

铁棍山药 PPO 的最适底物、热稳定性及褐变控制研究

刘莹¹, 赵喜亭^{1,2*}, 赵月丽¹, 鲁梦娇¹, 成淑君¹, 赵雪蕾¹, 李明军¹, 刘亚丽¹

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007;

2. 河南省高校道地中药材保育及利用工程技术研究中心, 河南 新乡 453007)

摘要: 研究了铁棍山药多酚氧化酶(PPO)的最适底物、热稳定性及不同抑制剂对其活性的影响。结果表明: 在试验范围内, 铁棍山药 PPO 最适底物为邻苯二酚; 在较低温度(20~40℃)下其 PPO 能保持较稳定的活性, 较高温度(40~80℃)下其活性快速下降, 80℃下保温 10min, PPO 活性几乎为零; 抑制剂对 PPO 活性的抑制效果依次为: L-抗坏血酸> L-半胱氨酸盐酸盐> 植酸> 柠檬酸。

关键词: 铁棍山药; 多酚氧化酶; 热稳定性; 褐变

中图分类号: TS255.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2010)12-0095-04

Studies on the Best Substrate, the Thermal Stability of Polyphenol Oxidase and the Browning Control in *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun

LIU Ying¹, ZHAO Xi-ting^{1,2*}, ZHAO Yue-li¹, LU Meng-jiao¹, CHENG Shu-jun¹,
ZHAO Xue-lei¹, LI Ming-jun¹, LIU Ya-li¹

(1. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Genuine Chinese Crude Drugs of Henan Province University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: The best substrate, the thermal stability of polyphenol oxidase (PPO) from *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun and the effects of inhibitor on its activity were studied in this paper. The results showed that: The best substrate of PPO from *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun was catechol in the range of this experiment; the activity of PPO was more stable under the lower temperature (20—40℃), while, it's activity declined rapidly under the higher temperature (40—80℃) and was inhibited almost completely when incubated for 10 min under 80℃; the order of inhibition effect from strong to weak was: L-ascorbic acid, L-cysteine hydrochloride, phytic acid, citric acid.

Key words: *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun; Polyphenol oxidase; Thermal stability; Browning

铁棍山药(*Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun)是怀山药的优良品种之一。其药食兼优, 为滋补佳品, 深受人们喜爱, 享有“滋补药中的上品”、“大棒人参”之美誉。

目前, 铁棍山药饮片的加工是一种防止块茎腐烂变质、延长贮藏期、提高其产品附加值的有效途径, 但其鲜切片的褐变严重影响着饮片的品质、外观和消费者的购买欲。研究发现, 鲜切片褐变主要是

收稿日期: 2010-07-10

基金项目: 河南师范大学博士启动基金项目(051007); 河南师范大学大学生创新性实验计划项目(2008421)

作者简介: 赵喜亭(1971-), 女, 河南洛阳人, 副教授, 博士, 主要从事植物生理和植物生物技术的教学和科研工作。

由于山药中的多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)将酚类底物氧化成有色物质醌所导致^[1]。有关山药 PPO 及其褐变控制的研究已有报道,2003 年,郁志芳等^[2]、彭贵霞等^[3]对江苏徐州菜山药的研究表明,鲜切山药在贮藏过程中 PPO 活性和酚含量显著相关,化学抑制剂以亚硫酸钠的抑制作用最为显著。2005 年,李晓莉等^[4]研究表明,化学抑制剂柠檬酸、苹果酸、L-抗坏血酸对北京市场山药的 PPO 活性均有抑制作用,L-抗坏血酸抑制作用最为明显。自 2006 年以来,对铁棍山药鲜切褐变的问题进行了一系列研究,结果表明:PPO、POD 和 PAL 的活性与铁棍山药褐变度呈正相关,其相关性依次为 PPO> POD> PAL^[5],筛选的无硫护色剂(0.25%柠檬酸+0.1%植酸+0.25%氯化钙)显著抑制其 PPO 活性上升,能明显抑制鲜切铁棍山药片褐变,其 PPO 的最适 pH 为 6.0,最适反应温度为 35℃,与邻苯二酚具有极强的亲和力^[6]。但有关 PPO 对高温的耐受力以及其最适底物尚不清楚,另外更佳的抑制剂类型尚需进一步研究,故本研究对以上问题进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 供试材料及处理

铁棍山药由温县农科所提供。挑选大小一致、粗细均匀、无创伤、无病虫害的块茎为试验材料,用清水洗净表面泥土自然晾干后,去皮切分成 2 mm 左右的薄片,进行以下试验。单片样品,重复 3 次。

1.2 方法

PPO 活性测定:采用文献[6]的方法提取粗酶液,用于 PPO 活性测定。1 个酶活性单位(U)定义为测定条件下每 30 s 引起吸光值增加 0.001 所需的酶量。

1.2.1 不同底物对 PPO 活性的影响 分别配制 0.005~0.090 mol/L 的邻苯二酚(儿茶酚)、没食子酸、L-酪氨酸、愈创木酚作为 PPO 的底物,测定不同底物、不同浓度条件下铁棍山药 PPO 的活性。

1.2.2 不同温度对 PPO 活性的影响 将粗酶液置于不同温度(20、30、40、60、80℃)下分别处理 0、5、10、20、30 min,测定 PPO 活性。

1.2.3 不同抑制剂对 PPO 活性的影响 选用柠檬酸、L-半胱氨酸盐酸盐、植酸、L-抗坏血酸、氯化钠和 EDTA-2Na 作为抑制剂,用 PPO 的缓冲液配制成含不同质量分数抑制剂的缓冲液,在相应条件下测定 PPO 活性。

2 结果与分析

2.1 不同底物对铁棍山药 PPO 活性的影响

图 1 表明,以邻苯二酚为底物时,铁棍山药 PPO 活性远高于以其他酚类物质为底物时的活性:邻苯二酚浓度在 0.005~0.040 mol/L 时,随着底物浓度的增大 PPO 活性迅速上升,在 0.04~0.07 mol/L 时,PPO 活性上升缓慢,当底物浓度大于 0.07 mol/L 时,酶活性不再上升;以 L-酪氨酸为底物时,PPO 活性变化趋势与前者相似,但幅度远远低于前者;以没食子酸和愈创木酚为底物时,PPO 活性很低,随其浓度增大活性几乎没有显著变化。

底物浓度对 PPO 活性的影响,实际上部分反映了底物与 PPO 的亲和力。根据 Lineweaver-Burk 方程 $1/V=K_m/V_{max}\{1/[S]\}+1/V_{max}$,利用双倒数作图法,分别计算出铁棍山药 PPO 对不同酚类底物的米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max} ,结果见表 1。

由于 K_m 值的大小反映了酶与底物亲和力的大小, K_m 值越小,酶与底物的亲和力越大,而且通常认为具有最小 K_m 的底物是“天然的”最适底物。由表 1 可知,邻苯二酚与 PPO 的亲和力最强,其次是 L-酪氨酸,没食子酸和愈创木酚对 PPO 的亲和力很低。因此,在试验范围内,铁棍山药 PPO 的最适底物为邻苯二酚,且与邻苯二酚反应得到的 V_{max} 最大。

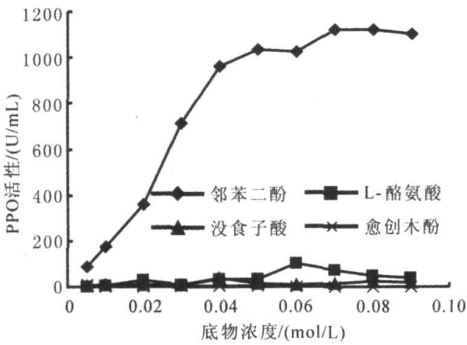


图 1 不同浓度的酚类物质底物对铁棍山药 PPO 活性的影响

表 1 不同酚类物质对铁棍山药 PPO 的 K_m 和 V_{max} 值

项目	底物			
	邻苯二酚	没食子酸	L-酪氨酸	愈创木酚
$K_m/(mol/L)$	0.0125	0.10101	0.024887	0.026743
$V_{max}/(\Delta A/(mL \cdot min))$	1.25	0.10101	0.022624	0.003005

2.2 不同温度对铁棍山药 PPO 活性的影响

由图 2 可知,铁棍山药 PPO 活性在 20℃下保温 5 min 略微下降,在 30℃下保温 5 min 略微升高,但变

化均不明显(相邻量测量值之间无显著差异, $P>0.05$), 之后, 随保温时间延长, 30℃下保持较高活性基本不变, 20℃下活性较低, 呈波动变化。在 40℃下保温 5min, 其活性略微升高, 之后下降, 保温 10min 后其活性快速下降。60℃下保温 5min, 其活性略微下降, 之后快速下降, 且快速下降的幅度较 40℃下的明显增大。80℃下保温 5min, 其活性就急剧下降, 保温 10min PPO 活性几乎为零。以上分析表明, 铁棍山药 PPO 在较低温度(20~40℃)下能保持较稳定的活性, 较高温度(40~80℃)使其活性快速下降。

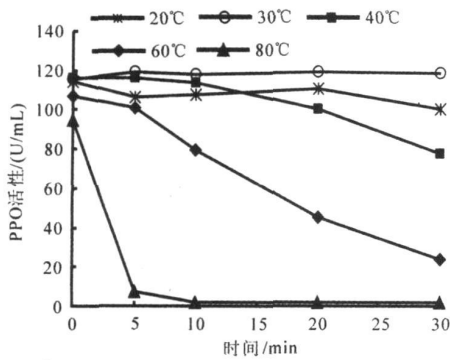


图2 不同温度对铁棍山药 PPO 活性的影响

2.3 不同抑制剂对铁棍山药 PPO 活性的影响

从图 3 可以看出, 对铁棍山药 PPO 抑制作用最强的是 L-抗坏血酸, 极低质量分数(0.25%)就能完全抑制其活性; 其次是 L-半胱氨酸盐酸盐, 当质量分数为 2% 时完全抑制其活性; 再次是柠檬酸和植酸, 二者对 PPO 活性的抑制作用随质量分数增加而增强, 相比较而言, 在较低质量分数($<0.5\%$)下植酸的抑制效果要略微大于柠檬酸的; 而 EDTA-2Na 和氯化钠对 PPO 活性的抑制作用不明显。由此可知, L-抗坏血酸、L-半胱氨酸盐酸盐、植酸和柠檬酸均能较好地控制铁棍山药鲜切片的褐变, 尤以 L-抗坏血酸的效果最佳。这说明运用抑制剂能够达到有效抑制铁棍山药褐变的目的。

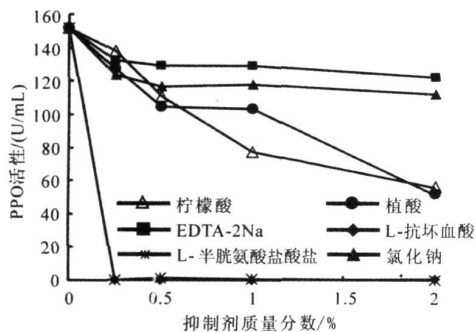


图3 不同抑制剂对铁棍山药 PPO 活性的影响

3 讨论

PPO 是一类广泛存在于植物体内的能催化多酚类氧化成醌类的酶^[7-10]。鲜切山药褐变一般与自身酶活性变化有密切关系。有研究认为, 鲜切山药褐变主要是由于 PPO 引起的酶促褐变造成的^[2], 铁棍山药鲜切片在贮藏过程中, 随着时间的延长, PPO 活性升高, 切片表面白度逐渐下降, 趋于褐变^[6]。所以大多从抑制 PPO 活性方面来寻找抑制山药褐变的方法^[2, 3, 17-20]。

研究表明, 不同植物 PPO 对酚底物的亲和力存在差异。芋艿和新疆无核白葡萄 PPO 对儿茶酚(邻苯二酚)的亲和力最强^[11, 12]; 石榴 PPO 对单宁的亲和力最大^[13]; 绿原酸、儿茶素是苹果 PPO 的良好褐变底物^[14, 15]; 没食子酸是莲藕 PPO 的最适酚类底物^[16]。本研究结果表明, 铁棍山药 PPO 与不同酚类物质的亲和力从大到小依次为: 邻苯二酚(儿茶酚)、L-酪氨酸、没食子酸、愈创木酚, 且邻苯二酚(儿茶酚)亲和力远远大于后三者。因此, 为了控制铁棍山药的褐变, 应采取措施减少其块茎中邻苯二酚的含量。

研究表明, 不同植物的 PPO 对高温的耐受能力不同。石榴 PPO 在 60℃下 0.5 min 活性几乎消失^[17], 大蒜 PPO 在 80℃下 1.5 min 可失活^[18], 芋艿 PPO 在 80℃下 7 min 完全变性^[12], 菊芋 PPO 在 90℃下 2 min 可完全钝化^[19], 番石榴 PPO 在 90℃下 5 min 基本失活^[20], 罗田甜柿的 PPO 在 95℃时加热 2.5 min 才完全失活, 而温度为 90℃时需要加热 3 min 才失活^[21]。本研究结果显示, 铁棍山药 PPO 在较低温度(20~40℃)下能保持较稳定的活性, 较高温度(40~80℃)使其活性快速下降, 80℃下保温 10min PPO 活性几乎为零。另外研究也表明, 铁棍山药 PPO 在 20~40℃下酶活性较高, 这与 PPO 最适温度为 35℃的结果基本相符^[6], 进一步说明为了控制铁棍山药的褐变, 应避免 35℃进行贮藏和鲜切加工。

研究表明, 抑制剂能很好地抑制植物 PPO 的活性, 从而达到防止褐变的目的。NaHSO₃、柠檬酸、EDTA-2Na 和抗坏血酸对甘薯 PPO 均有不同程度的抑制效果, NaHSO₃ 的效果最佳^[22]。半胱氨酸和柠檬酸能很好地抑制荔枝 PPO 活性, 控制荔枝的褐变^[23]。抗坏血酸和柠檬酸能很好地抑制土豆的 PPO 活性, 延长最小加工土豆的寿命^[24]。而本试验中不同抑制剂对铁棍山药 PPO 活性的影响表明:

L-抗坏血酸、L-半胱氨酸盐酸盐、植酸对 PPO 的抑制作用极为明显, 柠檬酸对 PPO 有明显抑制作用, 而 EDTA-2Na 和氯化钠对 PPO 的抑制作用均不明显。为了控制铁棍山药的褐变, 在鲜切加工时, 可选用 L-抗坏血酸、L-半胱氨酸盐酸盐、植酸及柠檬酸作为护色剂。

综合以上内容可知, 为了控制铁棍山药的褐变, 在贮藏和加工过程中应从抑制 PPO 活性方面采取措施, 如低温($10\sim 20^{\circ}\text{C}$)贮藏, 或低温贮藏前短时间高温处理, 或利用抑制剂对其切片进行护色处理。

参考文献:

- [1] 顾林, 鲁茂林, 姜军, 等. 山药多酚氧化酶酶学特性及褐变控制研究[J]. 食品与机械, 2006, 22(6): 26-29.
- [2] 郁志芳, 彭贵霞, 夏志华, 等. 鲜切山药酶促褐变机理的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(5): 44-49.
- [3] 彭贵霞, 郁志芳, 夏志华, 等. 鲜切山药片生产工艺技术的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(2): 66-69.
- [4] 李晓莉, 沈金玉, 黄家音. 山药多酚氧化酶特性研究[J]. 精细化工, 2005, 22(7): 527-529.
- [5] 赵喜亭, 王会珍, 赵月丽, 等. 铁棍山药褐变特性研究[J]. 河南农业科学, 2009(7): 94-97.
- [6] 赵喜亭, 王会珍, 李明军, 等. 无硫护色剂对鲜切铁棍山药片酶促褐变的影响及其 PPO 特性研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(2): 125-128.
- [7] 赵喜亭, 王会珍, 李明军. 铁棍山药片护色工艺与无硫护色剂的筛选[J]. 河南农业科学, 2009(1): 81-85.
- [8] 黄明, 彭世清. 植物多酚氧化酶研究进展[J]. 广西师范大学学报: 自然科学版, 1998, 16(2): 65-70.
- [9] Alfred M, Eitan H. Polyphenol oxidase in plants[J]. Phytochemistry, 1979, 18: 193-215.
- [10] 胡瑞波, 田纪春. 小麦多酚氧化酶研究进展[J]. 麦类作物学报, 2004, 24(1): 81-85.
- [11] 王佳宏, 郁志芳, 杜传来. 芋艿褐变底物及多酚氧化酶特性研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(2): 141-145.
- [12] 吴继红, 蔡同一. 新疆无核白葡萄多酚氧化酶特性的研究[J]. 食品工业科技, 2003, 24(4): 35-37.
- [13] 何瑛, 张有林. 石榴果皮酶促褐变底物的研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(10): 111-114.
- [14] Awad M A, de Jager A. Flavonoid and chlorogenic acid concentrations in skin of 'Jonagold' and 'Elstar' apples during and after regular and ultra low oxygen storage[J]. Postharvest Biology and Technology, 2000, 20(1): 15-24.
- [15] 乜兰春, 孙建设, 辛蓓, 等. 苹果果实酶促褐变底物及多酚氧化酶活性的研究[J]. 园艺学报, 2004, 31(4): 502-504.
- [16] 王清章, 彭光华, 金悠, 等. 莲藕中酚类物质的提取分析及酶促褐变底物的研究[J]. 分析科学学报, 2004, 20(1): 38-40.
- [17] 张立华, 孙晓飞, 张艳侠, 等. 石榴多酚氧化酶的某些特性及其抑制剂的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(5): 216-219.
- [18] 连毅, 桥旭光, 李燕, 等. 大蒜多酚氧化酶特性的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 290-293.
- [19] 胡建锋, 邱树毅, 胡秀沂, 等. 菊芋多酚氧化酶的酶学特性研究[J]. 食品科技, 2007(9): 22-25.
- [20] 李粉岭, 蔡汉权, 江海涛, 等. 番石榴果肉的酶促褐变及其抑制措施[J]. 食品工业科技, 2008, 29(2): 149-151.
- [21] 周坚, 万楚筠, 沈汪洋. 甜柿多酚氧化酶特性的研究及褐变控制[J]. 食品科学, 2005, 26(1): 60-63.
- [22] 郁志芳, 夏志华, 陆兆新. 鲜切甘薯酶促褐变机理的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(5): 54-59.
- [23] Jiang Y M, Jiarui F D. Inhibition of polyphenol oxidase and the browning control of litchi fruit by glutathione and citric acid[J]. Food Chemistry, 1998, 62(1): 49-52.
- [24] Limbo S, Piergiovanni L. Shelf life of minimally processed potatoes Part I. Effects of high oxygen partial pressures in combination with ascorbic and citric acids on enzymatic browning[J]. Postharvest Biology and Technology, 2006, 39: 254-264.