

砀山酥梨多酚氧化酶酶学特性 及抑制效应的研究

徐 芹¹, 乔勇进^{1,2,*}, 方 强², 张绍铃¹, 王海宏¹

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095

2. 上海市农业科学院农产品保鲜加工研究中心, 上海 201106)

摘 要: 多酚氧化酶是酶促褐变的关键酶, 其特性与对其抑制效应研究一直是果蔬酶促褐变生理生化研究的重要内容, 本试验以邻苯二酚为底物, 采用分光光度法对砀山梨多酚氧化酶的酶学特性及不同抑制剂对多酚氧化酶活性的影响进行了研究。结果表明: 砀山梨 PPO 的最适 pH 为 4.5, 最适温度为 34℃; 短时间高温能显著抑制 PPO 活性; PPO 催化的酶促褐变反应动力学符合米氏方程, 该酶促反应的最大速率为 178.57U/min, 酶反应速度为最大反应速度 1/2 时的底物浓度为 0.125mol/L; 柠檬酸、L-半胱氨酸、抗坏血酸, 亚硫酸氢钠较柠檬酸能较好地抑制 PPO 活性, 随着浓度的升高, 抑制效应逐渐增强, 但综合研究表明 L-半胱氨酸抑制效应较好。

关键词: 砀山酥梨; 多酚氧化酶; 酶学特性; 抑制效应

Study on Polyphenol Oxidase (PPO) Character and Inhibiting Effects of Dangshan Pear

XU Qin¹, QIAO Yong-jin^{1,2,*}, FANG Qiang², ZHANG Shao-ling¹, WANG Hai-hong²

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Agro-product Fresh Keeping and Processing Research Center, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

Abstract: Polyphenol oxidase (PPO) is the key enzyme of enzymatic browning, and its characteristics and inhibiting effects are the important involvements of studying enzymatic browning of fruit and vegetable. With spectrophotometry method and based on substrate of catechol, the characteristics of PPO and the effects of various inhibitors on PPO activity were investigated. The results showed that the optimum pH-activity is 4.5, and the optimum temperature for pear PPO activity is 34℃, so the high temperature short time treatment can inhibit PPO activity evidently. The kinetics of the enzyme-catalyzed reaction of PPO is in accord with Michaelis-Menten equation, whereas K_m and V_{max} values are respectively 0.125 mol/L and 178.57 U/min. Of the inhibitors tested, L-cysteine, sodium bisulphite or ascorbic acid is more effective than citric acid, and the most effective inhibitor is L-cysteine.

Key words Dangshan pear; polyphenol oxidase; enzyme character; inhibiting effect

中图分类号: Q554.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0074-04

砀山酥梨是我国梨特色品种, 果个大、品质优、营养丰富, 其产量位于梨产量之首, 2006 年仅安徽砀山县砀山酥梨总产量就超百万吨。砀山酥梨在深加工过程中易发生酶促褐变, 影响了产品的风味、色泽, 同时还降低了梨制品的营养价值。而引起酶促褐变的主要酶类为多酚氧化酶(PPO)。

PPO 以铜离子为辅基, 其在分子氧存在的情况下作用于酚类物质, 使酚类物质氧化成羟基醌, 进而聚合

生成黑色素物质而引起产品发生褐变。许多农产品如鸡腿蘑、番荔枝、水蜜桃、桑葚、茄子等^[1-5]中的 PPO 酶学特性前人已有研究。在抑制剂研究方面, 有机酸、硫化物、金属离子螯合剂、酚类底物类似物质能有效抑制 PPO 活性^[6]。梨作为我国优势果品, 梨多酚氧化酶研究一直受到关注。辛广等^[7]对南果梨果肉多酚氧化酶进行了纯化并对其同工酶进行了分析; 程建军^[8]以酶促反应中底物的消耗量和产物的生成量为目标对苹果梨中多

收稿日期: 2007-04-24

基金项目: 农业部“948”梨项目(2001-102-06)

作者简介: 徐芹(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方为果品加工与贮藏。E-mail: xulihequqin@126.com

* 通讯作者: 乔勇进(1967-)男, 研究员, 博士, 研究方向为农产品保鲜加工。E-mail: yjqiao2002@sohu.com

酚氧化酶酶反应动力学进行了研究;同时关于雪花梨^[9]、黄花梨^[10]中PPO的酶学特性研究也有相关报道,但尚未见到对砀山酥梨中PPO特性的相关研究报道。故本实验通过对砀山酥梨中PPO酶学特性及抑制效应进行研究,以期为砀山酥梨深加工过程中褐变控制提供理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

砀山酥梨削皮后纵切成小块(3cm×2cm×1cm), -70℃保存备用。分别测定不同pH(3~8)和温度(20~70℃)条件下PPO酶的活力;通过高温处理(75、85、95℃)测定不同时间的PPO活性,进行PPO热稳定性研究;在底物(邻苯二酚)不同浓度下测定酶活,并用米氏方程进行回归分析,确定PPO酶动力学模型;通过柠檬酸、L-半胱氨酸、抗坏血酸、亚硫酸氢钠不同浓度处理测定PPO活力变化,以研究抑制效应。

1.2 酶液制备

PPO提取采用黄建韶等^[11]方法进行并作部分改进。将-70℃冷冻的砀山酥梨取出,称取100g果肉并在4℃解冻3h,然后迅速加入200ml冰丙酮(-20℃)用高速组织捣碎机捣碎3min,抽滤,残渣用冰丙酮反复冲洗,再抽滤,直至成为白色粉末,放置室温干燥一夜后,称重,并保存在-20℃下,待用。本实验用缓冲液为0.1mol/L柠檬酸+0.2mol/L磷酸氢二钠。取0.5g丙酮粉,加入15ml柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH6.2, 4℃)于研钵中,置冰浴中研磨,在10000r/min下离心30min,取上清液,即为粗酶提取液,置于冰浴中待测。

1.3 PPO酶活测定方法

PPO活性测定参照Coseteng MY速率法^[12]并加以改进。取0.10mol/L柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 6.2)2.6ml,分别与0.20mol/L邻苯二酚(底物)0.3ml混合,28℃水浴中预热5min,加入0.1ml PPO提取液,立即用分光光度计在420nm处测定吸光度(A)。每隔10s读取一次A值,依据曲线最初的直线部分计算酶活力。以在1min内引起吸光度增加0.001所需的量为一个酶活性单位(以U/min表示)。

1.4 数据处理

数据通过Excel 2003软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 pH对砀山酥梨PPO活性的影响

PPO活性随pH变化总体呈现双峰曲线(图1), pH3~4.5时, PPO活性呈直线上升趋势,并在pH值为4.5时酶活性达到最高值(酶活100%), pH3的PPO相对活性仅为pH4.5的23.16%; pH4.5~5时, 酶活性呈直线下降趋势, pH5的PPO相对活性仅为pH4.5的47.46%; pH

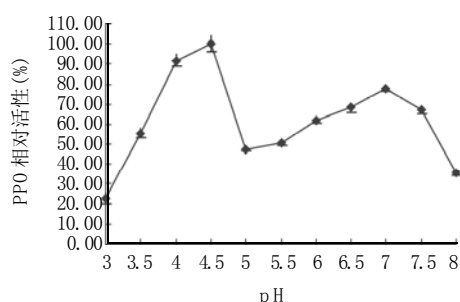


图1 pH对砀山酥梨PPO活性的影响

Fig.1 pH effects of on PPO activity of Dangshan pear

值在5~7时, 酶活又呈缓慢上升趋势,并在pH7时达到另一高值,为pH4.5的77.97%;随后又呈下降趋势,当pH值为8时, PPO相对活性是pH4.5的35.31%。由此可见pH对酶活性的影响很大,这主要是由于当pH值较低时,酶中的铜被解离出来,使酶失活,并且酸性较低,蛋白质变性也使酶失活;当pH值较高时铜与酶蛋白脱离,生成不溶性Cu(OH)₂,也会使酶失活。双峰曲线与砀山酥梨PPO同功酶作用有关。

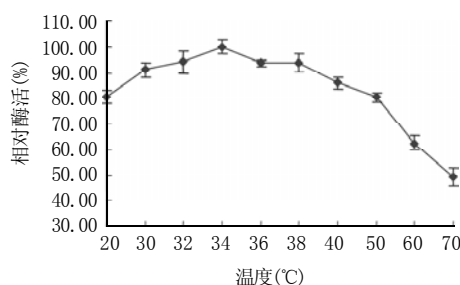


图2 温度对砀山酥梨PPO活性的影响

Fig.2 Temperature effects on PPO activity of Dangshan pear

2.2 温度对砀山酥梨PPO活性的影响

随着温度的升高, PPO活性逐渐增强,并在34℃时酶活性达到最高(酶活性100%), 20℃的PPO相对活性是34℃的80.47%;但当温度再继续升高时,酶活性呈下降趋势,70℃时的PPO相对活性仅为34℃的49.32%(图2);因此砀山酥梨中PPO的最适温度为34℃。温度对PPO酶活性的影响较大,特别是在较高温度条件下影响更为显著,这主要是由于高温对酶蛋白的破坏从而使酶失活。

2.3 砀山酥梨PPO热稳定性

温度是影响酶活性的关键因子。随着温度的提高,完全抑制PPO活性所需要的时间逐渐减少(图3)。当处理温度分别为75、85、95℃时,有效抑制PPO活性所需时间分别为5、2、1min;当处理时间同为1min时,75、85℃的PPO相对活性分别为73.21%、53.27%,而95℃的PPO相对活性仅有3.85%。因此高温短时间处理

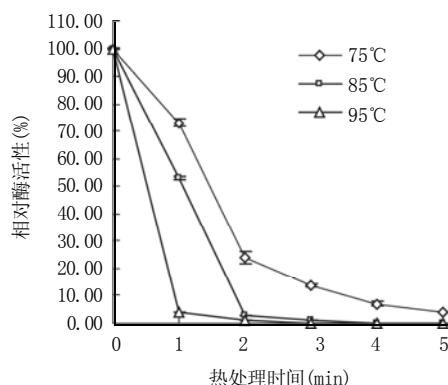


图3 热处理对砀山梨 PPO 活性的影响

Fig.3 Heat treatment effects on PPO activity of Dangshan pear

能显著抑制 PPO 活性。但在实际生产中还要考虑到完整组织或匀浆中的混合酶比纯化酶更为耐热,所以要选择合适的加工温度来控制梨加工质量^[13]。

2.4 不同底物浓度对 PPO 活性的影响

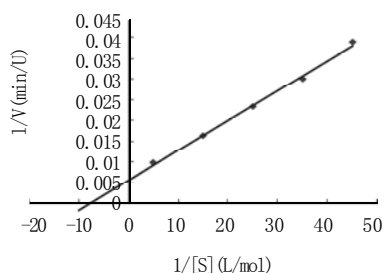


图4 砀山酥梨 PPO 酶促反应双倒数曲线

Fig.4 Double reciprocal plot of PPO enzymatic reaction

根据中间复合物假说,酶催化反应可表示为 $E+S \rightleftharpoons ES \rightarrow E+P$, 米氏方程 $V=V_{\max}[S]/(K_m+[s])$, 即 $1/V=K_m/V_{\max} \times 1/[S] + 1/V_{\max}$ 。以 $1/V$ 为纵坐标,以 $1/[S]$ 为横坐标,采用双倒数作图法作图,得直线方程为 $y=0.0007x+0.0056$, $R^2=0.9964$,从而得出 $V_{\max}=178.57U/min$, $K_m=0.125mol/L$ 。说明该酶催化反应与米氏方程高度吻合,该酶促反应的最大速率为 $178.57U/min$,最大反应速度 $1/2$ 时的底物浓度为 $0.125mol/L$ 。可以运用该方程对催化反应进行机理分析和应用性评价。

2.5 抑制剂对多酚氧化酶活性的影响

多酚氧化酶活性是酶促褐变的关键制约因素之一,随着柠檬酸、L-半胱氨酸、抗坏血酸、亚硫酸氢钠浓度的增大,PPO 相对活性呈逐渐下降趋势,说明 PPO 活性受到不同程度的抑制(图 5、6)。在预试验中 $10mmol/L$ 柠檬酸对 PPO 活性抑制作用不明显,所以要抑制砀山梨中 PPO 活性需要使用高浓度柠檬酸溶液。当柠檬酸浓度达到 $1mol/L$ 时,PPO 相对残留活性为 15.16% ,其受抑制程度达到 84.84% ,因此柠檬酸对砀山酥梨 PPO 的抑制

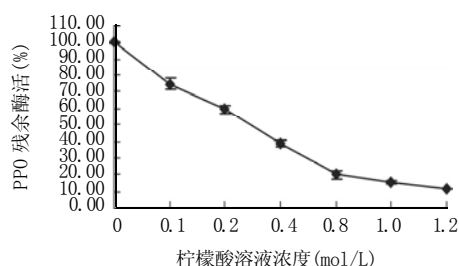


图5 不同的柠檬酸浓度对砀山梨 PPO 活性的影响

Fig.5 Effects of different citric acid contents on PPO activity

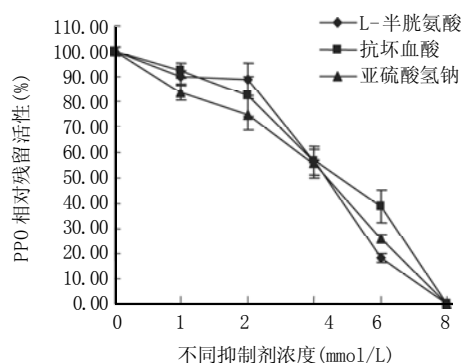


图6 不同的抑制剂浓度对砀山梨 PPO 活性的影响

Fig.6 Effects of different L-cysteine concentrations on PPO activity

作用不是十分理想。而 L-半胱氨酸、抗坏血酸,亚硫酸氢钠较柠檬酸能较好地抑制 PPO 活性,随着浓度的升高,其抑制效应逐渐增强(图 6);在同一浓度范围内,不同抑制剂对 PPO 的抑制效果存在差异,低浓度 ($0 \sim 4mmol/L$),抑制效应分别为亚硫酸氢钠略高于抗坏血酸和 L-半胱氨酸,但三者的抑制效应差异不显著;高浓度 ($4 \sim 8mmol/L$),L-半胱氨酸、亚硫酸氢钠能有效地抑制 PPO 活性,抑制剂浓度为 $6mmol/L$ 时,PPO 活性的受抑制程度分别达到 81.91% 、 74.47% ,而抗坏血酸的仅为 61.27% ,抑制效应分别为 L-半胱氨酸>亚硫酸氢钠>抗坏血酸,三者的抑制效应差异显著;但当三种抑制剂浓度达到 $8mmol/L$ (图 6),三种抑制剂可完全抑制 PPO 活性。以较低的抑制剂浓度的最佳抑制效应分析,L-半胱氨酸抑制 PPO 活性的效果为最佳。

3 结论与讨论

砀山酥梨 PPO 受 pH 和温度影响显著。砀山酥梨 PPO 最适 pH 值为 4.5 ,说明酸性条件下有利于保持 PPO 的高活性,这也与程建军等^[14]报道苹果梨最适 pH 值为 4.6 的结果相近。研究中两个活性高峰出现,可能是同功酶系作用的直接反映,说明砀山酥梨中存在 PPO 同功酶,这在菊芋^[15]、梨^[9]中也有类似的报道。砀山酥梨 PPO 的最适温度为 $34^\circ C$ 。但蔡金星等^[7]报道雪花梨中 PPO 最适温度为 $24^\circ C$,鸭梨为 $30^\circ C$,白梨为 $20^\circ C$,安梨为 $22^\circ C$ 。

说明砀山酥梨 PPO 的最适温度高于鸭梨、白梨和安梨。而程建军等^[14]报道苹果梨最适温度为 40℃, 可见, 不同树种或不同品种内 PPO 最适温度存在很大差异。由于 pH 和温度对 PPO 活性有较大影响, 在实践中可以利用调节 pH 和高温(热烫)钝化酶活, 从而减少褐变的发生。

短时间高温能显著抑制 PPO 活性。75、85、95℃ 有效抑制 PPO 活性所需时间分别为 5、2、1min; 75℃ 处理 5min 后酶活性基本丧失, 因此通过采用高温瞬时灭酶法可以使 PPO 酶活丧失同时也减少了梨热烫过程中非酶褐变的发生和梨汁营养物质的损耗, 在香蕉^[13]和茄子^[16]上前人也有相近的研究。PPO 催化的酶促褐变反应动力学符合米氏方程, 该酶促反应的最大速率为 178.57U/min, 酶反应速度为最大反应速度 1/2 时的底物浓度为 0.125mol/l。

柠檬酸、抗坏血酸、亚硫酸氢钠和 L-半胱氨酸能有效抑制砀山酥梨中 PPO 活性, 但比较柠檬酸、抗坏血酸、亚硫酸氢钠发现, L-半胱氨酸抑制砀山梨中 PPO 活性的效果为最佳。不同抑制剂抑制褐变的机理各不相同^[17], 而且有实验表明不同的抑制剂有其抑制 PPO 活性的最佳浓度^[11, 18]。半胱氨酸可作为螯合剂, 与酶促褐变的中间产物醌作用生成稳定的无色化合物, 从而使产品保持较好的外观, 另外, L-半胱氨酸作为天然营养成分, 其添加安全性高, 是一种较好的抗褐变剂。抗坏血酸也是一种天然抗氧化剂, 可将氧化的醌类及其衍生物还原成酚类物质, 阻止醌类物质进一步聚合形成黑色素类物质, 但添加量过大时, 易引起非酶褐变, 影响产品外观^[19]; 亚硫酸氢钠抑制机理较复杂, 可能在微酸条件下水解产生二氧化硫从而有效地抑制了 PPO 活性^[14]。从本实验中可看出, 亚硫酸氢钠抑制效果也较好, 但由于亚硫酸盐及其分解产生的二氧化硫对人体的健康有害, 因此亚硫酸氢钠在食品上的使用受到严格限制。目前, 在果品加工过程中提倡多种抑制剂结合使用以提高抗褐变效果, 因此还需在对砀山酥梨抑制剂单因素研究的基础上, 对不同抑制剂多因素协同作用机理和抑制效应做深入综合研究, 更好地提高对砀山酥梨 PPO 活性的抑制效果。

参考文献:

- [1] 李君兰, 李怡华, 赵秋玲, 等. 鸡腿蘑多酚氧化酶特性研究[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 187-191.
- [2] 李粉玲, 蔡汉权. 番荔枝果肉多酚氧化酶活性影响因素的研究[J]. 农产品加工: 学刊, 2006, 55(2): 23-34.
- [3] 奇, 王璋. 景红桃和白花桃中多酚氧化酶性质的研究[J]. 食品与机械, 2005, 21(2): 23-26.
- [4] ARSLAN O, ERZENGIN M, SINAN S, et al. Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties [J]. Food Chemistry, 2004, 88: 479-484.
- [5] DOGAN M, ARSLAN O, DOGAN S. Substrate specificity, heat inactivation and inhibition of polyphenol oxidase from different aubergine cultivars[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2002, 37: 415-423.
- [6] MCEVILY A J, JYENGAR R, OTWELL W S. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 1992(2): 253-273.
- [7] 辛广, 朱凤妹, 刘长江. 硫酸铵纯化南果梨果肉多酚氧化酶的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 32-34.
- [8] 程建军. 苹果梨中多酚氧化酶反应动力学和反应进程的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(8): 69-71.
- [9] 蔡金星, 李秀锦, 刘秀凤. 不同品种梨多酚氧化酶特性及其抑制剂的研究[J]. 河北农业技术师范学院学报, 1999, 13(1): 55-58.
- [10] 罗小妙, 史碧波, 曾申坤. 黄花梨多酚氧化酶特性及防褐变处理[J]. 西昌学院学报: 自然科学版, 2006, 20(4): 44-47.
- [11] 黄建韶, 张洪, 田宏现. 苹果中多酚氧化酶的性质[J]. 食品与机械, 2001, 83(3): 21-22.
- [12] COSETENG M Y, LEE C Y. Changes in apple polyphenol oxidase and polyphenol concentration in relation to degree of browning[J]. J Food Sci, 1987, 52(4): 985-989.
- [13] 张勇, 池建伟, 温其标, 等. 香蕉多酚氧化酶褐变性质的研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(5): 53-57.
- [14] 程建军, 马莺, 杨咏丽, 等. 苹果梨中多酚氧化酶酶学特性的研究[J]. 园艺学报, 2002, 29(3): 261-262.
- [15] 刘树文, 陈锦屏, 王仲孚. 菊芋多酚氧化酶性质的研究[J]. 中国农学通报, 1998(6): 11-13.
- [16] 余华, 周洪波, 何龙海, 等. 茄子多酚氧化酶的酶学特性研究[J]. 食品科学, 2003, 24(12): 44-46.
- [17] 刘金豹, 翟衡, 张静. 果汁褐变及其影响因素研究进展[J]. 饮料工业, 2004, 7(3): 1-5.
- [18] 张洪, 黄建韶. 马铃薯中多酚氧化酶的酶学特性研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(4): 39-41.
- [19] ROIG M G, BELLO J F, RIVERAZ S, et al. Studies on the occurrence of non-enzymatic browning during storage of citrus juice[J]. Food Research International, 1999, 32: 609-619.