

# 杨梅霉变及其多酚氧化酶特性与动力学研究

肖卓炳<sup>1</sup>, 陈 上<sup>2</sup>, 麻明友<sup>1</sup>, 杨朝霞<sup>2</sup>, 吴显明<sup>2</sup>, 何则强<sup>2</sup>

(1. 吉首大学 湖南省林产化工工程重点实验室, 湖南 张家界 427000; 2. 吉首大学化学化工学院, 湖南 吉首 416000)

**摘 要:** 测定不同贮藏时间的杨梅中的多酚物含量, 并观察对应的软化霉变程度, 对杨梅中的多酚氧化酶进行提取, 研究其对各种底物的催化特性和适宜的酶催化反应条件, 并测定催化反应的动力学参数。研究表明, 常温下贮藏, 杨梅霉变速率与果实中多酚化合物含量的变化相一致, 霉变时多酚物含量因氧化显著减少。对其多酚氧化酶研究发现: 其最佳底物是 4-甲基儿茶酚, 其催化的反应可用单底物反应模型来描述, 用氧电极测出酶催化反应的最佳条件是 pH 值为 7.1, 温度为 60℃, 米氏常数为  $2.18 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ,  $r_{\max}=2.275 \text{ mg/L} \cdot \text{min}$ 。

**关键词:** 杨梅; 霉变; 多酚氧化酶; 反应动力学

## Characterization of Polyphenol Oxidase in *Myrica rubra* Fruits

XIAO Zhuo-bing<sup>1</sup>, CHEN Shang<sup>2</sup>, MA Ming-you<sup>1</sup>, YANG Zhao-xia<sup>2</sup>, WU Xian-ming<sup>2</sup>, HE Ze-qiang<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory for Forest Products and Chemical Industry Engineering, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Jishou University, Jishou 416000, China)

**Abstract:** The decrease of polyphenol content, in which polyphenol oxidase played an important role, were believed to related to the mildewing degree of *Myrica rubra*. In this paper, polyphenol oxidases in *Myrica rubra* were extracted and characterized. Results showed that the optimum substrate for polyphenol oxidase in *Myrica rubra* was 4-methylcatechol with the optimum pH 7.1 and optimum temperature 60℃, and Michaelis constant was  $2.18 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  with the max reaction rate ( $r_{\max}$ ) 2.275 mg/L · min. The reaction mechanism can be described with monosubstrate reaction model.

**Key words:** *Myrica rubra*; mildewing; polyphenol oxidase; kinetics

中图分类号: TS224.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)23-0306-03

杨梅(*Myrica rubra* Sieb.et Zucc)为杨梅科杨梅属亚热带常绿果树, 原产我国东南部, 以浙江、江苏、福建等省为主要产区。我国栽培杨梅的历史悠久, 在 2000 多年前的汉代, 我国就开始栽种杨梅, 到宋代已有大面积种植, 而其野生种生长史则可追溯到 7000 年以前<sup>[1]</sup>。

杨梅果实素有“初疑一颗值千金”之美誉, 又有“杨梅赛荔枝”之说。杨梅果实呈球形, 直径约 2~3cm, 果肉由许多充满汁液的囊状体组成, 从果心呈放射状排列<sup>[2]</sup>。杨梅果鲜汁旺、风味独特、营养丰富。中医认为, 杨梅性温味甘酸, 具有生津止渴、和胃调食、行气止痛的功效。

但是, 由于杨梅果实成熟期相对集中在 6 月中下旬, 上市期前后只有 15d 左右的时间, 杨梅果实采收后生理代谢旺盛, 极易衰老和腐烂变质。新鲜杨梅采摘后, 室温放置 5d 左右就霉烂。文献认为, 果品的霉变与果品中酶的存在有关系, 特别是其中的多酚氧化酶和过氧

化酶能提高细胞质膜的透性, 促进二氧化碳进入细胞, 加快氧化过程与鞣质和有机物的消失, 致使果实不耐贮藏<sup>[3]</sup>。笔者就杨梅贮藏过程中多酚物含量的变化与果实霉变的关系及其多酚氧化酶的特性与动力学问题进行研究, 为延缓杨梅的霉变提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

杨梅产于湖南怀化市鹤城区凤坪茄子冲(大小均匀, 成熟度一致); 儿茶素、绿原酸、3,4-二羟基苯丙氨酸、酪氨酸、4-甲基儿茶酚、儿茶酚、硫酸铵、磷酸二氢钾、磷酸氢钠等均为国产分析纯试剂。

### 1.2 仪器与设备

04242-SE 型高速组织捣碎机 美国 Cole-Parmer;  
TGL-16M 型高速冷冻离心机 长沙湘仪仪器有限公司;  
CY-9 型测氧仪 浙江省建德市通达电子控制设备厂;

收稿日期: 2009-04-11

基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目(08C670; 06C654); 湖南省自然科学基金项目(06JJ50161)

作者简介: 肖卓炳(1961—), 男, 教授, 硕士, 主要从事食品和材料科学研究。E-mail: xiaoyddd@163.com

JA2003 型电子天平 上海沪铄电子科技有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 贮藏过程中多酚物含量变化的测定

采果后于室温下放置, 分别于 0、1、2、3、4、5、6、7d 取果实用  $\text{KMnO}_4$  滴定法<sup>[4]</sup>测定多酚物含量, 同时测定失重率校正测定结果, 并记录果实外观变化情况。

#### 1.3.2 酶的提取<sup>[5]</sup>

取杨梅 100g, 洗净去核切碎, 加 50ml 冰水, 放入高速组织捣碎机中打成浆液, 低温(4℃)下离心分离去渣, 将上层清液与 30ml 饱和硫酸铵溶液(25℃)混合, 离心分离去清液, 再向沉淀中加入 10ml 饱和硫酸铵溶液, 离心分离去清液, 将沉淀溶于 100ml 冰水中, 用渗透法去盐, 即得酶溶液。

#### 1.3.3 酶催化底物的选择

分别取 10ml 浓度为 0.1mol/L 的儿茶素、绿原酸、3,4-二羟基苯丙氨酸、酪氨酸、4-甲基儿茶酚和儿茶酚, 加入 15ml 磷酸盐缓冲溶液(pH 值为 7.0), 在 25℃ 条件下恒温 10min, 再加 5.0ml 酶溶液, 用 CY-9 型测氧仪每 30s 测 1 次氧浓度, 以氧浓度 $[\text{O}_2]$ 对时间  $t$  作图, 从各底物曲线可选出最佳底物, 以最佳底物来研究该酶的最适反应条件及动力学规律<sup>[6]</sup>, 并以耗氧速率表示反应速率。

#### 1.3.4 酶催化反应最适条件及动力学参数

测定不同温度、pH 值条件下, 杨梅多酚氧化酶催化其最佳底物氧化反应的初速率  $r_0$ , 求出该酶催化反应的最适温度和最适 pH 值, 测定最佳底物不同浓度(mol/L)下, 于最适反应条件时的耗氧初速率(mg/L·min), 用图法求出最大反应速率( $r_{\max}$ )和米氏常数  $K_m$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 多酚化合物含量与杨梅霉变的关系

表 1 贮藏时间、多酚物含量及软化霉变情况  
Table 1 Different degree of mildewing and corresponding polyphenol content in *Myrica rubra* during storage

项目	贮藏时间(d)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
多酚含量(%)	1.93	1.95	1.91	1.82	1.67	1.50	1.36	1.21
果实外观	硬、鲜艳	较硬、鲜艳	微软、较鲜艳	较软、较鲜艳	软、少量酶点	酶点加深	开始腐烂	腐烂变质

从表 1 可以看出, 当果实软化并霉变时, 多酚含量显著减少, 而果实的霉变与多酚物被氧化有关。

### 2.2 杨梅多酚氧化酶的最佳底物

由图 1 可知, 杨梅多酚氧化酶的最佳底物是 4-甲基儿茶酚。本实验以 4-甲基儿茶酚为底物, 研究杨梅多

酚氧化酶的一些性质及动力学规律。

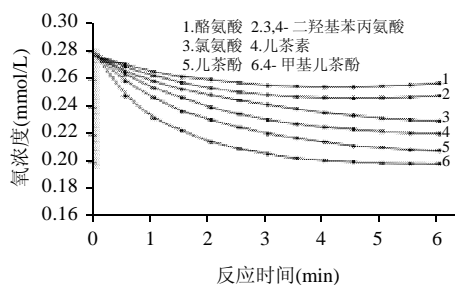


图 1 不同底物的氧浓度与时间的关系

Fig.1 Relationship between concentration of oxygen and time for various substrates

### 2.3 催化反应最佳条件

本实验测定了不同温度、不同 pH 值时, 多酚氧化酶催化 4-甲基儿茶酚氧化反应的初速率, 结果如图 2、3 所示。

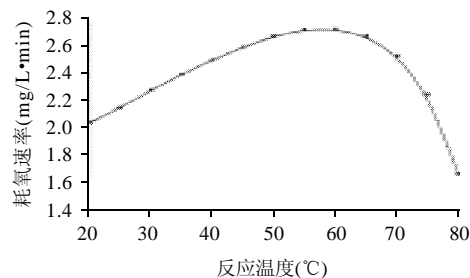


图 2 温度对酶催化反应速率的影响

Fig.2 Effect of temperature on catalytic reaction rate of polyphenol oxidase

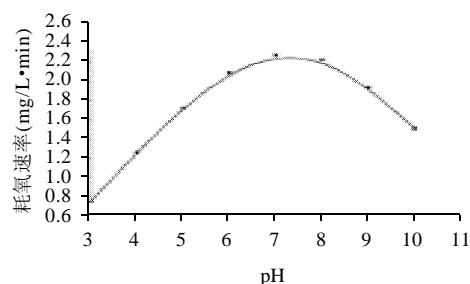


图 3 pH 值对酶催化反应速率的影响

Fig.3 Effect of pH value on catalytic reaction rate of polyphenol oxidase

由图 2、3 可知该催化反应的最佳温度为 60℃, 最佳 pH 值为 7.1。

### 2.4 杨梅多酚氧化酶的动力学研究

#### 2.4.1 底物浓度对初始速率的影响

本实验分别测定了 4-甲基儿茶酚和氧浓度对反应速率的影响, 结果如图 4、5 所示。

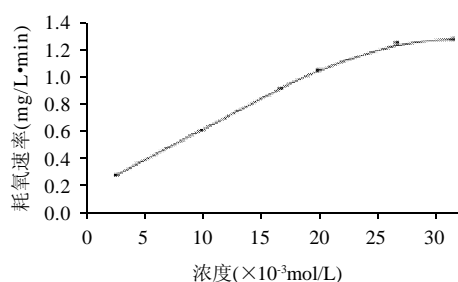


图4 初速率与4-甲基儿茶酚浓度关系曲线

Fig.4 Plot of initial rate versus the concentration of 4-methylcatechol

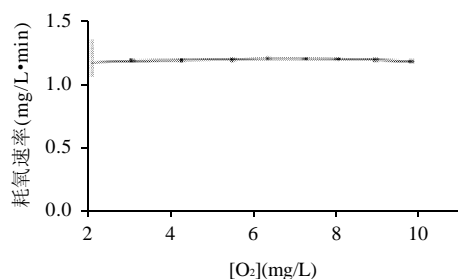


图5 初速率与初氧浓度的关系曲线

Fig.5 Plot of initial rate versus initial concentration of oxygen

在图4中当4-甲基儿茶酚的浓度超过  $3.33 \times 10^{-2} \text{mol/L}$  时,反应初速率变化不大;图5中当氧浓度超过  $8.5 \text{mg/L}$  时,反应初速率反而下降。由图4可以看出,4-甲基儿茶酚浓度对反应初速率影响很大;而图5表明氧浓度  $[\text{O}_2]$  对该反应的影响很小,说明杨梅多酚氧化酶的催化反应可用单底物反应模型来描述。

#### 2.4.2 反应米氏常数( $K_m$ )及最大反应速率( $r_{\max}$ )

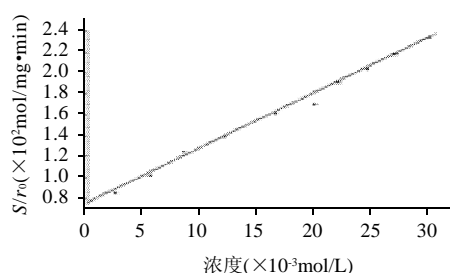
杨梅多酚氧化酶催化反应可用米氏方程来描述反应初速率( $r_0$ )与底物浓度( $S$ )的关系:

$$r_0 = \frac{r_{\max} S}{K_m + S}$$

式中:  $r_{\max}$  是最大反应速率,将上式两边同除以  $S$  得

$$\frac{S}{r_0} = \frac{K_m}{r_{\max}} + \frac{1}{r_{\max}} S$$

以  $S/r_0$  对  $S$  作图得一直线,如图6所示。

图6  $S/r_0$  对  $S$  的关系图Fig.6 Plot of  $S/r_0$  versus  $S$ 

由图6中直线斜率及纵轴的截距可求出  $K_m = 2.18 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ ,  $r_{\max} = 2.275 \text{mg/L} \cdot \text{min}$ 。  $K_m$  是一个重要特征常数。 $K_m$  越小说明底物与酶结合的亲和力越强。

### 3 结论

本实验对杨梅的软化霉变程度和多酚氧化酶的存在进行的研究表明,常温下贮藏,杨梅霉变腐烂速率与果实中多酚化合物含量的变化相一致,霉变腐烂时多酚含量因氧化显著减少,对其多酚氧化酶研究发现:其最佳底物是4-甲基儿茶酚;其催化的反应可用单底物反应模型来描述;用氧电极测出酶催化反应的最佳条件是 pH 值为 7.1,温度为  $60^\circ\text{C}$ ;米氏常数为  $2.18 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ ,  $r_{\max} = 2.275 \text{mg/L} \cdot \text{min}$ 。

#### 参考文献:

- [1] 陈宗良. 杨梅史考[J]. 果树科学, 1996(13): 59-61.
- [2] LI Z L, ZHANG S L, CHEN D M. Red bayberry (*Myrica rubra* Sieb. & Zucc.): a valuable evergreen tree fruit for tropical and subtropical areas [J]. Acta Hort, 1992, 321: 112-121.
- [3] 夏红, 曹卫华, 周翠英, 等. 果品保鲜技术的发展与应用[J]. 农产品加工, 2004(4): 16-17.
- [4] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 504-506.
- [5] JIANG Y M, ZAUBERMAN G, FUCHS Y. Partial purification and some properties of polyphenol oxidase extracted from litchi fruit pericarp [J]. Postharvest Biol Technol, 1997, 10(3): 221-228.
- [6] 霍瑞贞. 蕉皮酚酶催化反应动力学及机理研究[J]. 华南理工大学学报, 1994(2): 19-24.