影响鲜切马铃薯褐变相关酶及底物的研究

程丽林[1,2]，张长峰[2]，王庆国[1]
（1.山东农业大学食品科学学院,山东泰安 271018）
（2.山东省农产品贮运保鲜技术重点实验室，山东济南 250103）

摘要：本文通过对克新 4 号和克新 13 号马铃薯鲜切贮藏期间，褐变相关酶活性、相关底物的比较研究，探讨鲜切马铃薯褐变机理。结果表明：鲜切后 1 h，克新 4 号即出现轻微褐变，4 h 后褐变明显，而克新 13 号鲜切后 12 h 仍具有较好颜色，2 d 后出现轻微褐变。两个品种马铃薯汁液颜色在初始时比较接近，而 25 min 后汁液颜色差异明显，克新 4 号褐变程度明显重于克新 13 号。褐变重的马铃薯，PPO 活性高。切割后贮藏期间，克新 4 号 PPO 活性始终高于克新 13 号。克新 4 号酪氨酸酶活性高于克新 13 号，POD 活性始终低于克新 13 号，两个品种的 PAL 活性差异不显著（p<0.05）。褐变相关的主要底物可能是原儿茶酸，不是绿原酸。机械伤害增加了膜脂过氧化作用，导致了丙二醛含量的升高。

关键词：鲜切；马铃薯；褐变相关酶；褐变底物
文章篇号：1673-9078(2017)1-106-111 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.1.017

Study on the Browning-related Enzymes and Substrates of Fresh-cut Potatoes

CHENG Li-lin[1,2], ZHANG Chang-feng[2], WANG Qing-guo[1]
(1.College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)
(2.Shandong Key Laboratory of Storage and Transportation Preservation Technology of Agricultural Products, Jinan 250103, China)

Abstract: This study compared the browning-related enzyme activity and substrates of freshly-cut Kexin No. 4 and Kexin No. 13 potatoes during storage, and discussed their browning mechanisms. The results showed that Kexin No. 4 potatoes exhibited slight browning 1 h after cutting and obvious browning after 4 h, while Kexin No. 13 potatoes retained good color 12 h after cutting and browned slightly after 2 d. The color of the juice from the two species was similar initially, but differed significantly after 25 min, with Kexin No. 4 juice being significantly browner than that of Kexin No. 13. Kexin No. 4 potatoes showed high polyphenol oxidase (PPO) activity. During storage after cutting the PPO activity of Kexin No. 4 potatoes was consistently higher than that of Kexin No. 13 potatoes. Additionally, the tyrosinase activity of Kexin No. 4 potatoes was always higher than that of Kexin No. 13 potatoes, and the peroxidase (POD) activity of Kexin No. 4 potatoes was lower than that of Kexin No. 13 potatoes. The phenylalnine ammonialyase (PAL) activities of both did not differ significantly (p<0.05). Protocatechuic acid, and not chlorogenic acid, may be the enzymatic browning substrates because mechanical damage, produced by cutting, can lead to enhanced peroxidation of membrane lipids resulting in increased malondialdehyde (MDA) content after cutting.

Key words: fresh-cut; potato; browning enzymes; browning substrate

马铃薯是仅次于小麦、水稻和玉米的世界第四大主要粮食作物。马铃薯既是粮食又是蔬菜，其块茎含有丰富的淀粉、人体所需的必需氨基酸、矿物质、维生素和膳食纤维等营养物质，是一种集粮食和蔬菜等多重特点于一身的优良作物马铃薯[1]。不仅具有食用价值还具有药用价值，可以治疗胃病，其含有的抗菌成分可有效预防胃溃疡发生。

随着人们生活节奏的加快，鲜切果蔬得到了快速发展。鲜切果蔬依其新鲜、天然、方便、无公害以及可利用度高（100%可食用）购买后可直接烹饪或食用等特点，受到消费者的一度喜爱。我国是世界马铃薯生产大国，马铃薯种植面积近 7000 万亩，年产量约 6000 万 t，其中 60%用于深加工。2001 年，中国直接从美国进口冷冻马铃薯条比 1999 年增长了 10 倍。我

收稿日期：2016-02-16
基金项目：山东省自然科学基金资助项目（ZR2013CM012）；山东省科技发展计划（2014GNC113008）；农产品品控物流关键技术装备研发与应用（2014zzcx02701）
作者简介：程丽林（1987-），女，硕士，研究方向：采后生理及技术
通讯作者：王庆国（1965-），男，教授，研究方向：采后生理及技术

国有 90%的马铃薯用于鲜食，鲜切马铃薯产品市场需求量巨大。但马铃薯在加工过程中，由于受到机械损伤，鲜切后在空气中产生一些不良的生理反应，如褐变和脱水等，严重影响了商品的价值，对加工制品的感官特性具有不利影响，生成的类黑色高聚物难溶于水，不宜被人体消化吸收，严重者对产品的安全性造成威胁。马铃薯加工过程中发生褐变的程度也会因品种的不同而发生变化，不同品种的马铃薯褐变强度不同，马铃薯品种因素对褐变强度具有重要影响[2]。

本文以克新 4 号和克新 13 号(两个品种均由黑龙江省农科院克山马铃薯研究所培育而成)为研究材料，通过比较两种马铃薯鲜切后低温贮藏条件下多酚氧化酶（PPO）活性、酪氨酸酶活性、过氧化物酶（POD）活性、苯丙氨酸解氨酶（PAL）活性、酚类物质含量和丙二醛（MDA）含量等指标的变化规律，探讨了鲜切马铃薯褐变相关酶及底物与褐变的关系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

马铃薯均由黑龙江省克山研究院提供，品种是克新 13 号和克新 4 号，运回后放置 3~4 ℃的冷库中贮存，选取大小接近，单个重约 150 g，无病虫害、无机械伤的马铃薯为实验材料。

1.2 主要仪器与设备

美国 Waters e 2695 高效液相色谱仪；日本 MDF-U53V 超低温冰箱；北京普析通用 T6 新世纪分光光度计；HG-15D 组织捣碎机；梅特勒-托仪多 EL204-IC 电子天平；Germany D-78532 高速冷冻离心机；柯尼卡美能达 CR-400 色差仪。

1.3 试验方法

马铃薯采收后，各选取品质良好的马铃薯 30 个，自来水清洗干净去皮后，进行切片处理，依据品质的变化情况选择取样点，取样点选为 0、1/24、2/24、4/24、12/24、2、5、8、11 和 14 d，用液氮冻存取样后，放置超低温冰箱中（-80 ℃）保存，以完成各项指标的测定。本研究比较了两种马铃薯鲜切后低温贮藏条件下多酚氧化酶（PPO）活性、酪氨酸酶活性、过氧化物酶（POD）活性、苯丙氨酸解氨酶（PAL）活性、绿原酸含量、原儿茶酸含量、总酚含量和丙二醛（MDA）含量的变化规律。

1.4 指标测定

1.4.1 感官测定

马铃薯鲜切后，低温条件下贮藏，克新 4 号和克新 13 号外观品质及汁液的对比情况。采用 Canon EOS 550D 相机进行拍照记录。

1.4.2 多酚氧化酶活力测定

参考马玉荣[3]的方法，稍有改动。称取 0.4 g 交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)于离心管中，再称取 2 g 样品于试管中，每支试管中加入 18 mL 磷酸缓冲溶液（0.1 mol/L、pH 6.8），匀浆，低温离心 20 min（10000 r/min、4 ℃），所得上清液即为 PPO 粗酶液。

酶活性的测定：测定管中加入 2.5 mL 缓冲溶液、0.5 mL、0.02 mol/L 邻苯二酚、0.2 mL 酶液，对照管加入 2.7 mL 缓冲溶液、0.5 mL、0.02 mol/L 邻苯二酚，不加酶液，摇匀，于 410 nm 下测定吸光度值。（每 10 s 记录一次，共记录 3 min）样品重复测定 3 次。以最初直线部分的斜率计算酶活力，一个活力单位（U）定义为在测定条件下 1 min 引起吸光度值改变 0.01 所需的酶量。

1.4.3 酪氨酸酶活性的测定

参考曾亮等[4]的方法。酪氨酸酶液的提取：称取去皮切碎马铃薯 2 g，按 1:5(*m/V*)的比例加入 10 mL 磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L、pH 6.8)，匀浆，低温离心 10 min（10000 r/min、4 ℃），上清溶液保存于冰浴或冰箱中，2 h 内用完。

酶活性的测定：测定管加入 1 mL、2 mmol/L 的 L-多巴溶液、1.5 mL 磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L、pH 6.8)，充分混匀，30 ℃水浴中温育 10 min 后，加入 0.5 mL 酶提液，充分混匀，在 475 nm 波长下测定吸光度度值（OD）。开始前 6 min，每隔 30 s 测定记录一次，以后每隔 1 min 测定记录一次。依据直线斜率即可得到酶活力。

1.4.4 过氧化物酶活性测定

参考史树得等[5]的方法。酶液制备：取研磨碎样品 2 g 置于试管中，每支试管中加入 18 mL 磷酸缓冲溶液（0.1 mol/L、pH 6.0）匀浆，低温离心 20 min（10000 r/min、4 ℃），上清液即为粗酶液。反应液制备：取 50 mL 磷酸缓冲液（0.1 mol/L、pH 6.0）于锥形瓶中，加入 28 μL 愈创木酚，电炉上加热溶解，再加入 19 μL 30%过氧化氢，置于 4 ℃冰箱中备用。

酶活性的测定：测定管中加入 3 mL 反应液、200 μL 酶液。对照加入 3 mL 反应液、200 μL 磷酸缓冲液，摇匀，于 470 nm 下测定吸光度值。（每 10 s 记录一次，共记录 2 min）样品重复测定 3 次。活性计算：以每分钟内吸光值变化 0.01 为一个酶活力单位。

1.4.5 苯丙氨酸解氨酶活性的测定

采用 Ke 等[6]的方法测定，并有所改进。酶液制备：称取 0.4 g 交联聚乙烯聚吡咯烷酮（PVPP）及 4 g 切碎的样品（去皮）于试管中，每支试管中加入 16 mL 的 pH 8.5 的硼酸缓冲液（含有 0.4 μL/mL 的巯基乙醇），匀浆，低温离心 10 min（10000 r/min、4 ℃），上清液即为粗酶液。

酶活性的测定：测定管中加入 2 mL 缓冲液，2 mL 0.02 mol/L 的 L-苯丙氨酸，0.2 mL 酶液，对照加入 2.2 mL 缓冲液，2 mL、0.02 mol/L 的 L-苯丙氨酸，不加酶液，摇匀，40 ℃恒温水浴保温 60 min，立即取出加入 0.5 mL、0.6 mol/L 盐酸终止反应，冷却后于 290 nm 测定吸光值，样品重复测 3 次。

1.4.6 酚类物质含量的测定

参考 Zhou 等[7]的方法，并有所改进。酚类物质的提取：取冷冻果肉粉末 0.2 g 加入 0.8 mL 的甲醇（80%甲醇，含 1%甲酸）溶液，4 ℃冰箱中过夜，混合物于 30 ℃超声提取 30 min 后离心，得一次浸提液，剩余残渣用 0.5 mL、80%的甲醇重新提取。合并两次浸提液，进样前用 0.45 μm 的滤膜过滤。

色谱条件：色谱柱为反相 C18 柱（150 mm×4.6 mm，5 μm）；柱温：40 ℃；流动相 A：1%的甲酸水溶液；流动相 B：100%甲醇；进样量：10 μL；荧光检测条件：绿原酸检测波长：326 nm，原儿茶酸检测波长：280 nm；流速：0.8 mL/min；流动相梯度洗脱条件：0~5 min 10%流动相 B；5~15 min 线性渐变为 20%；15~30 min 线性渐变为 40%；30~35 min 线性渐变为 50%，35~45 min 线性渐变为 80%；45~55 min 线性渐变为 10%；60 min 停止。

标准液的制备：标准液溶剂为 80%的甲醇（含 1%甲酸），进样前，所有溶液都通过 0.45 μm 的微孔滤膜过滤并进行脱气处理。

1.4.7 丙二醛含量的测定

参考王豫颖[8]的方法，取 1 g 马铃薯，加入 10 mL 10%三氯乙酸（TCA），充分混匀，均浆，低温离心 20 min（10000 r/min、4 ℃）。取上清液 4 mL，加入 4 mL 0.6%硫代巴比妥酸（TBA，溶于 10%的三氯乙酸），充分混匀，沸水浴 15 min。然后迅速冷却反应液，低温离心 10 min（10000 r/min、4 ℃）并取上清液。在 532 nm，600 nm 波长下分别测定吸光度值（OD），按公式计算 MDA 含量：

$$MDA\ 含量=(OD_{532}-OD_{600})\times A\times(V/a)/(消化系数\times W)$$

式中 A 为反应液体积；V 是提取液体积；a 为测定提取液的体积（mL）；W 是材料鲜重(g)。MDA 的摩尔消光系数为 155 L/mmol，MDA 的含量以 nmol/g 表示。

1.4.8 数据分析

每个试验指标重复 3 次，实验数据用 SPSS 13.0 统计软件进行 LSD 显著性分析，显著性 $p<0.05$，所有结果用 SPSS 13.0 做图。

2 结果与分析

2.1 外观及汁液的对比

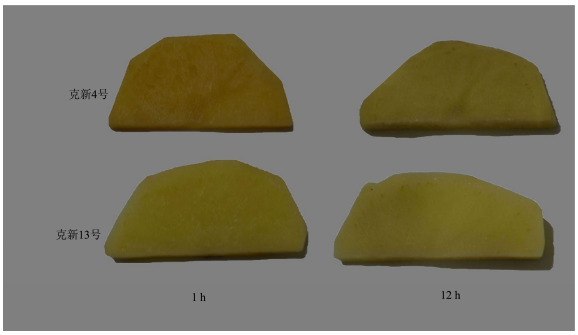


图 1 鲜切后外观品质的对比

Fig.1 Comparison of exterior quality of fresh- cut Potatoes

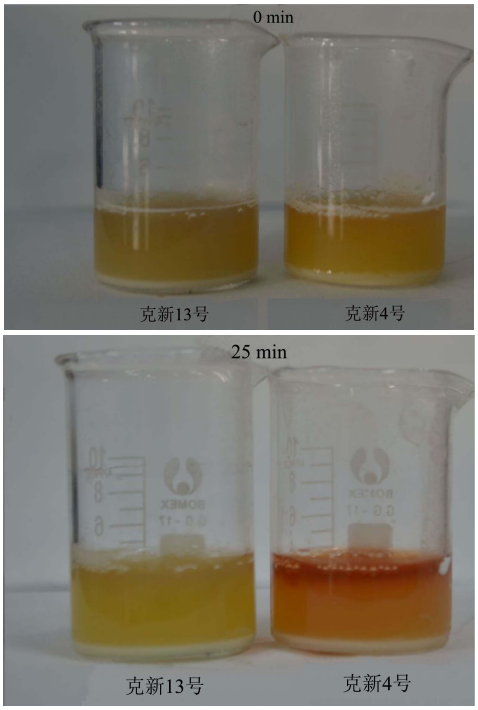


图 2 鲜切后汁液颜色的对比

Fig.2 Comparison of juice color prepared by fresh-cut potatoes

从图 1 可看出，马铃薯鲜切 1 h 后，克新 4 号就发生了褐变，克新 13 号还保持很好的品质特征。鲜切 12 h 后，克新 4 号褐变更加严重，克新 13 号开始有轻微褐变，褐变差异明显。从图 2 中可看出，两者的汁液颜色在 0 min 时无差异，25 min 后汁液颜色差异十分明显，克新 4 号汁液颜色呈深褐色，而克新 13 号无明显变化呈黄色。

2.2 多酚氧化酶的活力变化

从图 3 可看出，鲜切马铃薯 PPO 活力呈现下降趋势，前 4 h 内，PPO 活力变化不大，4 h 后，PPO 活力逐渐下降。随着贮藏时间的延长，两种不同品种的马铃薯多酚氧化酶活力变化基本一致。马铃薯鲜切后，克新 4 号褐变速度始终高于克新 13 号，克新 4 号 PPO 活力始终高于克新 13 号，说明马铃薯中 PPO 活性越高，褐变速度越快，PPO 活性越低，褐变速度越慢。

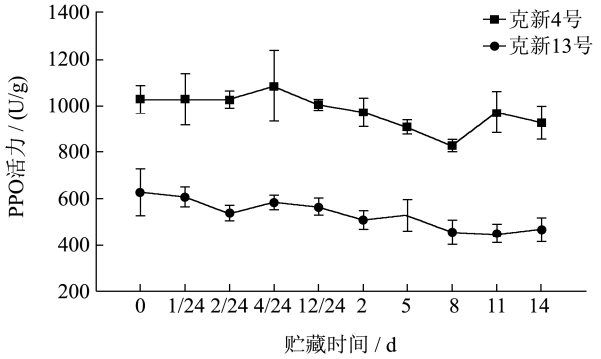


图 3 PPO 活力随贮藏时间的变化

Fig.3 Changes in polyphenol oxidase (PPO) activity with storage time

2.3 酪氨酸酶活力的变化

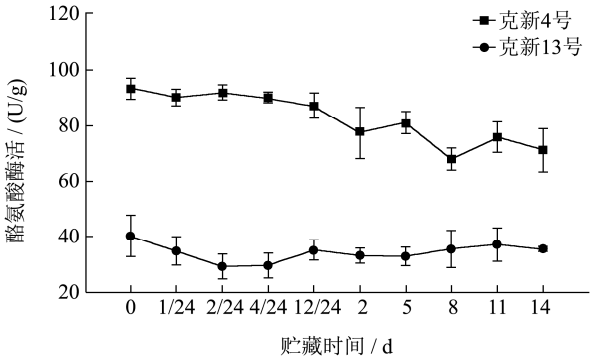


图 4 酪氨酸酶活力随贮藏时间的变化

Fig.4 Changes in tyrosinase activity with storage time

酪氨酸酶是一种含铜的金属酶，普遍存在于哺乳动物、植物和微生物中，主要参与生物体内黑色素和其他多酚类物质的形成。该酶能催化单酚类物质生成 *σ*-二酚（单酚酶活性），并进一步转化为 *σ*-醌（二酚酶活性），生成的这些醌类物质易于多聚化与细胞内蛋白作用，生成黑色或棕色的色素沉淀。许多学者[9,10]研究了酪氨酸的性质，试图通过控制酪氨酸酶活性来抑制褐变的发生。马铃薯块茎中富含酪氨酸酶，从图 4 可看出，克新 4 号酪氨酸酶活性逐渐降低，克新 13 号酪氨酸酶先降低后逐渐升高，但变化不大。在贮藏过程中，克新 4 号酪氨酸酶活性始终高于克新 13 号，克新 4 号褐变情况比克新 13 号严重，说明酪氨酸活性越高，褐变越严重。

2.4 过氧化物酶活力变化

过氧化物酶(POD)是植物在逆境条件下酶促防御系统的关键酶之一，它和超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）都是植物体内存在的能够清除自由基的细胞膜保护酶[11]。

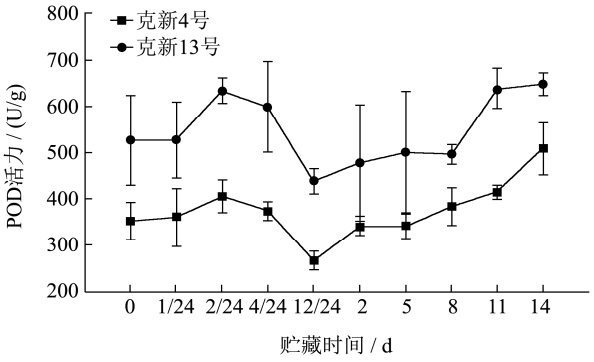


图 5 POD 活力随贮藏时间的变化

Fig.5 Changes in peroxidase activity with storage time

从图 5 可看出，马铃薯鲜切后 POD 活力呈先上升后下降再上升的趋势，鲜切后 2 h 内 POD 活性呈上升趋势，之后又开始下降，12 h 时下降到最低点，从第 2 d 起 POD 活性开始上升。

在整个贮藏过程中，两种不同品种的马铃薯过氧化物酶活力变化趋势一致，且克新 4 号马铃薯 POD 活力始终低于克新 13 号。机械损伤破坏了自由基代谢的平衡而使果实中的 POD 等活性升高，POD 活性的上升是植物抵抗逆境的一种生理反应。

2.5 苯丙氨酸解氨酶活力的变化

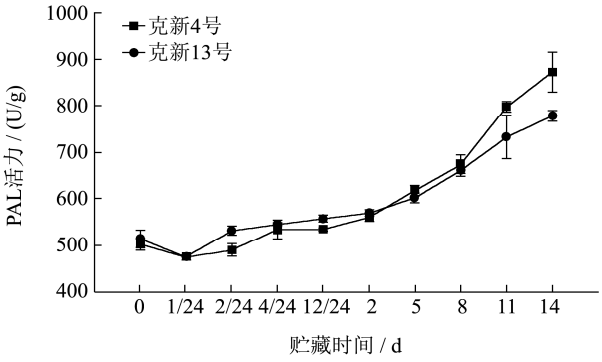


图 6 PAL 活力随贮藏时间的变化

Fig.6 Changes in phenylalanine ammonia lyase activity with storage time

苯丙氨酸解氨酶（PAL）是苯丙烷类物质代谢途径中重要的酶，与果蔬中酚类物质的合成和积累密切相关[12]。从图 6 可看出，在整个贮藏过程中，随着时间的延长，两种不同品种马铃薯苯丙氨酸解氨酶的活性逐渐升高，且变化趋势一致，无显著差异。2 d 内，

克新 13 号 PAL 活性大于克新 4 号，后期贮藏过程中，克新 13 号 PAL 活性略低于克新 4 号。马铃薯受到机械损伤后，PAL 活性上升，这与李正国等[13]研究结果一致。PAL 活性的上升以产生较多的次生代谢物来减轻伤害，从而减少了营养物质的消耗，有利于伤口愈合。

2.6 酚类物质含量变化

酚类物质在植物体内种类繁多、含量丰富，是果蔬酶促褐变的重要底物。不同种类和不同组织的果蔬参与酶促褐变的酚类物质却有很大的差异[14,15]。本研究采用高效液相色谱法测定了酚类物质的含量，图 7 和 8 分别为 0 h 时绿原酸和原儿茶酸含量测定的色谱图。

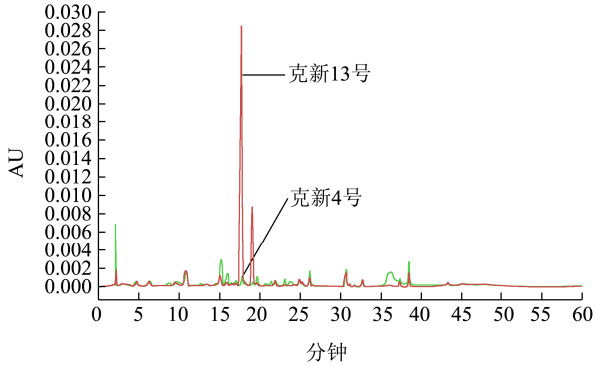


图 7 绿原酸含量测定的 HPLC 色谱图

Fig.7 HPLC chromatogram of chlorogenic acid

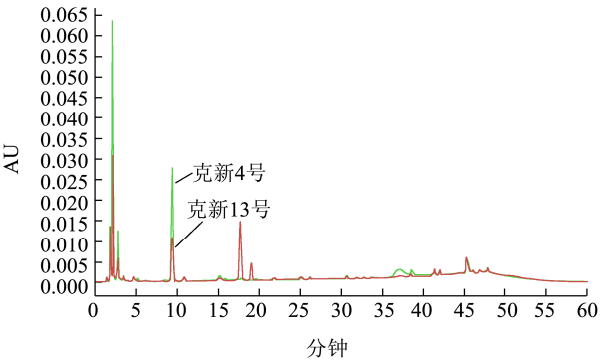


图 8 原儿茶酸含量测定的 HPLC 色谱图

Fig.8 HPLC chromatogram of protocatechuic acid

从图 9 可看出，0~12 h 内，克新 4 号的绿原酸含量为 0，克新 13 号的绿原酸含量变化不大。从第 2 d 起，两者绿原酸含量逐渐上升，且克新 4 号绿原酸含量始终低于克新 13 号。马铃薯切片在贮藏过程中，克新 4 号的褐变程度一直高于克新 13 号。0 h 时，克新 4 号绿原酸含量为 0，说明发生酶促反应的酚类底物不是绿原酸。

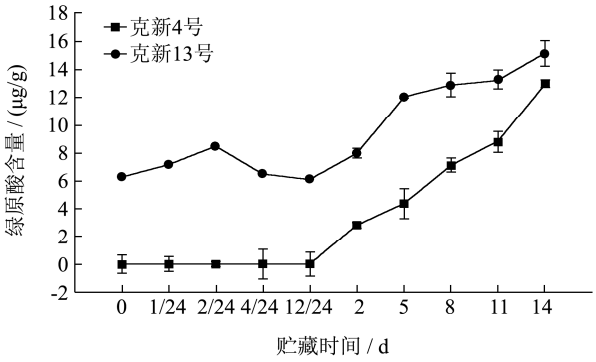


图 9 绿原酸含量随贮藏时间的变化

Fig.9 Changes in chlorogenic acid content with storage time

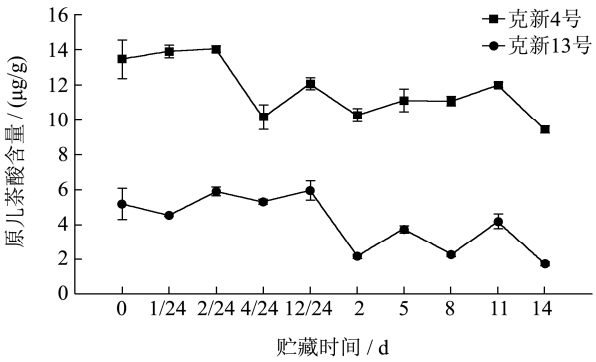


图 10 原儿茶酸含量随贮藏时间的变化

Fig.10 Changes in protocatechuic acid content with storage time

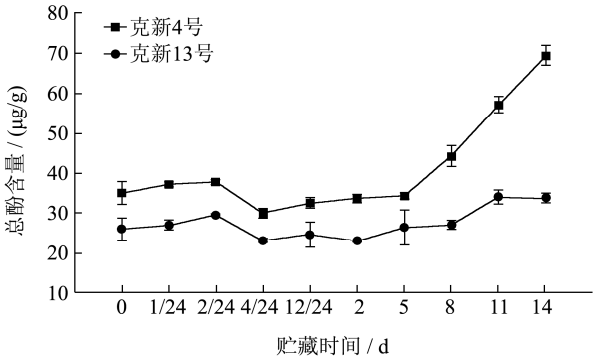


图 11 总酚含量随贮藏时间的变化

Fig.11 Changes in total phenolic content with storage time

从图 10 可看出，0~12 h 内，两种不同品种的马铃薯中原儿茶酸含量变化不大，克新 4 号原儿茶酸的含量始终高于克新 13 号，且都呈现逐渐下降的趋势，说明在褐变反应中，原儿茶酸作为褐变底物参与了反应。

在总酚含量测定中，2 h 时都呈现下降趋势，此时鲜切马铃薯褐变速度最快，说明酚酶利用了酚类物质参与了酶促褐变反应。4 h 后总酚含量逐渐升高，可能是后期褐变速度减慢，底物消耗减慢，总酚积累量

升高导致的。贮藏期间，两种不同品种的马铃薯总酚含量变化趋势一致，克新 4 号总酚含量始终高于克新 13 号。总酚含量的变化趋势和 PAL 活性的变化趋势基本一致，主要原因是机械损伤诱发的主要次生代谢物质如各种酚类等主要通过苯丙烷类代谢途径生成，其中 PAL 是苯丙烷类代谢途径中的关键酶和限速酶。

2.7 丙二醛含量变化

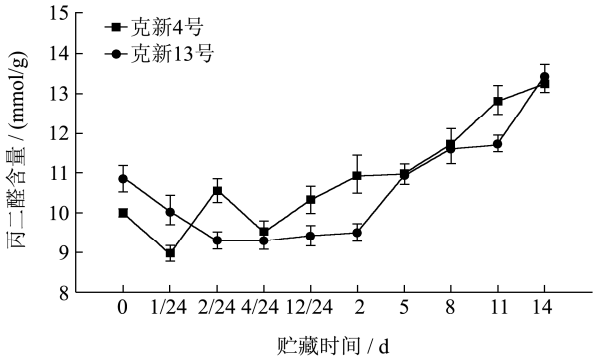


图 12 丙二醛含量随贮藏时间的变化

Fig.12 Changes in malonaldehyde content with storage time

丙二醛（MDA）是膜脂过氧化的主要产物，它的积累能对细胞膜造成进一步的伤害，加速果蔬褐变。从图 12 可看出，鲜切马铃薯贮藏过程中，丙二醛含量逐渐升高。2 h 后，克新 13 丙二醛含量始终低于克新 4 号，说明克新 4 号膜脂过氧化作用大于克新 13 号，但两者含量上相差不大。马铃薯鲜切造成的机械伤害大大破坏了植物细胞结构，使得膜脂过氧化作用加剧，丙二醛含量上升。

3 结论

3.1 克新 4 号马铃薯，鲜切 1 h 后就发生了褐变，克新 13 号鲜切 12 h 后才开始发生褐变。两种不同品种的马铃薯汁液颜色进行对比，25 min 后，两者之间有明显差异。

3.2 PPO 活力越高，褐变速度越快，褐变越严重。酪氨酸活性越高，褐变越严重。POD 活性越高，褐变速度越慢，褐变程度较轻。鲜切后贮藏过程中，PAL 活力呈上升趋势。

3.3 酚类物质含量与 PAL 活性变化相一致，绿原酸不是酶促褐变底物，原儿茶酸可能作为褐变底物参与了酶促褐变反应。机械伤害造成丙二醛含量上升。

参考文献

[1] 刘进杰,王淑芳,卜庆梅,等.壳聚糖涂膜对鲜切马铃薯褐变程度的影响[J].食品科技,2007,32(5):255-258
LIU Jin-jie, WANG Shu-fang, BU Qing-mei, et al. Effect of chitosan film on the browning degree of fresh-cut potato [J]. Food Science and Technology, 2007, 32(5): 255-258

[2] 赵萍,王莉,蒲育林,等.不同品种马铃薯在不同生长期褐变的规律研究[J].食品工业科技,2010,31(11):101-104
ZHAO Ping, WANG Li, PU Yu-lin, et al. Study on the law of different varieties of potato's browning in different growing period [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(11): 101-104

[3] 马玉荣.鲜切马铃薯褐变控制技术研究[D].泰安:山东农业大学,2010
MA Yu-rong. Study on inhibition of enzymatic browning of fresh-cut potato [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2010

[4] 曾亮,吴靓靓,官兴丽.儿茶素对马铃薯酪氨酸的抑制作用[J].食品科学,2010,31(23):310-313
ZENG Liang, WU Jing-jing, GUAN Xing-li. Inhibitory effect of catechins on potato tyrosinase [J]. Food Science, 2010, 31(23): 310-313

[5] 史树得,孙亚卿,魏磊.植物生理学实验指导[M].北京:中国林业出版社,2010
SHI Shu-de, SUN Ya-qing, WEI Lei. Plant physiology experiment instruction [M]. Beijing: China Forestry Publishing, 2010

[6] Ke D, Saltveit M E. Effects of calcium and auxin on russet spotting and phenylalanine ammonia-lyase activity in iceberg lettuce [J]. HortScience, 1986, 5: 1169-1171

[7] Zhou L L, Zeng H N, Shi M Z, et al. Development of tobacco callus cultures over expressing arabidopsis PAP1/MYB75 transcription factor and characterization of anthocyanin biosynthesis [J]. Planta, 2008, 229(1): 37-51

[8] 王豫颖.外源水杨酸和转录因子 RIN 对番茄果实成熟的调控机制[D].北京:中国科学院研究生院,2011
WANG Yu-ying. Regulation of tomato fruit ripening by exogenous salicylic acid and transcriptional factor RIN [D]. Beijing: Chinese Academy of Sciences, 2011

[9] WANG Ning-fang. Measurement and study of tyrosinase activity in potato [J]. Agricultural Science & Technology, 2011, 12(6): 799-800, 804

[10] 李好样,李永耀,韩红斐.苹果中酪氨酸酶的提取及其催化活性研究[J].太原师范学院学报(自然科学版),2008,7(4):102-104
LI Hao-yang, LI Yong-yao, HAN Hong-fei. The extraction and the study of activity of tyrosinase from apple [J]. Journal of Taiyuan Normal University: Natural Science Edition, 2008, 7(4): 102-104

（下转第 118 页）