

石榴多酚氧化酶的某些特性 及其抑制剂的研究

张立华¹, 孙晓飞², 张艳侠¹, 张元湖^{1,*}

(1. 山东农业大学生命科学学院, 山东 泰安 271018; 2. 枣庄技术学院, 山东 枣庄 277102)

摘 要: 针对石榴贮藏过程中易发生果皮褐变的问题, 以分光光度计法研究了石榴果皮中多酚氧化酶(PP0)的某些特性, 考察了柠檬酸、抗坏血酸、亚硫酸钠和 β -环糊精等抗褐变剂对PP0活性的抑制效果。研究结果表明: 石榴皮中多酚氧化酶的最适温度为40℃, 最适pH是7.0, 几种底物中单宁与PP0的亲合力最大, 试验的几种抗褐变剂中柠檬酸对PP0活性有明显的抑制效果, 其次是抗坏血酸, 而亚硫酸钠、 β -环糊精的抑制效果不明显。

关键词: 石榴; 多酚氧化酶; 特性; 抗褐变

Study on Characteristics of PPO and Anti-browning Inhibitors in Pomegranate

ZHANG Li-hua¹, SUN Xiao-fei², ZHANG Yan-xia¹, ZHANG Yuan-hu^{1,*}

(1. College of Life Science, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

2. Zaozhuang Technology College, Zaozhuang 277102, China)

Abstract: Spectrophotometer method was applied in this experiment to study the characteristics of polyphenol oxidase (PPO) in pomegranates. This article also analyzed the effects of citric acid, ascorbic acid, sodium sulfite and β -cyclodextrin on PPO. The results showed that the optimum temperature is 40℃ and the proper pH 7.0. In these circumstances, citric acid can significantly inhibit the activities of PPO, while ascorbic acid is also effective, but sodium sulfite and β -cyclodextrin are less effective. Tannin has the biggest affinity with PPO among three substrates tested.

Key words pomegranate; polyphenol oxidase; characteristics; anti-browning

中图分类号: TS201.25

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)05-0216-04

石榴(*Punica granatum* L.)保鲜贮藏中最常见的问题主要有两个方面, 一是霉菌侵染而引起腐烂, 二是发生生理病变, 前者主要是一些受到机械损伤的果实, 后者主要是一些不良环境条件(冷害、气体失调、热胁迫等)^[7]诱导引起。而生理病变的主要表现是果皮褐变^[2], 并经实验证明属于多酚氧化酶催化的酶促褐变^[1-7]。多酚类物质在有氧气的条件下经多酚氧化酶催化生成发黑的物质。石榴果皮一旦发生酶促褐变会大大地降低其商品价值, 给果农造成巨大经济损失。要控制酶促褐变, 一方面可采用气调法降低氧气浓度以减轻褐变的发生, 另一方面则是采取措施控制PP0活性以抑制石榴皮的酶促褐变。而后者必须是在掌握石榴皮PP0特性的基础上才能更好地进行。对于其他果实PP0的特性及抑制剂的研究已有较多报道, 但目前对石榴PP0特性的研究还少见报道。本实验以枣庄大红袍石榴为材料研究了石榴皮

PP0的某些特性及部分常见抗褐变剂的抑制效果, 以期为解决石榴贮藏中的果皮褐变提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

2004年9月12日在山东枣庄万亩石榴园, 选择充分成熟的红皮甜石榴直接从树上采摘, 经仔细包装后运回实验室, 贮于4℃的冰箱中, 贮存至60d时, 取完好无病的果实作为实验材料。所用试剂均为分析纯, 所用水为蒸馏水。

UV-1601型分光光度计 日本Shimadzu公司; 高速冷冻离心机D-37520 德国; 数显恒温水浴锅HH-4 国华电器有限公司; pH计。

1.2 方法

1.2.1 多酚氧化酶酶液的制备

收稿日期: 2006-06-23

*通讯作者

基金项目: 山东省枣庄市科技攻关计划项目(200542)

作者简介: 张立华(1969-), 男, 副教授, 研究方向为植物次生代谢及分子调控。

参照 Ben-Arie^[1] 等的方法, 并加以改进。称取 0.5g 石榴果皮, 放入予冷的研钵中, 加入少许石英砂, 加入 pH7.0 的磷酸缓冲液(含 1% 的 PVP 和 10mmol/L 的 VC) 5ml, 研磨成匀浆, 抽提后于低温下 4000r/min 离心 20min, 上清液即为粗酶液, 用于研究其特性。以上操作均在 4℃ 以下低温条件下进行。

1.2.2 多酚氧化酶活性测定方法

参照 Coseteng^[6] 速率法, 并加以改进, 在 1cm 光程的比色皿中, 加入 2.95ml 浓度为 0.2mol/L 的儿茶酚, 然后再加入 50μl 粗酶液, 混匀后立即在 410nm 波长下使用 UV-1601 型分光光度计进行酶动力学分析, 测定 0~30s 吸光值的变化。并规定吸光值每分钟增加 0.001 为 1 个酶活力单位(以 unit/min 表示)。

1.2.3 多酚氧化酶最适温度测定

操作同 1.2.2, 使用恒温水浴锅将儿茶酚反应液的温度设置为 10、20、25、30、35、40、45、50、55、60℃ 下反应, 410nm 处测其酶活。以温度为横坐标、酶活性大小(U) 为纵坐标绘制酶活-温度曲线。

1.2.4 多酚氧化酶最适 pH 值测定

用柠檬酸、磷酸缓冲液及氢氧化钠调整反应体系 pH 值, 将 pH 值分别调整为: 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, 在 40℃ 下测定酶活性。以 pH 值为横坐标、酶活性大小为纵坐标绘制酶活-pH 值曲线。

1.2.5 多酚氧化酶 k_m 的测定

分别以儿茶酚、焦性没食子酸、单宁为底物测定 PPO 的 k_m , 根据 Lineweaver-Burk^[8] 双倒数作图法估算其 k_m 值。以儿茶酚为底物时设置的反应浓度梯度为: 0.1、0.15、0.2、0.25mol/L, 焦性没食子酸浓度设置为: 0.15、0.2、0.3、0.4mol/L, 单宁浓度设置为: 0.02、0.04、0.08、0.16mmol/L。

1.2.6 不同抗褐变剂对 PPO 活性的影响

用 pH 值为 7.0 的磷酸缓冲液, 分别加入不同量的柠檬酸、抗坏血酸、亚硫酸钠、β-环糊精, 使溶液的浓度分别为 0%, 0.2%、1%、2%, 再用这些溶液加入儿茶酚, 分别配置成 0.2mol/L 的底物反应液, 按 1.2.2 的方法分别测 PPO 的活性, 比较不同抑制剂对 PPO 活性的抑制程度。

2 结果与分析

2.1 温度对多酚氧化酶的影响

由图 1 可知, 在 40℃ 酶活性最大。在 10~40℃ 之间 PPO 活性随温度升高不断上升, 40℃ 达到最大, 40~60℃ PPO 活性迅速下降, 至 60℃ 时酶活性几乎消失。此结果与阿魏菇 PPO 对温度的反应相似, 只是阿魏菇^[3] PPO 的最适温较高, 为 60℃; 而荔枝皮^[4] PPO 活性对温

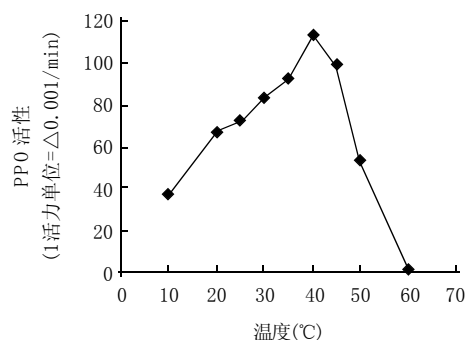


图 1 温度对石榴皮 PPO 活性的影响
Fig.1 Effects of temperature on PPO activity

度变化的反应呈现波动性, 在 20、40℃ 时出现两个波谷, 酶活受到抑制, 25℃ 时酶活性较高, 而 10℃ 低温、50℃ 高温下 PPO 活性更高。温度对酶活性的影响表现双重性, 一方面, 随温度升高酶活性增大, 另一方面, 随温度升高酶蛋白变性也增加, 酶活性降低, 最适温度的大小即这两种作用相平衡的结果。1~5℃ 低温下贮藏的石榴褐变发生率大大降低, 也就是因为 PPO 活性受到抑制; 贮前使用 50℃ 以上高温处理, 也能有效抑制石榴果皮褐变, 是因为高温使其失活。如 Bne-Arie^[1] 等将石榴放于沸水中处理 2min, 会显著抑制石榴褐变的发生。

2.2 pH 值对多酚氧化酶活性的影响

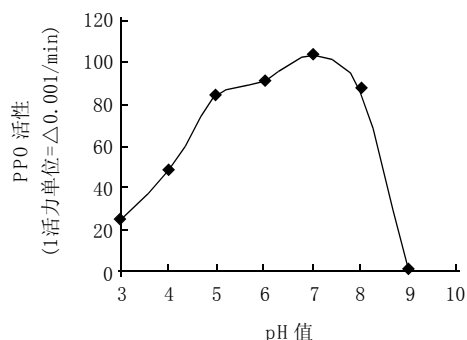


图 2 pH 值大小对石榴皮 PPO 活性的影响
Fig.2 Effects of pH on PPO activity

由图 2 可知, 在 pH 为 7.0 时 PPO 活性出现一个最高峰, 为石榴皮 PPO 的最适 pH 值, 在 pH 为 5.0 时有一个肩峰出现, 可能是同工酶产生的影响, 当 pH 大于 7.0 时 PPO 的活性 pH 的变化反应较为敏感, 随 pH 值升高 PPO 活性迅速降低, 至 pH 为 9.0 时酶活性几乎丧失。而荔枝果皮 PPO^[4] 的活性对 pH 的反应曲线出现两个大波谷, 两者之间出现较大差别的原因可能是不同植物所含 PPO 的特性及同工酶不同引起的。PPO 是一种含铜酶, 在 pH 较低的酸性条件下, PPO 的辅基 Cu^{2+} 被解离出来, 酶活性受到抑制; 在 pH 较高的碱性条件下, PPO 中的 Cu^{2+} 脱离出来成为不溶性的氢氧化铜, 也会使酶失活。

2.3 底物种类和浓度对 PPO 活性的影响

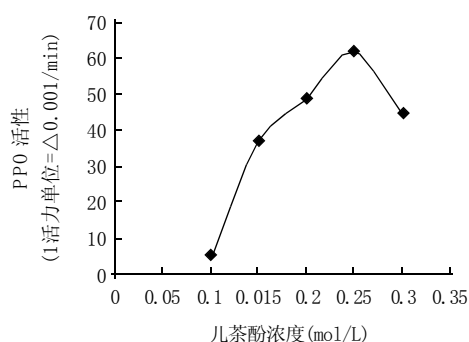


图3 底物(儿茶酚)浓度对石榴皮 PPO 活性的影响

Fig.3 Effects of substrate concentration on PPO activity

由图3可看出,在低浓度时,随底物(儿茶酚)浓度的增加酶活性不断增大,达到最大活性后,在增加底物浓度酶活性反而下降,可能是由于高浓度的底物抑制了酶的活性。分别以儿茶酚、焦性没食子酸、单宁为底物求得其 k_m 值为:0.94、1.66、0.08mmol/L(见图4),由于 k_m 的大小反映底物与酶亲和力得高低, k_m 越小则亲和力越高。因此,所测的三种底物与PPO亲和力高低的顺序为:单宁>儿茶酚>焦性没食子酸。而程建军^[5]等人对梨PPO的试验结果与此不同,其结果是:没食子酸>儿茶酚。本实验中,尤其单宁与PPO的亲和力比另两种高上万倍;另外,石榴皮中可占干重的20%~30%,占鲜重的7%左右^[7],而单宁的含量在褐变后大幅度降低,减少80%左右^[7]。判断某种底物是否为最佳底物的重要依据之一是该物质在褐变前后含量的变化,因此,可初步认为单宁是石榴皮PPO的天然底物。

2.4 不同抗褐变剂对PPO活性的影响

以不加抗褐变剂(对照)所测PPO活性规定为100%,加入不同浓度的抗褐变剂后所测酶活性为残余活性,并分别计算各残余活性与对照的百分比,结果如图5所示。柠檬酸的抑制作用最强,并随浓度增大抑制作用增强,在2%时PPO活性被抑制34.1%,其作用机理是,

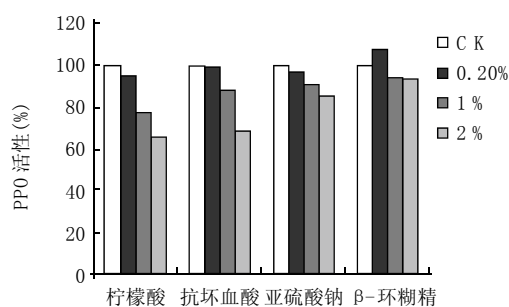


图5 不同抑制剂对PPO活性的抑制效果比较

Fig.5 Effects of browning inhibitors on PPO activity

柠檬酸作为一种较强的有机酸,增加反应体系的酸度,降低pH值,从而偏离了PPO所催化反应的最适宜pH7.0;另一方面,柠檬酸能络合PPO的辅基 Cu^{2+} ,从而抑制PPO活性。也有报道,低浓度的柠檬酸有激活PPO活性的作用^[3],可能是由于不同果实的PPO最适pH不同,加入低浓度柠檬酸后降低pH正适于反应进行,故酶活性提高,而石榴皮PPO的最适pH为7.0,加入低浓度柠檬酸也会偏离最适pH。

其次是抗坏血酸,在低浓度(0.2%)抑制效果甚微,但随浓度增加抑制效果显著提高,2%的抗坏血酸对PPO活性的抑制率可达31.7%。抗坏血酸对PPO的抑制主要依靠它的还原力,一方面,可将 Cu^{2+} 还原为 Cu^{+} ,另一方面,可将氧化生成的醌还原成相应的酸。如可将邻苯二酚的氧化产物邻苯二醌还原成邻二酚。在抗坏血酸发挥作用时会不断被消耗,且不可逆;所以,抗坏血酸对PPO的抑制效果与其浓度关系密切,低浓度时很快被消耗掉,只有在高浓度时抑制效果明显。

亚硫酸钠对石榴皮PPO的抑制效果较差,虽随浓度增加抑制效果增强,但效果不明显,浓度为2%时,其抑制率仅为14.9%。也有相反的报道^[3],亚硫酸钠对阿魏菇PPO有强烈的抑制作用。亚硫酸钠抑制褐变主要是与醌不可逆结合生成无色的加成产物,而对PPO本身的

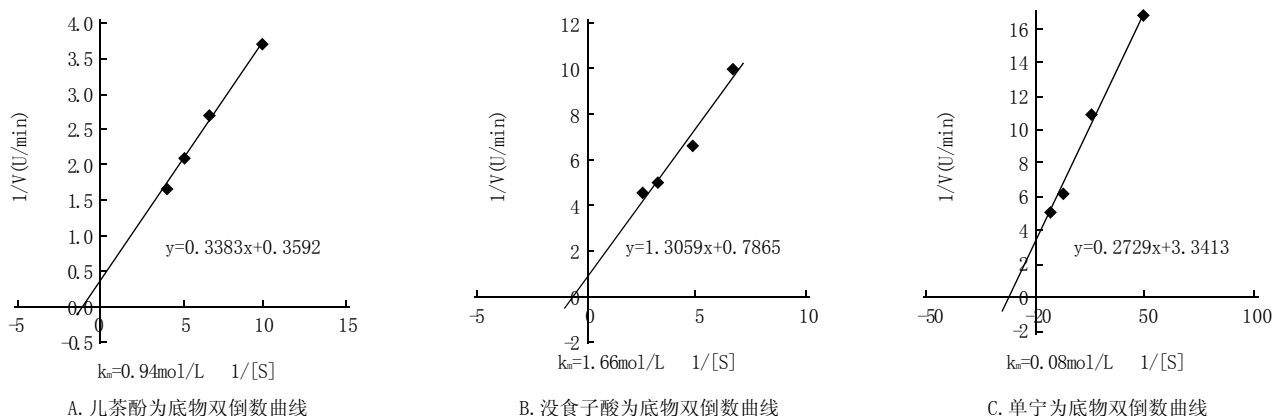


图4 PPO酶促反应双倒数曲线

Fig.4 Double reciprocal plots for PPO from pomegranate peel

原生质体电融合选育米曲霉新菌株的研究

唐洁, 车振明*, 李拴美, 赵旭壮
(西华大学生物工程学院, 四川 成都 610039)

摘要: 本实验对米曲霉 AS3.951 和 CICC2339 的原生质体进行紫外灭活, 然后对灭活双亲用 CRY-3 型细胞电融合仪进行原生质体电融合。通过筛选得到 EF113 和 EF222 两株融合株, 其酶活力分别达到了 7680U/g 和 7200U/g, 远高于酶活低的亲本菌株 AS3.951。

关键词: 米曲霉; 原生质体; 紫外灭活; 电融合

Research on *Aspergillus oryzae* Screening with Protoplast Electro Fusion

TANG Jie, CHE Zhen-ming*, LI Shuan-mei, ZHAO Xu-zhuang
(Bioengineering School, Xihua University, Chengdu 610039, China)

Abstract: This experiment inactivated protoplast of *Aspergillus oryzae* AS3.951 and CICC2339 with ultraviolet. Then the inactivated protoplast were fused with electro fusion. At last, two fused strains are screened namely EF113 and EF 222. Both of them shows high activity reaching 7680U/g and 7200U/g respectively, much higher than parent strain AS3.951.

Key words *Aspergillus oryzae* protoplast; ultraviolet inactivated; electro fusion

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)05-0219-05

收稿日期: 2006-06-01

*通讯作者

作者简介: 唐洁(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。

影响较小。

对 PPO 活性抑制作用最差的是 β -环糊精, 而且在低浓度时(0.2%)PPO 活性反而被激活, 其机理尚不清楚。加大 β -环糊精的浓度虽起到一定的抑制作用, 但抑制率不高, 浓度为 2% 时, 抑制率仅为 6.4%。

本实验与李济权^[4]在荔枝上的研究结果相似, 有机酸对 PPO 活性有较强的抑制效果, 而亚硫酸钠的效果较差。因此, 实践中可考虑使用柠檬酸作为石榴贮存中的抗褐变剂。

3 结论

石榴皮 PPO 的最适反应温度是 40℃, 最适 pH 值为 7.0, PPO 与三种底物亲和合力强弱的顺序是: 单宁 > 儿茶酚 > 焦性没食子酸。单宁可能是石榴皮 PPO 的天然底物。柠檬酸对 PPO 活性的抑制最强, 抑制效果与柠檬酸浓度呈剂量依赖关系, 抗坏血酸作用次之; 亚硫酸钠和 β -环糊精的作用不明显。根据以上结果, 实践中可考虑采用一定浓度的柠檬酸处理石榴, 既直接抑制 PPO 活性, 又可降低 pH 值, 然后贮存于适当的低温条

件下; 也可考虑在贮藏前采用热激处理的办法抑制褐变。当然, 适宜的综合措施有待进一步研究。

参考文献:

- [1] RUTH B A, ESTHER O. The development and control of husk scald on 'wonderful' pomegranate fruit during storage[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1986, 111(3): 395-399.
- [2] ARTES F, TUDELA J A, GIL M I. Improving the keeping quality of pomegranate fruit by intermittent warming[J]. Z Lebensm Unters Forsch A, 1998, 207: 316-321.
- [3] 张桂芝, 杜鹃, 付雪燕. 阿魏菇中多酚氧化酶特性及其抗褐变剂的研究[J]. 新疆农业大学学报, 2004, 27(1): 73-76.
- [4] 李济权. 荔枝保鲜过程中多酚氧化酶活性的抑制研究[J]. 广西民族学院学报: 自然科学版, 2003, 9(4): 29-33.
- [5] 程建军, 王震新, 于静海, 等. 苹果梨和鸭梨酶促褐变机理的研究[J]. 食品科学, 2000, 21(2): 71-74.
- [6] 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.
- [7] 刘兴华, 胡青霞, 冠莉苹, 等. 石榴采后果皮褐变的生化特性研究[J]. 西北林学院学报, 1998, 13(4): 19-22.
- [8] LINEWEAVER H, BURK D. The determination of enzyme dissociation constants[J]. J Am Chem Soc, 1934, 56: 685-688.