

澳洲青苹多酚氧化酶特性的研究

李佩艳¹, 侯玉泽¹, 李松彪¹, 刘建学¹, 仇农学²

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003; 2. 陕西师范大学食品工程系, 陕西 西安 710062)

摘要: 以邻苯二酚为底物, 对澳洲青苹中的多酚氧化酶进行了探讨。分别研究了 pH 值、温度、底物浓度及抑制剂等因素对多酚氧化酶活性的影响, 结果表明: 澳洲青苹多酚氧化酶最适 pH 值为 6.5; 最适温度为 35℃; 90℃处理 3 min, 多酚氧化酶活性基本被抑制; 添加浓度为 125 mg/kg 抗坏血酸或者浓度为 600 mg/kg 的柠檬酸或者浓度为 50 mg/kg 的亚硫酸氢钠后, 多酚氧化酶活性分别为对照的 36%、38% 和 23%。澳洲青苹多酚氧化酶的米氏方程参数为: $K_m=0.137 \text{ mol/L}$, $V_{\max}=0.460 \text{ U/min}$ 。

关键词: 澳洲青苹; 多酚氧化酶; 酶促褐变

中图分类号: S661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2006)09-0093-04

Characteristics of Polyphenol Oxidase in Granny Smith Apple

LI Pei-yan¹, HOU Yu-ze¹, LI Song-biao¹, LIU Jian-xue¹, QIU Nong-xue²

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

2. Food Engineering Department of Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: The optimum pH, optimum temperature, substrate concentration and the inhibitors of polyphenol oxidase from Granny Smith were analyzed with the catechol substrate. The results showed that the optimal pH and temperature were 6.5 and 35℃, respectively. Once the temperature was over 60℃, PPO became inactive quickly. The PPO was almost inactivated at 90℃ for 3 min. PPO's Michaelis-Menten Equation parameters $K_m=0.137 \text{ mol/L}$ and $V_{\max}=0.460 \text{ U/min}$. Adding 125 mg/kg Vc or 600 mg/kg citric acid or 50 mg/kg NaHSO_3 in reaction systems, the activity of PPO decreased to 36%, 38% and 23%, respectively, compared with the check.

Key words: Granny Smith; Polyphenol oxidase; Enzymatic browning

浓缩果汁加工过程中多酚氧化酶(Polyphenol oxidase, PPO, EC 1.10.3.1)能催化苹果中的内源性酚类物质引起酶促褐变^[1], 从而导致苹果汁色值下降, 品质劣变, 营养价值降低。目前, 这已成为影响我国浓缩果汁出口的重大技术难题之一。

我国生产的浓缩果汁由于色值和酸度普遍偏低, 在国际市场上, 丧失了竞争力, 降低了果汁的附加值。有资料表明, 在国际市场上, 浓缩苹果汁酸度每升高 1 度, 每吨售价可提高 100~150 美元。为提高我国浓缩苹果汁的国际市场竞争力, 推动高酸苹果产业的发展, 我国已引进了不少高酸苹果品种进

行试种和推广, 澳洲青苹就是其中之一。它含酸量可达 5.4%~7.0%, 而我国传统生产的苹果酸度最高只能达到 2.0%, 一般仅在 1.0%~1.5%。因此, 澳洲青苹是理想的加工、鲜食兼用绿色品种, 用其制汁可提高浓缩苹果汁的品质。在未来几年内, 澳洲青苹将替代现有榨汁品种, 成为新的苹果浓缩汁原料, 因此, 研究其加工特性, 特别是褐变特性很有必要。目前, 人们已经对富士^[2]、红星^[3]、乔纳金^[4]等苹果中的多酚氧化酶(PPO)进行了研究, 但对于新的高酸苹果品种澳洲青苹中的 PPO 的特性还未见报道。笔者主要以邻苯二酚为底物, 研究澳洲青苹

收稿日期: 2006-03-27

作者简介: 李佩艳(1977-), 女, 河南济源人, 讲师, 在读硕士研究生, 研究方向: 果汁质量控制技术研究。

中 PPO 的特性, 以期为控制澳洲青苹加工过程中的褐变提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

澳洲青苹, 陕西恒兴果汁饮料有限公司提供; 磷酸二氢钾、氢氧化钠、柠檬酸、柠檬酸三钠、邻苯二酚、亚硫酸氢钠、抗坏血酸等均为分析纯。

1.2 试验仪器

电子天平、DS-1 高速组织捣碎机、UNICO2000 可见分光光度计、PHS-4C 酸度计、SIGMA 3K3D 冷冻离心机等。

1.3 试验方法

1.3.1 PPO 的提取方法 称取 20.0 g 苹果, 然后加入一定量的磷酸盐缓冲溶液, 用组织捣碎机捣碎, 之后在 4℃下 10 000 r/min 冷冻离心 20 min, 上清液即为 PPO 酶液。

1.3.2 PPO 活性的测定方法 室温, 在波长为 420 nm 的条件下, 取 1 ml 缓冲液、1 ml 底物(0.1 mol/L 的邻苯二酚)、1 ml 酶液加入比色皿中, 每隔 10 s 记录 1 次吸光值, 总共测定 4 min。以直线段的斜率($\Delta A/t$)计算酶活力, 以每毫升酶液每分钟引起吸光值改变 0.001 为 1 个酶活力单位。

1.3.3 不同 pH 值对 PPO 活性的影响 底物浓度为 0.1 mol/L, 分别配制 pH 值为 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的缓冲液, 测定不同 pH 值缓冲液条件下 PPO 活性。

1.3.4 不同温度对 PPO 活性的影响 底物浓度为 0.1mol/L, 缓冲液 pH 值为 6.5。将酶液、缓冲液以及底物溶液分别在 20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃下保温 10 min 后, 分别测定 PPO 活性。

1.3.5 PPO 热稳定性的测定 底物浓度为 0.1 mol/L, 缓冲液 pH 值为 6.5, 将 PPO 酶液分别在 80℃、85℃、90℃的水浴中处理 30 s、60 s、90 s、120 s、150 s、180 s 后, 立即置于冰水浴中灭酶活性, 分别测定 PPO 的残留活性。

1.3.6 底物浓度与 PPO 活性的关系 在室温下, 取 1 ml pH 值为 6.5 的缓冲液, 分别添加浓度为 0.025 mol/L、0.05 mol/L、0.075 mol/L、0.1 mol/L、0.15 mol/L、0.2 mol/L 的 1 ml 底物(邻苯二酚)溶液, 之后加入 1 ml PPO 酶液于比色皿中, 分别测定 PPO 在不同底物浓度下的活性。

1.3.7 不同抑制剂对 PPO 活性的抑制 分别配制

不同浓度的抗坏血酸(Vc)、柠檬酸、亚硫酸氢钠(NaHSO₃)溶液, 在底物浓度为 0.1 mol/L, 缓冲液 pH 值为 6.5 的条件下, 向反应体系中添加抑制剂, 分别测定不同种类以及不同浓度抑制剂对 PPO 活性的影响, 同时测定不添加抑制剂的 PPO 活性, 作为对照。

2 结果与分析

2.1 不同 pH 值对 PPO 活性的影响

由图 1 可知, 在 pH 值为 3.5~6.5 之间, PPO 活性随着 pH 值的升高而增大; pH 值在 6.5~8.0 之间, PPO 活性随 pH 值的增大而减小。由于 PPO 活性部位含有 His 残基, 其催化基团咪唑基 pH 为 6.0^[5], 在中强酸条件下, 表现较高的酶活性; 但在 pH 低于 2.0 的高酸性环境中, PPO 中的铜离子能被解离出来, 使 PPO 失活; 在碱性条件下, PPO 中的铜离子会解离成氢氧化铜, 使酶活性显著降低。因此, PPO 的最适 pH 值为 6.5。

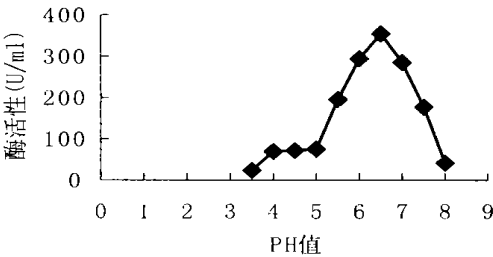


图 1 不同 pH 值对 PPO 活性的影响

2.2 不同温度对 PPO 活性的影响

从图 2 可以看出, PPO 在 20~60℃的温度范围内表现出较高的稳定性。在 35℃的条件下, PPO 的活性最高, 这表明 PPO 是一种较耐热的酶类; 而在 60℃以上的高温条件下, PPO 活性随着温度的升高而迅速下降。65℃的温度下, PPO 活性可由 35℃的 234 U/min 下降到 105 U/min。因此, 可得出 PPO 的最适温度为 35℃。温度对 PPO 的影响起双重作用, 一方面温度升高加快了催化反应的进

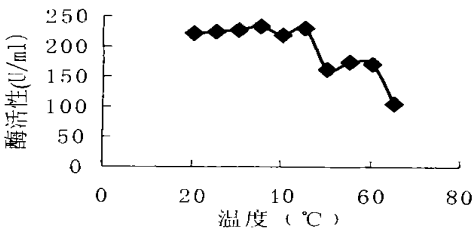


图 2 不同温度对 PPO 活性的影响

行;另一方面,温度升高使蛋白质变性导致酶失活,降低催化反应速度,酶促褐变是这 2 种作用的协同效果。

2.3 PPO 的热稳定性

图 3 结果显示,随着温度的升高,PPO 活性呈逐渐下降趋势;同时随着热处理时间的延长,PPO 活性也呈逐渐下降趋势,且在前 2 min 内 PPO 活性下降速度很快,在第 3 分钟内 PPO 活性下降速度趋于平缓。温度为 90 ℃,处理 3 min 后,酶活性下降为原来的 12%,酶活性基本被抑制,表明高温对 PPO 活性影响显著。

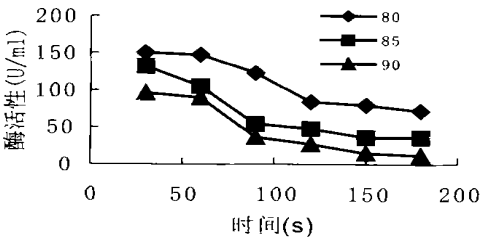


图 3 PPO 的热稳定性

2.4 底物浓度对 PPO 活性的影响

从图 4 中可看出,在底物浓度较低时,反应速度与底物浓度呈正比关系,表现为一级反应。随着底物浓度升高,反应速度不再呈正比例加快,其增加的幅度不断下降,反应速度逐渐趋向于最大反应速度。当底物浓度大于 0.1 mol/L 时,继续加大底物浓度,反应速度基本上不再增加,表现为 0 级反应。说明所有的酶已被底物所饱和。由此可见,底物浓度与 PPO 活性的关系完全遵循米氏方程 (Michaelis—Menten) 的酶动力学性质。

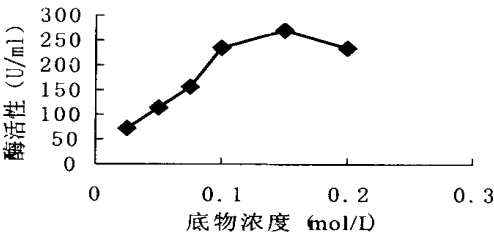


图 4 底物浓度对 PPO 活性的影响

根据米氏方程的双倒数作图法,以 1/V 为纵坐标,1/[S] 为横坐标作图可得一直线,其纵轴的截距为 1/V_{max},横轴的截距为 -1/K_m,直线的斜率为 K_m/V_{max},由直线的拟合方程可求得 K_m 和 V_{max}^[6]。根据图 4,用双倒数作图法可求出澳洲青

苹 PPO 的米氏方程参数 K_m 和 V_{max},见图 5。直线的拟合方程是:

$$Y=0.2977X+2.173 \quad R^2=0.9755$$

由该方程可计算 K_m、V_{max} 值如下:

$$K_m=0.137 \text{ mol/L}; V_{max}=0.460 \text{ U/min.}$$

K_m 值可近似表示酶对底物(邻苯二酚)亲和力的大小;V_{max} 指该酶促反应的最大速度。

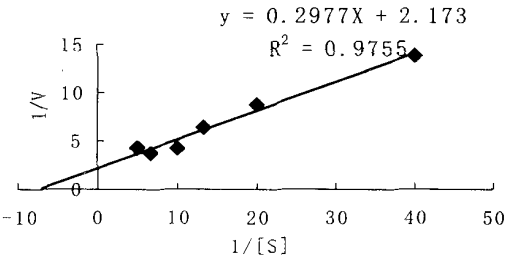


图 5 澳洲青苹 PPO 的米氏方程

2.5 不同抑制剂对 PPO 活性的抑制

2.5.1 不同浓度抗坏血酸对 PPO 活性的抑制 抗坏血酸对 PPO 活性的抑制作用的原理是将酶促反应的中间产物醌还原而抑制褐变的发生。随着抗坏血酸用量的增加,PPO 活性呈下降趋势,在抗坏血酸含量大于 125 mg/kg 时,PPO 活性基本保持不变(图 6),此时 PPO 活性仅为对照的 36%。因此用量为 125 mg/kg 抗坏血酸能有效抑制 PPO 活性。

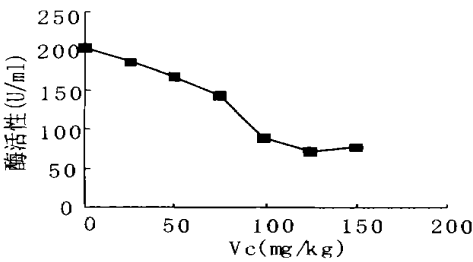


图 6 抗坏血酸对 PPO 的抑制作用

2.5.2 柠檬酸对 PPO 的抑制作用 由图 7 可知,随着柠檬酸用量的增加,PPO 活性呈下降趋势。柠檬酸用量为 500~600 mg/kg 时,PPO 失活速度很快,这是由于柠檬酸的 3 个羧基对 PPO 的铜有较强的螯合作用,随着柠檬酸浓度的增加,它的螯合作用也变大,相应的对 PPO 活性的抑制作用也变大,导致了 PPO 活性的显著降低;此外,由于柠檬酸的酸性对反应体系的 pH 值也有调节作用,使反应体系的 pH 值远离 PPO 最适 pH 值而降低 PPO 活性。超过 600 mg/kg 用量时,PPO 活性降低很小,在 600 mg/kg 时 PPO 活性为对照的 38%。因此,柠檬酸

含量为 600 mg/kg 时,能有效抑制 PPO 活性,防止褐变的效果最好。

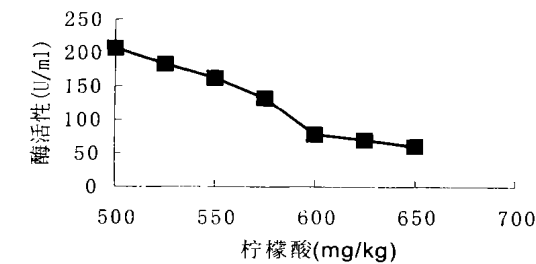


图 7 柠檬酸对 PPO 的抑制作用

2.5.3 亚硫酸氢钠对 PPO 活性的影响 图 8 结果表明,在 0 ~ 50 mg/kg 的用量范围内,随着亚硫酸氢钠在反应液中浓度的增加,酶活性显著下降;超过 50 mg/kg, PPO 活性变化不大;亚硫酸氢钠浓度为 50 mg/kg 时 PPO 活性为对照的 23%。因此,浓度为 50 mg/kg 亚硫酸氢钠能有效抑制 PPO 活性,防止褐变。但在实际应用中要考虑 Na⁺ 超标问题。

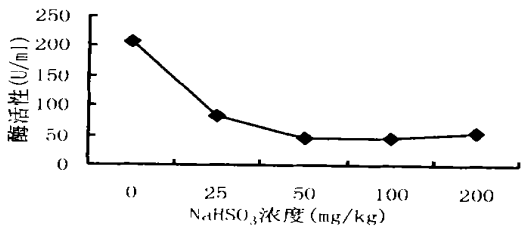


图 8 亚硫酸氢钠对 PPO 活性的影响

3 结论

1) 以邻苯二酚为底物,澳洲青苹 PPO 的最适

pH 值为 6.5; PPO 最适温度为 35 ℃; 90 ℃处理 3 min后,酶活性下降为原来的 12%,酶活性基本被抑制。

2) 在以邻苯二酚为底物, pH 为 6.5 的条件下,可得出澳洲青苹 PPO 米氏方程的参数: Km=0.137 mol/L, Vmax=0.460U/min。

3) 抗坏血酸、柠檬酸、亚硫酸氢钠均为 PPO 的有效抑制剂。添加浓度为 125 mg/kg 抗坏血酸或者浓度为 600 mg/kg 的柠檬酸或者浓度为 50 mg/kg亚硫酸氢钠后,苹果中的 PPO 活性分别为对照的 36%, 38%和 23%。

参考文献:

[1] Billard C, Maraschin G, Nicolas J. Inhibition of polyphenoloxidase from apple by malliard reaction productd prepared from glucose or fructose with L- cysteine under various conditions of pH and temperature[J] . Lebensm - Wiss u- Technol, 2004, 37: 69- 78.

[2] 于佳,袁翠美,马文秀,等.富士苹果多酚氧化酶特性研究[J] .中国野生植物资源,1999,18(4):13-16.

[3] 仲飞.红星苹果多酚氧化酶某些特性及其抑制剂的研究[J] .园艺学报,1998,25(2):184-186.

[4] Rocha A M C N, Morais A M M B. Characterization of polyphenoloxidase(PPO) extracted from ‘ Jonagored’ apple[J] . Food Control, 2001, 12: 85-90.

[5] 姜绍通,罗志刚,潘丽军.甘薯中多酚氧化酶活性的测定及褐变控制[J] .食品科学,2001,22(3):19-22.

[6] 杨建雄.生物化学与分子生物学实验技术教程[M] .北京:科学出版社,2002.

2007 年《华北农学报》征订启事

《华北农学报》于 1986 年创刊,由北京、天津、河北、山西、河南、内蒙古六省市区农科院和农学会联合主办的大农业学术刊物。本刊立足华北,面向全国和全世界。主要刊载农业各学科的学术论文、研究报告以及科研简报,报道农业学术动态。主要服务于农业高等院校师生和农业科研机构的研究人员。加强农业学术交流,推动农业科技进步。

本刊是中国科学引文数据库核心期刊,全国综合性农业核心期刊,中国自然科学核心期刊。曾荣获全国优秀科技期刊三等奖、全国农口学会优秀期刊奖、华北优秀科技期刊奖、北方优秀科技期刊奖和河北省优秀期刊奖。

《华北农学报》国内外公开发行,国内统一刊号:CN13-1101/S,国际标准刊号:ISSN1000-7091,邮发代号 18-10。双月 28 日出版,大 16 开,136 页,每期定价 5.00 元,全年 30.00 元。全国各地邮局均可订阅,邮失可补,可随时汇款到编辑部订阅。欢迎订阅、欢迎投稿。

通信地址:石家庄市和平西路 598 号《华北农学报》编辑部
联系人:孙丽敏、胡景辉
邮编:050051 电话:0311-87652166
E-mail: hbnxb@163.com 或 hbnxb@sohu.com