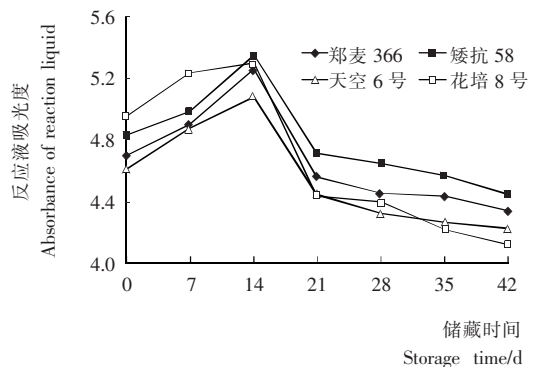


图 9 小麦 50 °C 储藏时淀粉酶活性变化

Figure 9 Amylase activity of storing wheat at 50 °C

小麦加工品质维持。但在 50 ℃ 高温下,4 个小麦品种淀粉酶活力都大幅度下降,这可能是小麦完成后熟生理后,各种酶对高温的耐受性都减弱所致。

### 2.4 小麦储藏过程中劣变起始位点的确定

TTC-脱氢酶还原法是一种运用在植物种子生理活性鉴定上的常用方法<sup>[19]</sup>,基本原理是种子吸水后胚组织细胞内脱氢酶活性增强,催化无色的 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)还原成红色的 2,3,5-三苯基甲臍(TF),TF 稳定且不易扩散,使胚部显红色。而无生理活力的植物种子,脱氢酶不能催化 TTC 发生反应,胚部显现灰白色。种子胚部染色深浅反映了胚活力的强弱。

本试验利用切片观察法研究了矮抗 58 小麦在 30,40,50 ℃ 条件下储藏 6 周时的胚部生理活性变化。图 10 显示,小麦在 30 ℃ 下储藏 6 周后,除根冠部位外,其胚轴及胚根显浅红色(图 10(a)),而在 40 ℃ 下,根冠和胚根部位均不能被染成红色(图 10(b)),当储藏温度升高至 50 ℃ 时,储藏 6 周的小麦胚部均不能被染色,整体呈灰白色(图 10(c))。这一情形表明小麦在陈化过程中其生理劣变从根冠部位开始,继而延伸至胚轴,并沿着胚部向胚根发展。

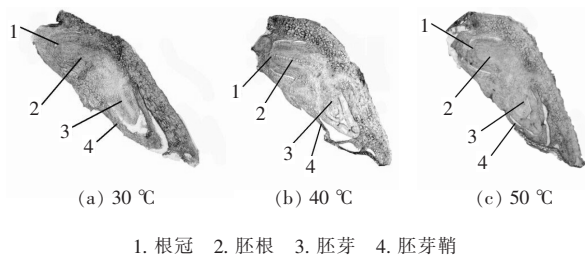


图 10 小麦在不同储藏温度下胚部活性染色的切片观察

Figure 10 Staining of Living schematic tissue of wheat at 30 ℃, 40 ℃ and 50 ℃

### 3 结论

小麦储藏生理劣变从胚部根冠部位开始,继而沿胚轴向胚芽方向逐渐失去活性。小麦在各储藏温度下,其过氧化氢酶活性逐渐降低,温度越高,酶活性下降越快。脱氢酶和淀粉酶活性在储藏初期呈上升趋势,随后逐渐降低,尤其是在 50 ℃ 下储藏 14 d 后,两种酶活性下降最为明显,但淀粉酶活性最后维持在较高水平。

#### 参考文献

- 1 程云辉,王璋. 麦胚蛋白的研究进展[J]. 食品与机械,2006(2): 105.
- 2 Belaifa F R, Lessard F F, Bouznad Z. A systemic approach to qualitative changes in the stored-wheat ecosystem: prediction of deterioration risks in unsafe storage conditions in relation to relative humidity level, infestation by *Sitophilus oryzae* (L.), and wheat variety[J]. Journal of Stored Products Research, 2011, 47(1): 48~61.
- 3 Rajaramanna R, Jayas D S, White N D G. Comparison of dete-

- rioration of rye under two different storage regimes[J]. Journal of Stored Products Research, 2010, 46(2): 87~92.
- 4 李改婵,贺喜祥,高峰. 浅析玉米储藏品质变化趋势与控制[J]. 粮食储藏,2010(5): 39~41.
- 5 Serge Kibinza, Dominique Vinel, Daniel Come. Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging[J]. Physiologia Plantarum, 2006, 128(3): 496~506.
- 6 S P C Groot, A A Surki, R C H de Vos. Seed storage at elevated partial pressure of oxygen, a fast method for analyzing seed ageing under dry conditions[J]. Annals of Botany, 2012, 110(6): 1 149~1 159.
- 7 Qin Peng, Kong Zhi-you, Liao Xiao-hong. Effects of accelerated aging on physiological and biochemical characteristics of waxy and non-waxy wheat seeds[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2011, 18(2): 7~12.
- 8 McDonald M B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment[J]. Seed Science and Technology, 1999, 27(1): 177~237.
- 9 Walters C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging[J]. Seed Science Research 1998,8(2): 223~244.
- 10 Spanò C, Bottega S, Lorenzi R, et al. Ageing in embryos from wheat grains stored at different temperatures: oxidative stress and antioxidant response[J]. Functional Plant Biology, 2011, 38(7): 624~631.
- 11 McDonald M B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment[J]. Seed Science and Technology, 1999, 27(1): 177~237.
- 12 Belaifa F R, Lessard F F, Bouznad Z. A systemic approach to qualitative changes in the stored-wheat ecosystem: prediction of deterioration risks in unsafe storage conditions in relation to relative humidity level, infestation by *Sitophilus oryzae* (L.), and wheat variety[J]. Journal of Stored Products Research, 2011, 47(1): 48~61.
- 13 Rajaramanna R, Jayas D S, White N D G. Comparison of deterioration of rye under two different storage regimes[J]. Journal of Stored Products Research, 2010, 46(2): 87~92.
- 14 陶梅,辛萍萍. 用种胚浸提法测定种子脱氢酶活性的探讨[J]. 种子科技,1993(5):28.
- 15 Noll L W, Butler D N, Little C R. Tetrazolium violet staining of naturally and artificially moulded sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) caryopses [J]. Seed Science and Technology, 2010, 38(3): 741~756.
- 16 汪海峰,许德存. 高温高湿储藏条件下小麦若干品质性状变化规律的研究[J]. 粮食储藏,2006(5): 36~42.
- 17 梁文艳,王珂,阮清鹭,等. TTC-脱氢酶还原法测定铜绿微囊藻活性[J]. 环境科学学报,2008,28(9): 1 745~1 750.
- 18 张林,张文明,姚大年. 小麦烘干种子活力以及其与脱氢酶活性的相关性研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(5):1 858~1 860.
- 19 Noll L W, Butler D N, Little C R. Tetrazolium violet staining of naturally and artificially moulded sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) caryopses [J]. Seed Science and Technology, 2010, 38(3): 741~756.