

大蕉后熟期的褐变相关性及褐变底物鉴定

白永亮, 余 铭, 袁根良, 杜 冰, 鲁旺旺, 黄守耀, 杨公明*

(华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642)

摘 要: 以粉蕉和香牙蕉为对照, 观察大蕉后熟过程中褐变度、多酚氧化酶和过氧化物酶的变化规律, 同时考察大蕉总酚和游离酚含量分别在大蕉褐变过程中起的作用。结果表明: 三种香蕉在后熟过程中, 褐变度均呈逐渐增长趋势, 在储藏 13d 后, 粉蕉与香牙蕉的褐变速率明显高于大蕉, 说明大蕉更适合于作为深加工的原料。在储藏 13d 后, 大蕉的多酚氧化酶和过氧化物酶比活力均比较低, 游离酚含量也比较低, 但总酚含量较高, 最终导致褐变速率较慢, 说明大蕉的褐变度同多酚氧化酶和过氧化物酶有一定的相关性, 大蕉的褐变速率与游离酚的含量呈负相关。对褐变度与多酚氧化酶和过氧化物酶进行相关性分析, 大蕉后熟过程中的褐变度与多酚氧化酶和过氧化物酶的相关性(R^2 值)分别为 0.8789 和 0.9240, 说明大蕉后熟过程中的褐变潜力与多酚氧化酶和过氧化物酶密切相关; 通过紫外-可见吸收光谱扫描和高效液相色谱分析等方法初步鉴定, 大蕉的褐变底物主要为没食子酸和表儿茶素。

关键词: 大蕉; 多酚氧化酶; 过氧化物酶; 褐变底物

Correlations between Browning Degree and PPO or POD Activity of Dajiao Banana (*Musa paradisiaca* ABB cv. Dajiao) and Preliminary Identification of Browning Substrates during Postharvest Ripening

BAI Yong-liang, YU Ming, YUAN Gen-liang, DU Bing, LU Wang-wang, HUANG Shou-yao, YANG Gong-ming*
(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The variation regularity of browning degree (BD), polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) of Dajiao banana (*Musa paradisiaca* ABB cv. Dajiao) was observed and compared with other two banana varieties, Fenjiao and Cavendish. Meanwhile, the role of total and free phenol contents in the browning of Dajiao banana was investigated. BD indicated a progressively increasing trend in the three varieties of banana during postharvest ripening, and Fenjiao and Cavendish browned significantly faster than Dajiao after the 13th day of storage, suggesting that Dajiao was more suitable for deep processing. In addition, Dajiao exhibited low PPO and POD activities and low free phenol content but high total phenol content and consequently browned slowly, demonstrating an association between the BD and PPO or POD activities and a negative correlation between the browning rate and free phenol content of Dajiao. The correlation coefficients between BD and PPO or POD activities were 0.8789 and 0.9240, respectively. Thus, there is a close correlation between the browning potential and PPO or POD activities of Dajiao. The main browning substrates in Dajiao were gallic acid and epicatechin as preliminarily identified using UV-VIS absorption spectroscopy and HPLC.

Key words: Dajiao; polyphenol oxidase; peroxidase; browning substrate

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)04-0271-05

香蕉是热带、亚热带特色水果, 具有润肠通便、提高机体免疫力、抗癌抗肿瘤、保护心血管、抗氧化、治疗抑郁症等众多生理功能, 被誉为“新的水果之王”^[1]。大蕉是香蕉四大品种之一, 其果实较大, 果形较直, 棱角显著, 果皮厚而韧, 果肉杏黄色, 柔软, 味甜

中带微酸, 纤维较多, 富含抑癌、抗癌等物质, 具有一定的营养保健功能^[2]。目前, 大蕉仅为就地销售, 北运不受欢迎, 价格比不上香蕉。但大蕉的栽培较粗放, 成本低, 且容易管理, 少病虫害, 总体投入少, 大蕉这一资源亟待充分开发和利用。褐变是果蔬贮藏加

收稿日期: 2011-01-15

基金项目: 粤港关键领域重点突破项目(200849861007); 东莞市科技计划项目(200910810100600);

广东省农业公关计划项目(2009B020201011)

作者简介: 白永亮(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品加工与贮藏。E-mail: baiyongliang2006@126.com

* 通信作者: 杨公明(1950—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品加工新技术。E-mail: ygm@scau.edu.cn

工中引起品质下降的一个重要方面。众多研究表明新鲜果蔬组织的褐变与酶有密切关系,特别是多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)和过氧化物酶(peroxidase, POD),因为它们均可直接参与褐变底物——酚类物质的氧化^[3]。国内外对香蕉酶促褐变特性有少量报道,鲍金勇等^[4]对香牙蕉蕉皮的PPO、POD酶特性做了初步研究;Umit Unal^[5]对土耳其Anamur香蕉果肉的PPO酶特性进行研究。Yang等^[6-7]对香牙蕉果皮和果肉在成熟过程中的PPO酶活性进行研究。目前,国内外对大蕉的研究主要集中在育种、栽培、防腐保鲜技术及采后色泽变化的研究^[8-9],也有对大蕉抗枯萎病机理的少量报道^[10],但未见大蕉后熟过程中酶促褐变特性研究的报道。本研究以大蕉类的东莞中把为研究对象,对大蕉后熟过程中的褐变潜力与PPO、POD的变化进行研究,确定后熟过程中褐变与酶的相关性,并与粉蕉类的广粉1号和香牙蕉类的巴西蕉进行比较;以大蕉为试材,通过紫外吸收光谱、高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)分析鉴定大蕉的主要褐变底物。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

香牙蕉类的巴西蕉(Musa AAA group, Baxijiao)、粉蕉类的广粉1号(Musa ABB group, Guangfen 1)、大蕉类的东莞中把(Musa ABB group, Dongguan dajiao)均由东莞市香蕉蔬菜研究所提供。所有香蕉采收后及时处理(大蕉和粉蕉无需加催熟剂,香牙蕉经催熟剂处理),在温度20℃的冷库中贮藏,香蕉每隔5d进行测定。

邻苯二酚、愈创木酚、双氧水、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、酒石酸、苯酚、浓硫酸、4-氨基安替比林等都是分析纯。

1.2 仪器与设备

RE-52A型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;752N紫外可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;TDL-5-A离心机 上海安亭科学仪器厂;BS110S精密电子天平、移液枪 北京赛多利斯天平有限公司;打浆机 飞利浦中国投资有限公司。

1.3 方法

1.3.1 大蕉后熟过程中褐变度(browning degree, BD)的测定

参照徐朗莱等^[11]的方法,随机称取香蕉果肉样品10g与冷藏蒸馏水按质量比1:10混合后,于打浆机中匀浆30s,取出离心(4000r/min),然后取上清液于25℃保温5min,在波长410nm处测定其吸光度,结果以 $10 \times A_{410}$,表示褐变度(BD)。

1.3.2 大蕉后熟过程中总酚(total phenolic, TP)和游离酚(free phenolic, FP)的测定

采用4-氨基安替比林法^[12-13],取香蕉样品5g研钵中,充分研磨后转入250mL蒸馏瓶中,加入蒸馏水150mL、10%酒石酸溶液10mL进行蒸馏。收集馏出液100mL,460nm测定吸光度。以苯酚作标准曲线,计算游离酚(FP)含量。总酚(TP)含量测定需将研磨后样品先加50mL 2.5mol/L H₂SO₄煮沸回流1.0h,再加蒸馏水150mL、10%的酒石酸溶液10mL蒸馏,后续操作同游离酚测定。

1.3.3 大蕉后熟过程中多酚氧化酶(PPO)和过氧化物酶(POD)酶液的提取和比活力测定

均采用袁根良^[14]、Yu^[15]、高俊凤^[16]、詹嘉红^[17]等方法。

1.4 大蕉褐变底物鉴定

1.4.1 大蕉多酚提取液的制备

参照Loaiza-Velarde等^[18]的方法。随机称取大蕉果肉样品20.0g,放入打浆机后加40.0mL甲醇打浆30s, -20℃冰箱中过夜,15000r/min离心25min,倒出上清液备用。

1.4.2 大蕉多酚物质的紫外扫描

取3.0mL大蕉酚提取液置于石英比色皿中,在200~400nm紫外区域扫描,基线扫描以甲醇作标准液,扫描操作样品。

1.4.3 大蕉多酚物质的液相色谱分析

色谱柱:SB-C₁₈;流动相:乙腈(A)-0.4%冰乙酸(B)进行梯度洗脱;洗脱程序:0min(95%B)—40min(75%B)—45min(65%B)—50min(50%B)—55min(45%B);流速:1.000mL/min;检测波长:280nm;进样量:20μL;柱温:30.0℃。

2 结果与分析

2.1 大蕉后熟过程中褐变度(BD)的变化

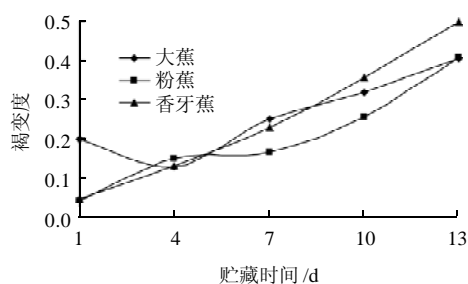


图1 贮藏时间对大蕉褐变度的影响
Fig.1 Effect of storage time on browning degree of Dajiao

从图1可以看出,三种香蕉在后熟过程中,褐变度呈逐渐增加趋势,在贮藏13d后,香牙蕉的褐变度最高,粉蕉与香牙蕉的褐变速率明显高于大蕉。这可能与大蕉果肉内部成分变化缓慢,酚类底物释放受到抑制,导致与PPO和POD的反应也受到限制,另外有可能是PPO和POD的比活力没有完全得到释放。

2.2 大蕉后熟过程中多酚氧化酶(PPO)的变化

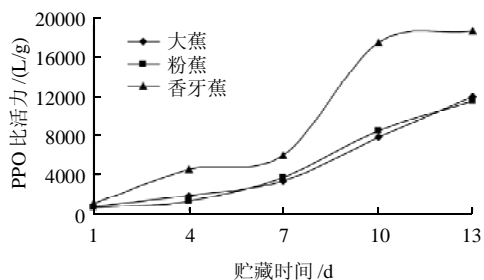


图2 贮藏时间对大蕉PPO比活力的影响

Fig.2 Effect of storage time on PPO activity of Dajiao

香蕉褐变的主要原因是香蕉组织中多酚氧化酶催化各种酚类底物发生氧化,首先氧化成醌,然后再聚合成黑色素,给产品带来令人不愉快的感观^[21]。从图2可以看出,未成熟的青香蕉PPO含量很低,几乎为0,青香蕉经过13d的后熟,PPO比活力明显增加,香牙蕉PPO比活力增加的最快,其PPO比活力是大蕉PPO比活力的1.56倍,粉蕉PPO比活力增加速率也稍高于大蕉。PPO比活力的增加可能来自于结合态酶的释放,也可能是源于酶前体的转化,还可能是由于新的PPO合成,特别是在有酚类物质合成和乙烯诱导时^[19]。

2.3 大蕉后熟过程中过氧化物酶(POD)的变化

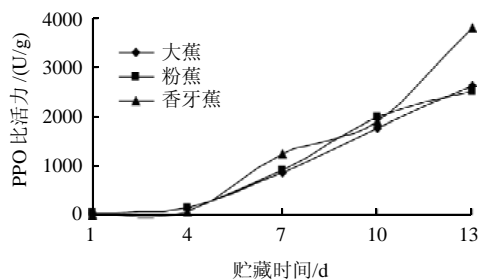


图3 贮藏时间对大蕉POD比活力的影响

Fig.3 Effect of storage time on POD activity of Dajiao

从图3可以看出,大蕉后熟过程中的POD变化和PPO的变化十分相似,从青大蕉时的比活力几乎为0增加到熟时的2611.7U/g,香牙蕉PPO比活力增加的最多,

成熟时达到3808.08U/g,而粉蕉和大蕉的POD比活力基本一致,此时,香牙蕉POD比活力分别是大蕉的1.45倍。结合图1、2说明,同香牙蕉与粉蕉相比,随着储藏期的延长,大蕉是最不容易褐变的。

2.4 大蕉后熟过程中游离酚(FP)的变化

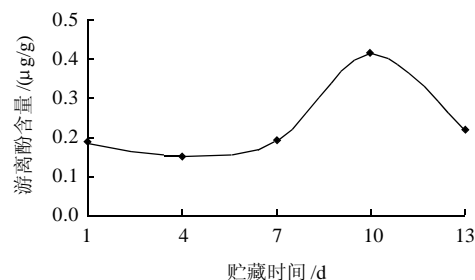


图4 贮藏时间对大蕉游离酚的影响

Fig.4 Effect of storage time on free phenol content of Dajiao

已有研究表明与褐变直接相关的是FP,其含量越多发生褐变的可能性愈大^[19]。从图4可以看出,大蕉后熟过程中游离酚的含量变化在贮藏前期变化不大,都在0.2μg/g左右,游离酚含量总体是先上升后下降,大蕉在贮藏第10天游离酚达到最高,然后迅速下降,此时游离酚含量与褐变度成负相关,这也可能是导致此时褐变速率持续下降的原因。

2.5 大蕉后熟过程中总酚(TP)的变化

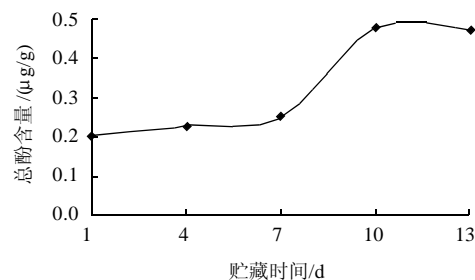


图5 贮藏时间对大蕉总酚的影响

Fig.5 Effect of storage time on total phenol content of Dajiao

酚类物质是果蔬体内一种次生代谢产物,极易在酚酶作用下氧化,引起色泽改变^[19]。有许多资料显示在果蔬组织培养中的褐变的与果蔬体内总酚含量密切相关,总酚含量高的材料,离体培养难度大,褐变容易发生^[20]。但是,从图5可以看出,大蕉的总酚含量都在0.2~0.5μg/g之间,并随着贮藏时间的延长而增加,经过10d的贮藏后,大蕉的总酚含量达到最高,随后保持在较高的水平上,与其他水果相比^[22-23],总酚含量与

褐变速率的相关性并不明显。结合图1~3分析,在储藏13d后,大蕉的PPO和POD比活力均比较低,但总酚含量较高,最终导致褐变速率较慢,说明大蕉的褐变度同PPO和POD有一定的相关性,同时说明大蕉的褐变速率与游离酚含量呈负相关。这一现象在有关香蕉文献中未见报道。

2.6 大蕉贮藏期间BD与PPO、POD活性变化的相关性

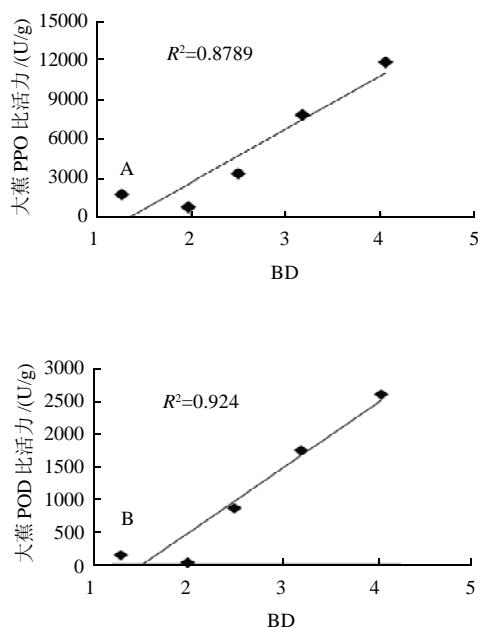
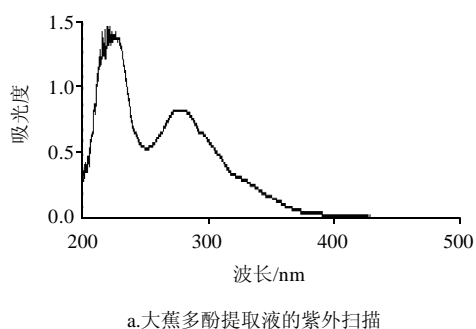


图6 大蕉贮藏期BD与PPO(A)和POD(B)比活力变化的相关性
Fig.6 Correlations between browning degree and PPO or POD activities of Dajiao

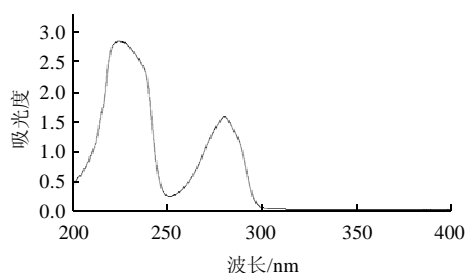
如图6所示,大蕉BD值与PPO和POD的 R^2 值分别为0.8789和0.9240,说明大蕉后熟过程中的褐变潜力与PPO和POD具有很好的相关性。

2.7 大蕉褐变底物的初步鉴定

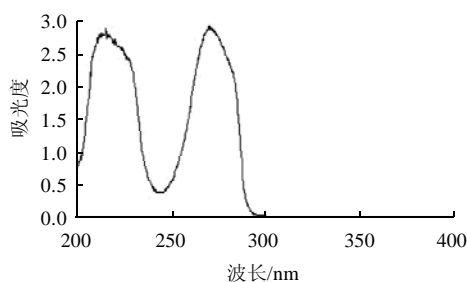
2.7.1 紫外扫描图



a.大蕉多酚提取液的紫外扫描



b.表儿茶素的紫外扫描图



c.没食子酸的紫外扫描图

图7 大蕉酚提取液及部分标品紫外扫描图

Fig.7 UV scanning spectra of phenol extracts from Fenjiao and Cavendish

对大蕉酚提取物与标准酚样品进行紫外扫描以进一步确定酚的种类结果见图7。大蕉酚提取物的紫外-可见扫描谱图与标样表儿茶素和没食子酸谱图的谱形基本一致,大蕉多酚提取液的紫外扫描图含有两个吸收峰(223nm和275nm),与表儿茶素的紫外吸收峰(223nm和278nm)和没食子酸的紫外吸收峰(220nm、275nm)基本一致。因此,推论大蕉中的酚类物质可能是其中一种或是几种。

2.7.2 大蕉酚类物质的HPLC分析

对大蕉酚类提取物进行HPLC分析可以证实大蕉中的酚主要有没食子酸和表儿茶素。需要注意的是HPLC同时出现有多个峰,大蕉褐变底物中也可能有其他酚存在。

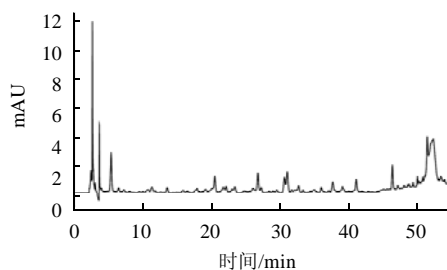
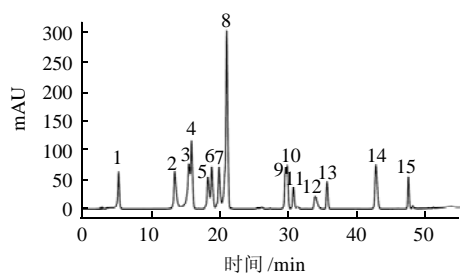


图8 大蕉酚类提取液高效液相色谱图

Fig.8 HPLC profile of phenol extract from Dajiao



1.没食子酸; 2.龙胆酸; 3.绿原酸; 4.儿茶素; 5.香草酸; 6.咖啡酸; 7.丁香酸; 8.表儿茶素; 9.阿魏酸; 10.芦丁; 11.金丝桃苷; 12.水杨酸; 13.黄芩苷; 14.白藜芦醇; 15.槲皮素。

图9 不同酚类标品的高效液相色谱图

Fig.9 HPLC profile of a mixture of phenolic compound standards

根据各峰的保留时间判断酚类物质的种类, 从图8、9可以看出, 大蕉酚提取液中部分物质的保留时间与标品中的没食子酸和表儿茶素的保留时间一致, 从而初步确定大蕉褐变底物主要为没食子酸和表儿茶素, 但不能排除大蕉中还有其他酚的存在, 采用如质谱、核磁共振仪等可对大蕉中是否存在其他酚及对酚的组成进一步分析确证。

3 结 论

3.1 大蕉、粉蕉和香牙蕉的褐变度、PPO 和 POD 随着成熟度的增加而上升, 成熟时香牙蕉和粉蕉的褐变速率均比大蕉高; 三种青香蕉的 PPO 和 POD 比活力几乎为 0, 经过 13d 的后熟, 香牙蕉 PPO 和 POD 比活力增加的最快, 其 PPO 和 POD 比活力分别是大蕉的 1.56 倍和 1.45 倍。因此, 从褐变速率看, 与其他两种蕉相比, 大蕉更适合于作为深加工的原料。

3.2 大蕉游离酚含量总体是先上升后下降, 大蕉在贮藏第 10 天游离酚达到最高, 然后迅速下降; 大蕉总酚含量随着贮藏时间的延长而增加, 经过 10d 的贮藏后, 大蕉的总酚含量达到最高, 随后保持在较高的水平上。在储藏 13d 后, 大蕉的 PPO 和 POD 比活力均比较低, 游离酚含量也比较低, 但总酚含量较高, 最终导致褐变速率较慢, 说明大蕉的褐变度同 PPO 和 POD 有一定的相关性, 大蕉的褐变速率与游离酚含量呈负相关。

3.3 大蕉后熟过程中的褐变度与 PPO 和 POD 的相关性 (R^2 值) 分别为 0.8789 和 0.9240, 说明大蕉后熟过程中的褐变与 PPO 和 POD 密切相关。

3.4 通过紫外-可见光谱扫描和 HPLC 光谱分析等方法初步鉴定大蕉褐变底物主要为没食子酸和表儿茶素。

参考文献:

- [1] 赵国建, 杨公明, 鲍金勇. 香蕉营养保健价值及综合利用[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(6): 175-179.
- [2] 陈厚彬, 李建国, 冯奇瑞, 等. 28 个香蕉品种果实性状评估[J]. 华南农业大学学报, 2004, 25(4): 6-11.
- [3] LAMIKANRA O. Fresh-cut fruits and vegetables: science, technology and market[M]. London, New York, Washinton: CRC Press, LLC, 2002: 125-186.
- [4] 鲍金勇, 赵国建, 杨公明, 等. 香蕉皮多酚氧化酶和过氧化物酶特性的研究[J]. 食品科技, 2005, 24(11): 17-20.
- [5] UMIT UNAL M. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana [J]. Food Chemistry, 2007, 100(3): 909-913.
- [6] YANG Changpeng, NONG Zhirong, LU Jianlin, et al. Banana polyphenol oxidase: Occurrence and change of polyphenol oxidase activity in some banana cultivars during fruit development[J]. Food Science and Technology Research, 2004, 10(1): 75-78.
- [7] YANG Changpeng, FUJITA Shuji, KOHNO K, et al. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) peel[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(3): 1446-1449.
- [8] 杨明, 刘晓辉, 梁火娣. 热带大蕉采后系列研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(18): 5422-5438.
- [9] 李云, 陆旺金, 庞学群, 等. 香蕉和大蕉果实不同温度下催熟后的色泽变化[J]. 园艺学报, 2006, 33(3): 617-620.
- [10] 陈雅平, 陈云凤, 黄学林, 等. 大蕉苯丙氨酸解氨酶基因的克隆、鉴定和表达分析[J]. 植物生理与分子生物学报, 2007, 15(5): 421-427.
- [11] 徐明莱, 叶茂炳. 过氧化物酶活力连续纪录测定法[J]. 南京农业大学学报, 1989, 12(3): 82-83.
- [12] 刘福岭, 戴行军. 食品物理与化学分析方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1987: 373-379.
- [13] 王清章, 刘怀超, 孙颖. 莲藕贮藏中褐变度及多酚氧化酶活性的初步研究[J]. 中国蔬菜, 1997, 18(3): 4-6.
- [14] 袁根良, 杨公明, 余铭, 等. 超高压处理对香蕉果肉多酚氧化酶和过氧化物酶活性抑制的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 64-68.
- [15] YU Zhifang, KANG Ruoyi, LU Zhaoxin. Effects of blanching on the activities of PPO, POD and PAL from *Artemisia selengensis*[C]//The 5th International Conference of Food Science and Technology Proceedings. Wuxi, China, 2003.
- [16] 高俊凤, 孙群, 梁宗锁, 等. 植物生理学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2001: 192-194.
- [17] 詹嘉红. 橄榄果实中 PPO 和 POD 活性抑制研究[J]. 亚热带植物学, 2005, 34(4): 14-16.
- [18] LOAIZA-VELARDE J G, MANGRICH M E, CAMPOS-VARGAS R, et al. Heat shock reduces browning of fresh-cut celery petioles[J]. Postharvest Biology and Technology, 2003, 27(3): 305-311.
- [19] 郁志芳. 鲜切芦蒿的品质和酶促褐变机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- [20] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986: 34-36.
- [21] 张勇, 池建伟, 温其标, 等. 香蕉酶促褐变的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(3): 45-48.
- [22] 袁江, 张绍铃, 曹玉芬, 等. 梨果实酚类物质与酶促褐变底物的研究[J]. 园艺学报, 2011, 38(1): 7-14.
- [23] 张振霞, 洪萍. 橄榄总多酚含量及多酚氧化酶活性与组培褐变的关系[J]. 中国农业学报, 2010, 26(22): 54-57.