

白萝卜多酚氧化酶的酶学特性研究

华颖, 沈国华, 刘大群

(浙江省农业科学院食品科学研究所, 浙江省果蔬保鲜与加工技术研究重点实验室, 浙江杭州 310021)

摘要: 白萝卜作为我国第二大蔬菜。其贮运和加工过程中的褐变多以酶促褐变为主, 全面系统地了解白萝卜多酚氧化酶(PPO)的酶学特性, 并研究其抑制手段, 对提升白萝卜及其制品的品质和商业价值有着重要的意义。本文以新鲜白萝卜为原材料, 采用丙酮洗涤、0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液匀浆法从中提取 PPO, 考察了 pH、温度对酶活的影响, 分析了其温度稳定性、底物浓度对 PPO 活性的影响, 探讨了过程的反应动力学, 并对多种酶抑制剂对 PPO 活性的影响进行了比较, 为控制加工过程中白萝卜的酶促褐变提供了理论依据。试验结果表明: 以邻苯二酚为底物, 该酶的最适 pH 值为 6.0, 最适反应温度为 40 °C, K_m 和 V_{max} 值分别为 53.8 mmol/L 和 588 U/min。90 °C 热处理 2.5 min 或 85 °C 热处理 3.5 min 可基本完全钝化其活性, Vc、异 Vc 和 L-cys 对 PPO 酶活的抑制较为明显。

关键词: 白萝卜; 多酚氧化酶; 酶学特性

文章编号: 1673-9078(2014)1-69-73

Characterization of Polyphenol Oxidase Extracted from White Radish

HUA Ying, SHEN Guo-hua, LIU Da-qun

(Institute of Food Science, Zhejiang Academy of Agricultural Science, Key Laboratory of Fruits and Vegetables Postharvest and Processing Technology Research of Zhejiang Province, Hangzhou 310021, China)

Abstract: As the second major vegetables in China, the mainly browning of white radish during its storage and processing was enzymatic browning. A comprehensive and systematic understanding of polyphenol oxidase (PPO) in white radish and its suppression means is of great significance to promote quality and commercial value of white radish and its products. In this study, the fresh white radish was taken as the material, the PPO was extracted and characterized. The results showed that, with catechol as substrate, the optimum pH and reaction temperature of the enzyme were 6.0 and 40 °C, respectively. K_m and V_{max} were 53.8 mmol/L and 588 U/min, respectively. The enzyme activity was completely inactivated by heating at 90 °C for 2.5 min or 85 °C for 3.5 min, and ascorbic acid, isoascorbic acid as well as L-cys had obvious inhibition effects on the PPO enzyme activity.

Key words: white radish; polyphenol oxidase; enzymatic characterization

萝卜是中国第二大蔬菜, 富含葡萄糖、胡萝卜素、淀粉等人体所需营养成分, 至今种植已有千年历史, 如今我国已经成为世界上第一大萝卜生产国^[1]。现代研究认为, 白萝卜含芥子油、淀粉酶和粗纤维, 具有促进消化, 增强食欲, 加快胃肠蠕动和止咳化痰的作用, 对强心、降压、抗癌治癌、抗过敏等都有良好的功效; 中医理论也认为其味辛甘, 性凉, 入肺胃经, 为食疗佳品, 可以治疗或辅助治疗多种疾病, 本草纲目称之为“蔬中最有利者”。所以, 白萝卜在饮食和中医食疗领域具有广泛应用, 是深受民众喜爱的大众保健蔬菜的代表之一。

在我国, 萝卜种植面积大, 产量高, 以萝卜为原

收稿日期: 2013-08-22

基金项目: 浙江省重点科技创新团队项目(2010R50032)

作者简介: 华颖(1980-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为食品科学与技术

通讯作者: 沈国华(1954-), 男, 研究员, 研究方向为果蔬深加工

料, 进行深加工并开发多种类型萝卜食品, 潜力巨大。

但是, 白萝卜在贮运尤其是加工过程中容易变色, 从而会影响其营养品质和外观品质, 导致商品价值的损失, 研究认为, 浅色蔬菜的褐变以酶促褐变为主, 与美拉德反应和焦糖化反应关系不大^[2]。酶促褐变是由原料组织中的酚酶, 主要是多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)催化内源性的酚类底物及酚类衍生物而发生复杂的化学变化, 最终形成褐色或黑色物质的一种结果。在完整的植物组织中, PPO 是与内囊体膜结合在一起的, 同酚类底物是分离的, 因此褐变不会发生^[3], 更主要的是, 由于酚类物质在正常的植物组织中, 作为呼吸传递体参与了呼吸代谢作用, 酚与醌之间的氧化与还原呈动态平衡^[4]。当植物细胞受到破坏后, 正常的呼吸链被打破, 氧气的浸入造成酚类底物在酚酶的作用下迅速氧化成邻醌, 转而又快速地通过聚合作用形成褐色素或黑色素^[5]。

本文以新鲜白萝卜为原材料,对白萝卜 PPO 进行酶学特性及其有效抑制剂的研究,以期控制其在加工过程中的酶促褐变提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

白萝卜:品种白玉大根,购于浙江萧山,新鲜、无虫害、无腐烂、无机械损伤(初始含水量 93~95%)。

邻苯二酚、半胱氨酸(L-cys)、柠檬酸、植酸、EDTA、抗坏血酸(Vc)、异抗坏血酸(异Vc)、亚硫酸氢钠(NaHSO_3),均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 白萝卜 PPO 粗酶液制备

将冷冻的白萝卜洗净、去皮、切成小块,称取 100 g 与 200 mL 冷冻丙酮(-18 °C)在组织捣碎机中匀浆 3 min,然后迅速抽滤,残渣用冷冻丙酮反复冲洗,直至成为白色粉末,用冷风吹干至无丙酮味,此粉末即为丙酮粉,4 °C 保存,备用^[6]。

称取 1 g 丙酮粉分散于 50 mL 预冷的磷酸盐缓冲溶液(PBS, 0.2 mol/L, pH 6.4)中,磁力搅拌 10 min,过滤,滤液离心 10 min (8000 r/min, 4 °C),上清液即为粗酶液,冰浴中备用。

1.2.2 PPO 活力测定

参照 Franceso 和 Kouakou 的方法^[7-8],略有改进。吸取 2.5 mL 醋酸缓冲液(pH 4.4),加入 1 mL 邻苯二酚底物(0.01 mol/L),加入 0.5 mL 粗酶液后迅速摇匀,每间隔 30 s 记录 A_{410} 的变化,共记录 6 次,作吸光值 A 与反应时间的关系曲线,依据最初直线段的斜率($\Delta A_{410}/t$)计算 PPO 活力(空白为 3.0 mL 醋酸缓冲液和 1 mL 0.01 mol/L 邻苯二酚溶液混合液)。

一个酶活力单位(U/min)定义为在测定条件下每分钟引起吸光值改变 0.001 所需要的酶量。测定时设 3 个重复,取平均值表示最终酶活力。

1.2.3 pH 对白萝卜 PPO 活性的影响

配制不同 pH 值的缓冲液(2.5、3.0、4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、8.0),并用其配制邻苯二酚溶液(0.01 mol/L)。按照 1.2.2 中所述方法,测定 PPO 活性,以最高酶活力为 100%,计算 PPO 相对酶活,考察 pH 对白萝卜 PPO 活性的影响。

1.2.4 温度对白萝卜 PPO 活性的影响

分别取 2.5 mL 缓冲溶液,1.0 mL 0.01 mol/L 邻苯二酚溶液,分别置于 20、25、30、35、40、45、50、55、60 °C 的水浴中保温 5 min,加入 0.5 mL 粗酶液,

按照 1.2.2 中所述方法测定 PPO 活性,以最高酶活力为 100%,计算 PPO 相对酶活,考察温度对白萝卜 PPO 活性的影响。

1.2.5 白萝卜 PPO 酶活的热稳定性

将粗酶液在 80、85 和 90 °C 水浴保温,每隔 30 s 按照 1.2.2 所述方法测定 PPO 活力,以未保温前酶活为 100%,计算 PPO 相对酶活。

1.2.6 底物浓度对 PPO 酶活的影响

配制浓度为 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 mmol/L 的邻苯二酚溶液作为底物,按照 1.2.2 所述方法测定 PPO 的活力,考察底物浓度对白萝卜 PPO 催化速度的影响,并根据 Lineweaver-Burk 作图法得米氏常数 K_m (其值酶反应速度为最大速度一半时的底物浓度, K_m 值愈大,酶与底物的亲和力愈小; K_m 值愈小,酶与底物亲和力愈大)和最大反应速率 V_{max} 值^[9]。

1.2.7 抑制剂对 PPO 相对酶活的影响

用最适 pH 值的缓冲溶液配制不同浓度(见表 1)的 L-cys、柠檬酸、植酸、Vc、异 Vc、EDTA、 NaHSO_3 护色液与 PPO 粗酶液等体积混合,室温下静置 5 min,按照 1.2.2 所述方法测定 PPO 的活力,设置蒸馏水为对照组,最高 PPO 活力设定为相对酶活 100%,计算 PPO 相对酶活。

1.3 数据分析

利用 SPSS 17.0 和 origin 8.0 软件进行数据统计分析及作图,数据均以均值±标准差(mean±SD)表示,显著水平为 $p < 0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 pH 对白萝卜 PPO 的影响

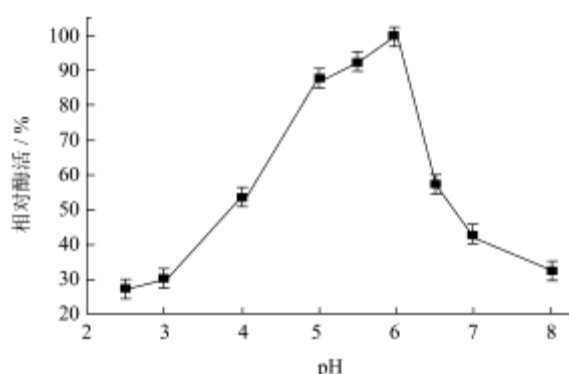


图 1 pH 对白萝卜 PPO 活力的影响

Fig.1 Effect of pH on PPO activity in white radish

由图 1 可知:在试验范围内,随着 pH 值的增加,PPO 相对酶活先增加后降低,在 pH 值 6.0 左右相对

酶活达到最大值, pH 低于 3.0 时, 白萝卜中的 PPO 活性很低。这提示我们, 在白萝卜储藏或加工过程中, 应避免 pH 值处于 5.0~6.0 的范围, 这样可有效抑制 PPO 的活性, 减少褐变对产品品质的影响; 另外, 通过使用酸化剂降低 pH 来抑制酶促褐变也是使用较广泛的抑制酶促褐变的方法之一, 本文也涉及酸化剂控制酶促褐变的内容, 结果详见 2.4。

2.2 温度对白萝卜 PPO 的影响

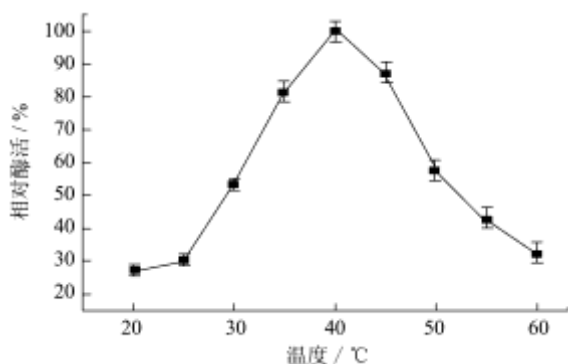


图 2 温度对白萝卜 PPO 活力的影响

Fig.2 Effect of temperature on PPO activity in white radish

由图 2 可知: 在试验范围内, 随着温度的增加, PPO 相对酶活呈现先增加后降低的趋势, 峰值出现在在 40 °C 左右。在低于 30 °C 或高于 50 °C 时, 相对酶活较低, 这是因为温度较低时, 酶反应速度较慢; 而温度较高时逐渐达到白萝卜多酚氧化酶的变性温度, 致使酶结构发生变化从而丧失活性, 酶反应速度减慢, 这一点可以从白萝卜 PPO 的热稳定性试验中得到证实, 由图 3 可知, 温度越高, PPO 活性变化越明显, 90 °C 热处理 2.5 min 或 85 °C 热处理 3.5 min 可基本完全钝化其活性, 相同热处理温度下, 保温时间越长, PPO 残余酶活越小, 这说明热处理可以有效抑制 PPO 活性, 这是由于高温造成的酶蛋白变性引起的。

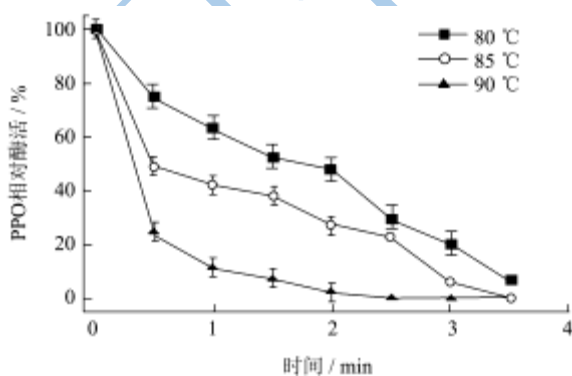


图 3 白萝卜 PPO 的热稳定性

Fig.3 Thermal stability of PPO in white radish

因此, 理论上在白萝卜加工过程中可采用低温或高温处理来抑制其 PPO 酶的活性, 延缓褐变, 但是,

白萝卜含水量较高, 其产品通常在脆度上要求较高, 高温处理对于白萝卜质构影响较大, 而且实际操作过程中, 尽管高温会抑制 PPO 活性, 但是产品颜色变化会更加严重, 这可能因为细胞组织在高温条件下受到破坏, 从而加速了 PPO 与底物的接触速度, 另外, 也可能与高温下一系列的非酶促褐变反应有关; 然而, 受加工成本限制, 一味追求低温操作也是不现实的, 所以在加工过程中, 在尽量宽的温度范围内, 合理添加高效的 PPO 抑制剂, 以达到同时在较高水平上保持白萝卜产品色泽和口感的目的。

2.3 底物浓度对 PPO 活力的影响

不同浓度的邻苯二酚溶液与白萝卜 PPO 粗酶液反应, 测定酶活力, 结果见图 4。

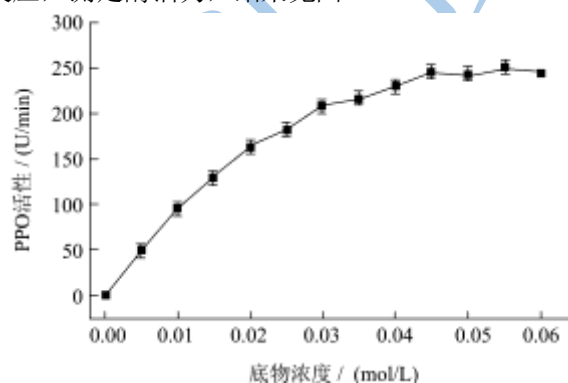


图 4 底物浓度对白萝卜 PPO 活力的影响

Fig.4 Effect of different substrate concentrations on PPO activity

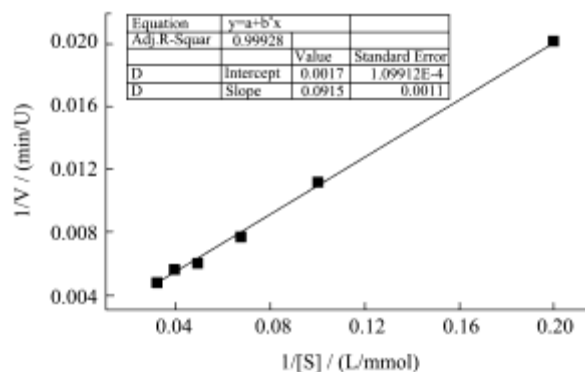


图 5 白萝卜 PPO 与邻苯二酚反应的动力学常数测定

Fig.5 Determination of the kinetic parameters of the reaction of PPO and catechol

由图 4 可知, 在添加相同量的 PPO 粗酶液条件下, 在底物浓度较低 ($[S] \leq 30 \text{ mmol/L}$) 时, 随着底物浓度增加, PPO 活性呈线性增加, 符合典型的一级酶促反应曲线; 随着底物浓度的进一步增大 ($30 \text{ mmol/L} < [S] < 45 \text{ mmol/L}$), PPO 活性增加幅度有所减小, 为混合级反应; 当 $[S] \geq 45 \text{ mmol/L}$ 时, PPO 活性达到最大值并保持不变, 表现为零级反应; 底物浓度

与 PPO 活性的关系遵循 Michaelis-Menten 的酶促动力学。这是因为在底物浓度较低时, PPO 处于过量水平, 随着底物浓度的增加, 越来越多的酶分子与底物结合, 当所有的酶被底物结合时, 酶按照它的最高能力催化反应, 而进一步提高底物浓度也不会再提高反应速度。

对于底物浓度 $[S] \leq 30 \text{ mmol/L}$ 的数据用 Lineweaver-Burk 双倒数法以 $1/[S]$ 为横坐标, $1/[V]$ 为纵坐标作图 5, 根据计算可得, 白萝卜 PPO 对邻苯二酚的 K_m 和 V_{max} 值分别为 53.8 mmol/L 和 588 U/min 。

2.4 抑制剂对白萝卜 PPO 的影响

表 1 不同抑制剂的阶梯浓度溶液

Table 1 Gradient concentrations of different inhibit reagents

护色液	浓度%				
	1#	2#	3#	4#	5#
L-cys	0.1	0.2	0.3	0.5	0.75
柠檬酸	0.1	0.15	0.3	0.5	0.75
植酸	0.1	0.15	0.3	0.5	0.75
Vc	0.1	0.15	0.3	0.5	0.75
异 Vc	0.1	0.15	0.3	0.5	0.75
EDTA	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
NaHSO ₃	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3

多酚氧化酶是一种含铜的酶, 能催化两类完全不同的反应: 一元酚羟基化, 生成相应的邻-二羟基化合物; 邻-二酚氧化, 生成邻-醌。两类反应都需要有分子氧参加。在食品加工和保藏中使用抑制剂是防止产品酶促褐变的重要手段之一, 其抑制多酚氧化酶的机制也是相当复杂的。

按照表 1 设定的浓度配制抑制剂溶液, 与白萝卜 PPO 粗酶液等体积混合, 室温下静置 5 min, 测定残余 PPO 活性, 以蒸馏水为对照组。

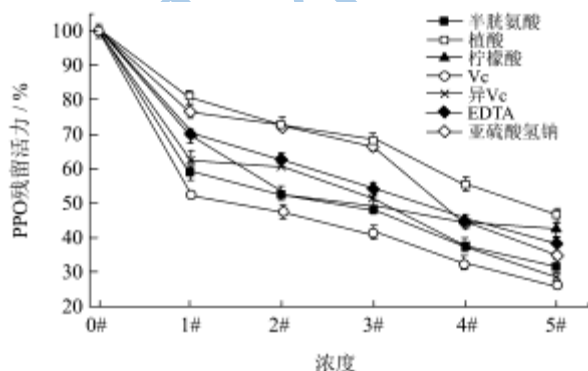


图 6 不同抑制剂对 PPO 活力的影响

Fig.6 Effects of different inhibit reagents on PPO activity

实验结果如图 6 所示, 随着酶抑制剂浓度的增加, PPO 活性得到更高的抑制。研究指出^[10], 最理想的果蔬酶促褐变抑制剂应该是 Vc, 它既可以作为醌的还原

剂, 又可以作为酶分子中铜离子的螯合剂, 甚至它可以被 PPO 直接氧化, 起到竞争性抑制剂的作用。除此之外, 它还能提高产品的生物学价值。图 6 表明, Vc 的效果最好, 但是生产上考虑到其成本较高, 使用不多, 多用异 Vc 替代, 如图 6 所示, 异 Vc 和 L-cys 效果甚为显著, 主要是因为它们结构中的羧基螯合金属离子的作用很强, 可作用于多酚氧化酶的铜辅基^[11~12]。

酸性溶液(植酸、柠檬酸)是通过降低 pH 值来抑制 PPO 活性, 同时, 氧气在酸性溶液中溶解度降低, 进一步增加其抗氧化作用; EDTA 作为螯合剂通过与 PPO 分子中的铜离子形成配位化合物而使其失活。

3 结论

3.1 新鲜白萝卜 PPO 在 pH 5.0~6.0 环境下活性较高, 在低于 30 °C 或高于 50 °C 时, 相对酶活较低, 90 °C 热处理 2.5 min 或 85 °C 热处理 3.5 min 可基本完全钝化其活性。

3.2 添加相同量的 PPO 粗酶液, 底物(邻苯二酚)浓度较低($[S] \leq 30 \text{ mmol/L}$)时, 随着底物浓度增加, PPO 活性呈线性增加, 符合典型的一级酶促反应曲线, K_m 和 V_{max} 值分别为 53.8 mmol/L 和 588 U/min ;

3.3 随着各抑制剂浓度的增加, 其对白萝卜 PPO 酶活性的抑制率越高, Vc、异 Vc、L-cys 效果较为显著。

参考文献

- [1] 胡向东, 李娜, 何忠伟. 中国萝卜产业发展现状与前景分析 [J]. 农业展望, 2012, 10: 35-37
HU Xiang-dong, LI Na, HE Zhong-wei. Analysis of the Current Situation and Prospect of Radish Industry Development in China [J]. Agricultural Outlook, 2012, 10: 35-37
- [2] MOWLACH G, TAKONO K, KAMIO I. Browning phenomenon by banana polyphenol oxidase [J]. Journal of Japanese Society of Food Science and Technology, 1983, 30(4): 245-251
- [3] Owen R FENNEMA 著. 王璋, 许时婴, 江波等译. 食品化学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003
Owen R FENNEMA. Transferred by WANG Zhang, XU Shi-ying, JIANG Bo et al. Food Enzymology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2003
- [4] 董英. 藕汁褐变反应及其控制 [J]. 农业工程学报, 1994, 10(3): 143-147
DONG Ying. Browning Reaction of Lotus Root Juice and Its Control [J]. Transactions of The Chinese Society of

- Agricultural Engineering, 1994, 10(3): 143-147
- [5] WHITAKER J R, LEE C Y. Recent advances in chemistry of enzymatic browning: an overview. Enzymatic browning and Its Prevention [M]. Washing D C: eds.ACS, 1995
- [6] 刘文山,肖凯军,郭祀远.苹果多酚氧化酶的提取及其抑制作用的研究[J].现代食品科技,2006,4(22):82-84
LIU Wen-shan, XIAO Kai-wen, GUO Si-yuan. The Extraction and Inhibition of Apple Polyphenol Oxidase [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 4(22): 82-84
- [7] FRANCESCO P. Inhibition of apple polyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 1993,17:21-30
- [8] KOUAKOU T H, KOUADIO Y J, KOUAMÉ P. et al. Purification and Biochemical Characterization of Polyphenol Oxidases from Embryogenic and Nonembryogenic Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Cells [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009,158:285-301
- [9] ZHENG Yong-ju, SHI Jun-ling, PAN Zhong-li. Biochemical characteristics and thermal inhibition kinetics of polyphenol oxidase extracted from Thompson seedless grape [J]. European Food Research and Technology, 2012, 234: 607-616
- [10] 王璋.食品酶学[M].北京:中国轻工业出版社,1991
WANG Zhang. Food Enzymology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1991
- [11] WANG Si-yuan, LIN Tian-tian, MAN Guo-wei, et al. Effects of Anti-browning Combinations of Ascorbic Acid, Citric Acid, Nitrogen and Carbon Dioxide on the Quality of Banana Smoothies [DB/OL]. (2013.5). <http://link.springer.com/article/10.1007/s11947-013-1107-7>
- [12] 卢影,郑建仙.复合护色液对鲜切苹果的防褐变研究[J].现代食品科技,2009,9(25):1024-1028
LU Ying, ZHENG Jian-xian. Antibrowning Effects of a Compound Reagent on Fresh-cut Apples [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 9(25): 1024-1028

现代食品科技