

几种柑橘果实白皮层中过氧化物酶特性的比较研究

蒲彪, 李庆

(四川农业大学食品科学系, 四川 雅安 625014)

摘要: 分离出柑橘果实的白皮层, 充分切细使其粒径为 0.5~1mm, 用冷磷酸缓冲液浸提 24h 后四层纱布过滤, 所得过氧化物酶(POD)粗酶液用于酶特性研究。结果表明, 几种柑橘果实之间酶活性差异很大, 最适宜的 pH 和温度均为 5.0 和 40~60℃; 随着底物浓度的升高, 酶活力也升高, 并在 H_2O_2 为 0.07% 时达到饱和状态。以塔希提柠檬白皮层中 POD 为研究对象, 添加不同剂量的 VC 和 Na_2SO_3 作抑制剂, 在浓度分别达到 0.1% 和 0.5% 时 POD 活力受到明显长时抑制。

关键词: 柑橘白皮层; 过氧化物酶(POD); 特性

Study on Comparison of Characteristics of Peroxidase in Albedo of Citrus Fruit

PU Biao, LI Qing

(Department of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: Albedo was chopped up to the diameter of 0.5~1 mm, which was separated from citrus fruits. The thin albedo was soaked in 0.2 mol/L sodium phosphate buffer at pH 6.0 for about 24 hours. Then, the resultant suspension for studying the POD characteristics was filtered through a four-fold layer of muslin. The results showed that POD activities among several species of citrus are different relatively, and the optimum pH and temperature for the POD are 5.0 and 40~60 °C, respectively. The POD activity increases with the increase of substrate concentration (H_2O_2) concentration, and reaches saturated point at 0.07% H_2O_2 . Moreover, both 0.1% VC and 0.5% Na_2SO_3 are strong inhibitors for POD activity in Tahiti albedo.

Key words: albedo of citrus fruit; POD; characteristics

中图分类号: Q554.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)06-0123-04

在柑橘取汁过程中, 其白皮层中的一些物质容易进入鲜榨汁中, 其中就包括过氧化物酶(POD)。而 POD 已被人们熟知, 它是广泛存在于植物体内的一类最耐热的氧化酶, 并作为热烫是否彻底的指示酶类^[1-2]。已进行的研究指出新鲜果蔬的褐变与组织中 POD 有一定的相关性, 任何残留 POD 都可能通过氧化反应导致果蔬品质的劣变。Haard^[3]等研究了一些蔬菜中 POD 活性与其异味的相关关系, 包括甘蓝、玉米棒等。Bruemmer^[4]以柑橘为例指出, 即使严格的取汁过程也会导致大量的 POD 进入果汁, 而果汁本身含较少的 POD 且活性很低, 进入果汁中的大量高活性的 POD 与风味品质的丧失呈正相关关系。

目前对柑橘白皮层中 POD 特性的具体研究还未见报道, 本实验将初步研究柑橘白皮层中 POD 的酶学特性及在不同因素处理下的抑制效应, 以期对柑橘取汁后品质

的保持提供理论和技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料

甜橙: 北碚 447#(泸州市)、蓬安 100#(泸州市)、佛罗橙(安岳县)、王字 4#(泸州市); 柠檬: 力克(安岳县)、塔希提(大英县)。

1.1.2 试剂

Na_2SO_3 、VC、愈创木酚(邻甲基苯酚)、30% H_2O_2 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 及 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。

1.1.3 仪器

7200 型可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司

收稿日期: 2007-04-17

基金项目: 四川省科技厅重大科技攻关计划项目(05NG003-016)

作者简介: 蒲彪(1956-), 男, 副教授, 主要从事果蔬加工、功能性食品研究。E-mail: pubiao2002@yahoo.com.cn

司; HH-4 数显恒温水浴锅 金坛市富华仪器有限公司;
鼓风干燥箱 上海市实验仪器总厂。

1.2 方法

1.2.1 柑橘白皮层 POD 粗酶液的提取

分离出柑橘果实的白皮层, 充分切细使其粒径为 0.5~1mm。称取 10g 细粒加入 pH6.0 冷磷酸缓冲液 50ml, 于 4℃ 冷暗处浸提 24h 后四层纱布过滤, 滤液定容至 100ml, 冷藏备用。

1.2.2 柑橘白皮层 POD 活力的测定^[5]

预先向比色管中加入 3ml 粗酶液, 再加入反应混和液(0.2mol/L pH6.0 磷酸缓冲液 50ml、过氧化氢 0.028ml、愈创木酚 0.019ml)5ml, 立即开启秒表计时。以 0.2mol/L、pH6.0 磷酸缓冲液作为零对照。用分光光度计在 470nm 波长下测定反应 5min 的光密度, 以每分钟光密度变化 0.001 为 1 个酶活力单位(U), 即以 $\Delta OD_{470}/\text{min} \cdot \text{ml}$ 表示。

1.2.3 pH 对柑橘白皮层 POD 活力的影响

配制缓冲液, pH 值分别为 3、4、5、6、7、8、9, 建立反应体系, 于 37℃ 下恒温 5min 测定酶活。

1.2.4 温度对柑橘白皮层 POD 活力的影响

1.2.4.1 最适反应温度

按活性测定方法建立反应体系, 分别于 0、20、30、45、60、75、90℃ 及沸水下先保温 5min, 立即加入酶液测定酶活。

1.2.4.2 热稳定性

将酶液在 60、65、70、75℃ 不同温度条件下保温 10min, 每间隔 2min 按最适宜反应条件测定其活力。以最适宜条件下所检测到的酶活力为基数计算各个温度条件下的相对酶活力。

1.2.5 H_2O_2 对柑橘白皮层 POD 活力的影响

在其 POD 最适 pH 和温度条件下以 0.000%、0.014%、0.028%、0.042%、0.070%、0.084% 和 0.098% 浓度的 H_2O_2 为反应底物测定 POD 活力以及反应速度。

1.2.6 抑制剂对柑橘白皮层 POD 活力的影响

1.2.6.1 VC 对柑橘白皮层 POD 活力的影响

分别向酶液中加入不同量的 VC, 使其浓度分别达到 0.00%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.10%, 于 60℃ 保温 5min 后加入反应混合液, 振荡混匀, 立即测定酶活。

1.2.6.2 Na_2SO_3 对柑橘白皮层 POD 活力的影响

分别向酶液中加入不同量的 Na_2SO_3 , 使其浓度分别达到 0.03%、0.10%、0.20%、0.30%、0.40%、0.50%, 于 60℃ 下保温 5min 后加入反应混合液, 振荡混匀, 立即测定酶活。

2 结果与分析

2.1 pH 对几种柑橘白皮层 POD 活力的影响

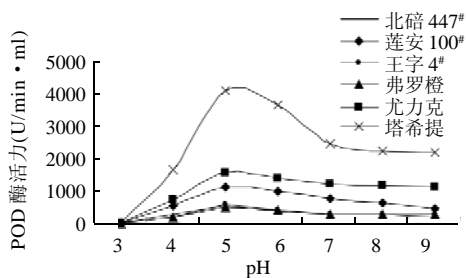


图1 pH 对几种柑橘白皮层 POD 活力的影响

Fig.1 Effects of pH on POD activity of citrus albedo

由图 1 可以看出, 几种柑橘白皮层 POD 活性在 pH 为 5.0 时出现了最大值, 高于或者低于 5.0 时 POD 活力都受到影响, 特别在酸性条件加强时, 酶活力迅速下降, 到 3.0 时酶活力基本丧失。但在碱性环境中, 酶活力下降缓慢, 到 9.0 时仍然保持了一定的活力, 可见 POD 耐碱的能力较强, 而对酸敏感。比较这几种柑橘白皮层 POD 活力, 可以非常明显地看出, 塔希提柠檬白皮层中的 POD 活力最高, 尤力克柠檬次之, 再次是蓬安 100#, 剩下三种(北碚 447#、王字 4# 和佛罗橙)白皮层中 POD 活性相当接近。

由此可见, 不同来源的 POD 活性有相当的差异, 而柠檬总体上又高于橙类, 但是柠檬本身 pH 可达 2.0, 对 POD 活性有相当大的抑制作用。故鲜榨汁 pH 因为各种原因上升时, POD 活力将升高从而加速品质败坏。

2.2 温度对几种柑橘白皮层 POD 活力的影响

温度对这几种柑橘白皮层 POD 活力影响显著。由图 2 可以看出, 除北碚 447# 白皮层中 POD 活力的最适温度在 40℃, 其他几种柑橘最适温度在 60℃, 并且在 40~70℃ 之间保持了较高的活力。当温度超过 70℃, 酶活力迅速下降, 到 90℃ 时酶活力只有最高时的 1/3, 沸水中保持 5min 即可使酶活力完全丧失; 当温度在 0~20℃ 时, 酶活力仍然存在, 随着温度的升高, 酶活力急速升高。

用沸水处理酶液的实验结果表明, 处理时间与酶活力关系密切: 当其处理时间在 10s 以内时, 酶活力仍然很大, 证明酶并没有被完全杀死; 而长时间的高温处理又会导致营养成分的破坏。Kathryn M^[6]等指出, 在 75℃ 处理 2min 后, 橙子白皮层 POD 酶活力就完全丧失, 他同时指出对柑橘汁进行高温短时处理可能不能达到有效钝

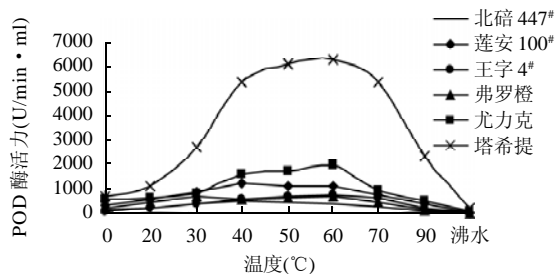


图2 温度对几种柑橘白皮层 POD 活力的影响

Fig.2 Effects of temperature on POD activity of citrus albedo

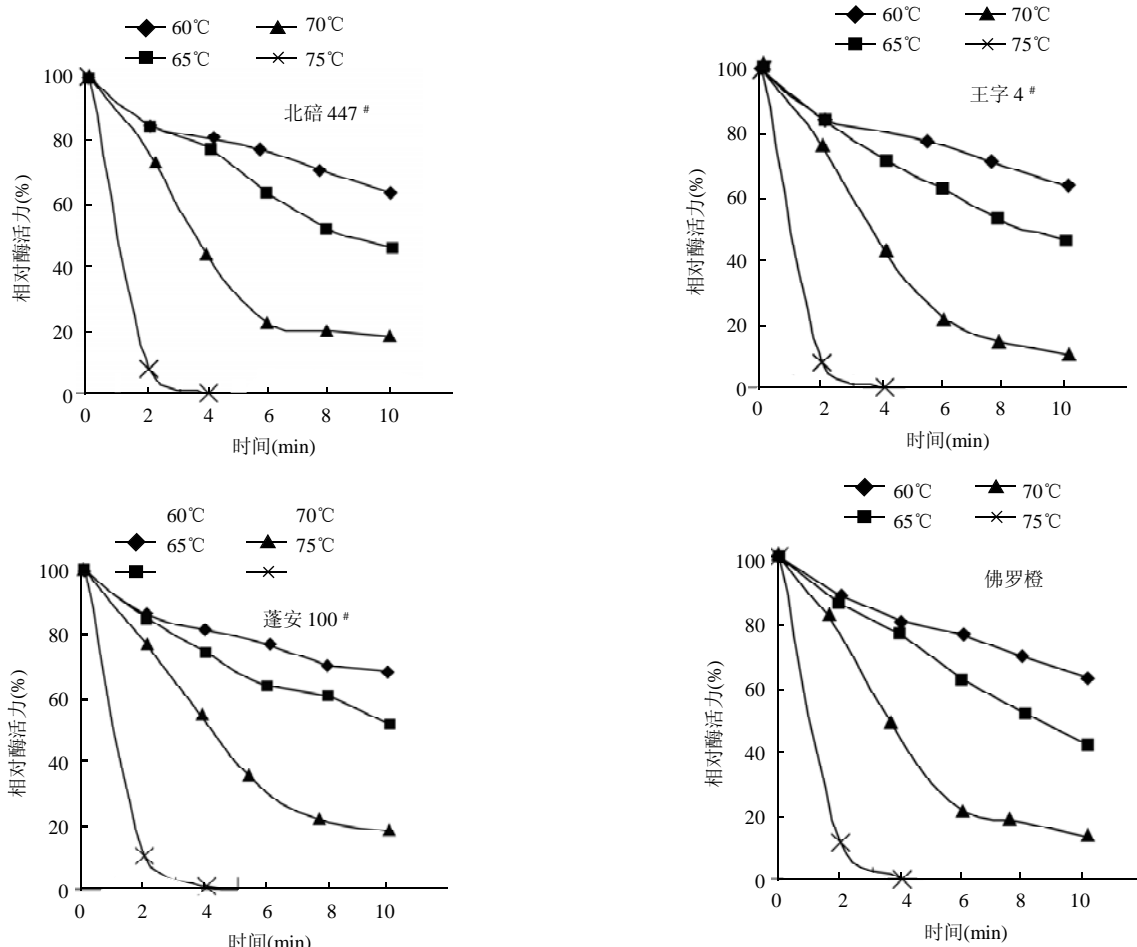


图3 橙类白皮层中POD的热稳定性
Fig.3 Thermal stability of POD activity of orange albedo

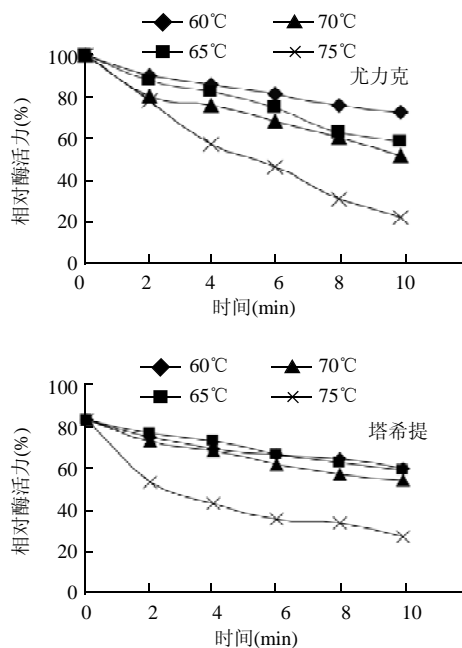


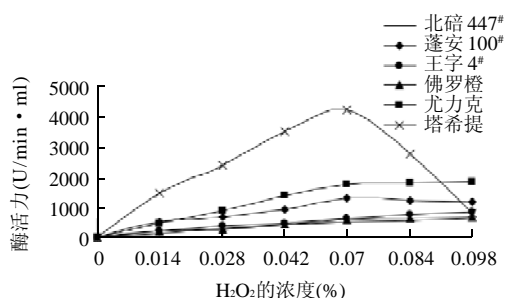
图4 柠檬类白皮层中POD的热稳定性
Fig.4 Thermal stability of POD activity of limon albedo

化酶活的作用。POD 的完全钝化说明热烫过度^[7]。

POD 温度稳定性实验结果见图3、4。橙类白皮层中的POD在75℃的温度下,2min之内的酶活性比初始活性下降了90%,继续保温后几乎都未检测到酶活力;而在60℃下的活力丧失并不严重,10min之后仅下降了30%左右,可以预测如果此时使酶重新处于适宜的温度条件下,酶可以再生。这四种橙类的POD热不稳定性数据极其相似,可以为在有效的条件下钝化酶活性提供依据和参考。

从图4可以看出,柠檬白皮层中POD的热稳定性情况与橙类有较大的差异。在75℃,保温10min后,POD的酶活性仍然残留20%以上,而在其他温度(60、65、70℃)下,酶对温度的敏感性更低,仅比初始活性下降了30%左右。特别是塔希提来檬白皮层中的POD,当温度在65℃以下对其活力没有明显的影响。

2.3 H₂O₂ 浓度对几种柑橘白皮层POD活力的影响

图5 H_2O_2 浓度对几种柑橘白皮层 POD 活力的影响Fig.5 Effects of H_2O_2 concentration on POD activity of citrus albedo

由图5可以明显看出,当 H_2O_2 浓度在0.07%以下,几种柑橘白皮层POD酶活力均随 H_2O_2 浓度的增加而呈直线上升趋势;当 H_2O_2 浓度超过0.07%时,塔希提柠檬白皮层POD活力急速下降,表明了过高浓度的 H_2O_2 可抑制其POD活力;但观察其他几种柑橘果实白皮层的POD在超过0.07%浓度的 H_2O_2 中,没有发现抑制效果。

有研究表明,高浓度的 H_2O_2 可以抑制POD活力,用过氧化氢酶消除过多的 H_2O_2 又能使POD恢复活力,比如辣根POD活力最高时的 H_2O_2 浓度为0.3mmol/L^[8]。郁志芳^[9]等研究鲜切芦蒿中的POD也发现,进一步增加 H_2O_2 浓度时,酶活力继续上升但增量有限,达到饱和状态。可见,不同来源(即使是很相近的品种)的POD特性存在一定的差异。

2.4 抑制剂对塔希提柠檬白皮层 POD 活力的影响

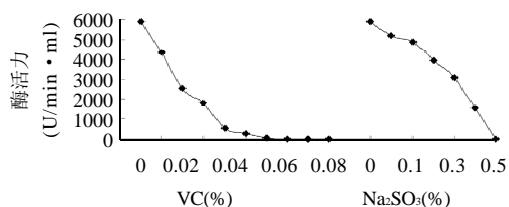


图6 抑制剂对塔希提柠檬白皮层 POD 活力的影响

Fig.6 Effects of VC and Na_2SO_3 concentration on POD activity of Tahiti lemon albedo

由图6可以看出,随着VC浓度的不断增加,其抑制POD活力的效果越明显。当VC浓度达到0.08%时,酶活力被完全抑制。但在VC浓度在0~0.08%之间时,观察一段时间过后酶活力又有恢复的趋势;测定其残余酶活,发现其活力恢复速度较慢,表明VC作为抑制剂在抑制稳定性方面比较好;当VC浓度达到0.2%时,POD活力得到完全抑制,观察3d没有再生现象,表明高浓度的VC会使酶不可逆的失活。

Na_2SO_3 也是公认的最常用的具有良好效果的酶抑制剂。实验结果表明,低浓度(小于0.5%)的 Na_2SO_3 对POD活力的抑制效果没有VC好;当浓度一旦达到并超过0.5%时,酶活力被完全抑制,观察3d没有再生现象。王璋^[2]认为 SO_2 抑制POD活性的机理是它能破坏 H_2O_2 ,对POD活性的抑制效果取决于它与 H_2O_2 的比例,本实验结果也正好说明了这种情况。

VC的抑制效果在很大程度上取决于其浓度大小,而新鲜柑桔汁中本身所含VC的量不足以长时间抑制高含量的POD,且VC在储藏中还会不断损耗,将不利于品质的保持;低浓度的 SO_2 或 Na_2SO_3 对POD的抑制作用是暂时的,当氧供体浓度超过 Na_2SO_3 的浓度时,酶活会再生。如果用 Na_2SO_3 作抑制剂,那么控制鲜榨柑桔汁中氧供体的含量可以有效地延长酶活的再生时间。

3 结论

3.1 在最适条件下,几种柑橘白皮层中的POD活力比较如下:塔希提柠檬>>尤力克柠檬>蓬安100#>北碚447#≈王字4#≈佛罗橙。

3.2 几种柑橘白皮层中POD活力的最适pH均出现在5.0,并且均对酸敏感,在pH达到3.0时酶活基本丧失。除北碚447#白皮层中POD活性的最适温度在40℃外,几种柑橘最适温度在60℃。

3.3 几种柑橘白皮层POD活力最高时的 H_2O_2 浓度均为0.07%,在0~0.07%范围内呈直线上升趋势。塔希提柠檬白皮层POD活力在 H_2O_2 浓度超过0.07%时受到显著的抑制,而其他几种柑橘白皮层POD活力却基本不变。

3.4 当VC浓度为0.1%,可将POD活性完全抑制,并且其活性丧失是不可逆的;当 Na_2SO_3 为0.5%时,即可将POD活性完全抑制,只要氧供体不再增加,酶活力将不会再生。

3.5 对于柠檬汁,其低酸度就可将POD活力完全抑制;而对于橙汁,没有很高的酸度,本身所含VC也不足以长时间抑制POD活性,大量高活POD将会导致其品质的劣变。因此,在果实取汁过程中,把握好热处理的温度和时间,添加适量的抑制剂使酶失活同时又尽可能的保持汁液的品质至关重要。

参考文献:

- [1] BAHCECI K S, SERPEN A, GOKMEN V, et al. Study of lipoxygenase and peroxidase as indicator enzymes in green beans: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage[J]. J of Food Engineering, 2004, 66: 187-192.
- [2] 王璋. 食品酶学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
- [3] HAARD N F. Physiological roles of peroxidase in postharvest fruits and vegetables[M]//ORY R L, St ANGELO A J. Enzymes in food and beverage processing. Washington Amer Chem Soc Symposium Series 47, 1977: 143-71.
- [4] BRUEMMER J H, ROE B, BOWEN E R. Peroxidase reactions and orange juice quality[J]. J of Food Sci, 1976, 41: 186-189.
- [5] V A NEVES. Ionically bound peroxidase from peach fruit[J]. Brazilian Archives of Biology and Tech, 2002, 45: 7-16.
- [6] KATHRYN M, MCLELLAN, ROBINSON D S. Heat stability of peroxidases from orange[J]. Food Chem, 1984, 13: 139-147.
- [7] MORALES-BLANCHAS E F, CHANDIA V E, CISNEROS-ZEVALLOS L. Thermal inactivation kinetics of peroxidase and lipoxygenase from broccoli, green asparagus and carrots[J]. J of Food Sci. 2002, 67: 146-154.
- [8] SATOY, SUGIYAMA M, TAKASHI S, et al. Purification of cationic peroxidases bound ionically to the cell walls from the roots of *Zinnia elegans* [J]. J Plant Res, 1995, 108: 463-468.
- [9] 郁志芳, 陆兆新, 李妍, 等. 鲜切芦蒿过氧化物酶特性的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 29-34.