

# 黄花梨多酚氧化酶特性及防褐变处理

罗晓妙<sup>1</sup>, 史碧波<sup>1</sup>, 曾凡坤<sup>2</sup>

(1. 西昌学院 食品科学系, 四川 西昌 615013; 2. 西南大学, 重庆 400716)

**【摘要】**从黄花梨中提取多酚氧化酶, 并对其特性进行研究。以邻苯二酚为底物采用分光光度法测定了不同 pH 值、温度、底物浓度、酶浓度及抑制剂对 PPO 活性影响。结果表明: 黄花梨 PPO 具有同工酶。黄花梨 PPO 的最适 pH 值为 6.0, 最适温度为 25℃, 并在此基础上考察了抗坏血酸、柠檬酸、亚硫酸氢钠和 L-半胱氨酸对 PPO 的褐变抑制效果。

**【关键词】**黄花梨; 酶促褐变; 多酚氧化酶; 抑制剂

**【中图分类号】**TS255.3 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1673-1891(2006)04-0044-04

## 前言

黄花梨 (*Pyrus pyrifolia* (Burm.) Nakai. cv. "huang-hua") 属砂梨系统, 成熟期恰逢高温季节, 果实采摘后生理生化变化剧烈, 贮藏性差, 常温下仅能保鲜一周左右, 所以供应期短, 难以远距离运销。因此, 控制黄花梨采摘后软化腐烂、拓宽加工领域成为生产上亟待解决的问题。

梨果褐变的主要原因是梨组织中的多酚氧化酶 (Polyphenol oxidase EC1. 10. 3. 1. 简称 PPO) 作用引起的<sup>[1]</sup>, 因此, 梨的护色关键在于抑制酶促反应。由于果肉中含有大量的 PPO, 在梨加工过程中, 易引起酶促褐变, 不仅影响了产品的风味、色泽, 还大大降低了梨制品的营养价值。用多酚氧化酶抑制剂来处理水果是防止果品加工过程中酶促褐变的重要手段。但由于同种水果不同品系间多酚氧化酶同工酶的含量、种类及理化性质存在差异, 因而它们对同种抑制剂的处理效果不同。在食品加工过程中、抑制水果多酚氧化酶引起的酶促褐变应针对不同品种 PPO 同工酶的差异, 选用不同的抑制剂和抑制方法<sup>[2, 3]</sup>。本试验通过对黄花梨中 PPO 的某些特性的测定与分析, 为合理选择加工条件和抑制剂提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

黄花梨: 市售

### 1.2 试验仪器与试剂

#### 1.2.1 仪器

冷冻离心机 (Model J-6M 型)、电子天平 (JD2003 型)、高速组织捣碎机 (DS-1 型)、酸度计 (pHS-3C 型)、722 型分光光度计和磁力搅拌器 (JB-2 型)

#### 1.2.2 试剂

PEG (聚乙二醇)、丙酮、邻苯二酚、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、醋酸和醋酸钠等均为分析纯。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 多酚氧化酶 (PPO) 粗酶液的提取<sup>[4, 5]</sup>

称取组织完整、无损伤、无色变黄花梨去皮果肉 100g, 迅速切片后加入预冷的磷酸盐缓冲液 (0.2mol/L, pH6.86) 200mL, 用高速组织捣碎机捣成匀浆, 4 层纱布过滤后在冷冻离心机上离心 (8000r/min, 4℃) 10min, 上清液即为 PPO 粗酶提取液。粗酶液先经丙酮沉淀, 再经硫酸氢沉淀纯化, 制成酶液并置于低温下 (4℃) 备用。

#### 1.3.2 多酚氧化酶活力的测定

采用分光光度法。吸取冷磷酸缓冲液 1.5mL 于比色皿中, 加入 0.2mol/L 的邻苯二酚溶液 1.0mL, 先于 30℃ 保温 5min, 再加入 PPO 酶液 0.1mL, 混匀

收稿日期: 2006-10-10

作者简介: 罗晓妙 (1979-), 女, 主要从事农产品贮藏与加工方面的研究。

后在 420nm 波长处比色,以吸光度 A 值表示 PPO 的相对活性。

### 1.3.3 pH 对酶活力的影响

以邻苯二酚为底物,用磷酸缓冲液 (0.2mol/L)、醋酸缓冲溶液 (0.2mol/L) 调整反应体系 pH 值 (3.0~9.0),在不同的 pH、室温下分别按上述方法测定 PPO 活性。

### 1.3.4 温度对酶活力的影响及 PPO 的热稳定性

以邻苯二酚为底物,用磷酸缓冲液配制反应液,将酶液反应体系置于 5~60℃ 范围的不同温度梯度下保温处理 5min,于 420nm 处比色测定 PPO 活性。

取磷酸缓冲液 15mL、浓度为 0.20mol/L 的邻苯二酚 10mL 和 PPO 粗酶液 1mL 分别在 70℃、80℃、90℃ 的水浴中保温不同的时间,取出冷却至室温,在波长 420nm 处测酶活力。

### 1.3.5 底物浓度与反应速度的关系

以浓度为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14、0.16、0.18、0.20mol/L 的邻苯二酚作为底物,分别测定不同浓度下的 PPO 的活力大小 (pH6.86, 室温)。

### 1.3.6 酶浓度与反应速度的关系

在室温条件下,在 1.5mL 冷磷酸盐缓冲液中加入浓度为 0.2mol/L 的邻苯二酚 1.0mL,然后分别加入 PPO 粗酶液 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12mL,分别在 420nm 处测定吸光度,每 60s 记录一次测定值,并求出相对最大反应速度。

### 1.3.7 抑制剂对酶活性的影响<sup>[6,7]</sup>

用磷酸盐缓冲液配置不同浓度的抗坏血酸、柠檬酸、亚硫酸氢钠、L-半胱氨酸,分别取上述抑制剂溶液 1.5mL,0.2mol/L 的邻苯二酚溶液 1.0mL,PPO 酶液 0.1mL,在室温条件下测定 PPO 的活性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 pH 对酶活力的影响

图 1 为反应体系吸光度——pH 值的关系曲线。从图中可知,pH 值对黄花梨 PPO 酶活力的影响比较明显,在 pH 值 5.0~6.0 之间吸光度最大,黄花梨 PPO 的最适 pH 为 6.0,同时在 pH5.0 还有一个吸收峰,表明黄花梨 PPO 有同工酶存在,这与已有的文献报道相符<sup>[2]</sup>。当 pH 值 <3.0 或 pH 值 >8.0 时,PPO 酶活力得到了显著的抑制,因此,调节 pH

值能有效抑制 PPO 的活性,可以减轻黄花梨加工中的酶褐变的程度。

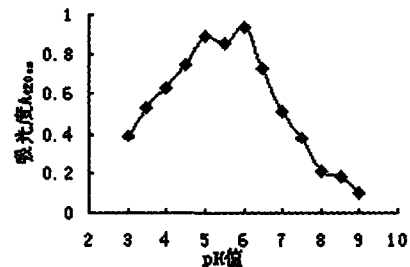


图 1 pH 值对 PPO 活性的影响

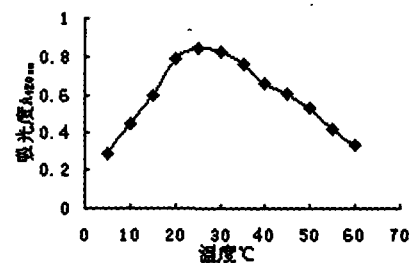


图 2 温度对 PPO 活性的影响

### 2.2 温度对酶活力的影响

图 2 为 PPO 酶液在不同温度条件下处理 5min 后测得的吸光度随温度的变化图。如图所示,黄花梨 PPO 的最适温度为 25℃,在 20~35℃ 酶活力较大,当温度降至 15℃ 以下时 PPO 活力显著降低,温度高于 50℃ 时酶开始钝化,活性显著下降,因此,低温贮藏可以延缓酶促褐变,高温处理可有效抑制酶的褐变。

### 2.3 PPO 的热稳定性

图 3 为不同热处理温度下黄花梨中 PPO 的吸光度与热处理时间的关系曲线。70℃ 处理 30min 可使酶失活,80℃ 处理 5min 即可使酶基本全部钝化。PPO 的热处理遵循一级动力学规律,说明较高的温度可有效地抑制黄花梨中 PPO 的褐变。但热处理会使黄花梨中的营养成分损失,尤其是维生素 C 的损失较严重,故实际生产中应综合考虑其它方法来控制黄花梨的褐变。

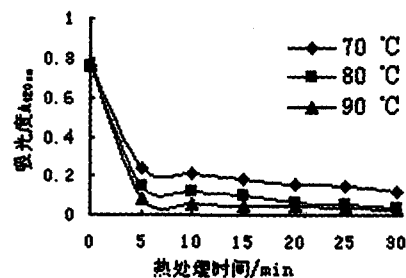


图 3 PPO 的热稳定性

### 2.4 底物浓度与反应速度的关系

如图 4 所示,在底物浓度较低的情况下,随着底物浓度的增加反应速度相应增加,但当底物浓度达到 0.1mol/L 时,反应速度的增加随底物浓度的增加趋于缓慢,而且在底物浓度达到 0.2mol/L 时仍能保持一定的反应速度,并未观察到对酶活力的明显抑制作用。

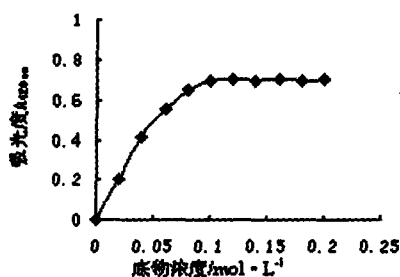


图 4 底物浓度与反应速度的关系

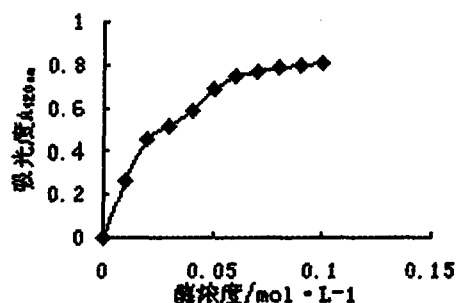


图 5 PPO 浓度与反应速度的关系

### 2.5 酶浓度与反应速度的关系

从图 5 中可以看出,在酶液相对浓度较低时,随着 PPO 浓度的增加其反应速度明显增加,当酶液浓度达到 0.06mol/L 时,反应速度的增加趋于稳定,这是因为当达一定浓度后,酶的作用产物抑制了酶的活力。

表 1 不同抑制剂对 PPO 活性的影响

抑制剂	抗坏血酸						柠檬酸					
浓度/mol · L <sup>-1</sup>	0.0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.0	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
吸光度/A <sub>420nm</sub>	0.754	0.325	0.270	0.170	0.150	0.05	0.762	0.530	0.450	0.320	0.260	0.180
抑制剂	亚硫酸氢钠						L-半胱氨酸					
浓度/mol · L <sup>-1</sup>	0.0	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
吸光度/A <sub>420nm</sub>	0.755	0.509	0.425	0.270	0.164	0.155	0.761	0.438	0.356	0.275	0.157	0.148

### 2.6 抑制剂对酶活性的影响

从表 1 可以看出,不同浓度的抗坏血酸、柠檬酸、亚硫酸氢钠及 L-半胱氨酸均对黄花梨 PPO 活性有一定的抑制作用。

抗坏血酸的有效抑制浓度是 0.05 mol/L,其在多酚氧化酶体系中对酶褐变的机理是与中间产物邻苯二醌作用生成邻二酸和脱氢抗坏血酸,防止了中间产物进一步聚合成黑色素<sup>[6]</sup>。

柠檬酸的有效抑制浓度是 0.3mol/L,随着柠檬酸浓度的增加,抑制作用越来越强,因为柠檬酸的三个羧基对 PPO 的辅基铜有较强的螯合作用;另外柠檬酸对反应体系的 pH 值有调节作用,使体系 pH 值低于 PPO 的最适 pH 值而降低其活性。

亚硫酸氢钠的有效抑制浓度是 0.25mol/L,亚硫酸氢钠能不可逆地与反应中间产物醌反应生成无色产物,此外还具有漂白和防止微生物污染的作用。

L-半胱氨酸能和酶促褐变的中间产物醌生成稳定的无色产物,抑制了次级氧化和聚合反应,阻止

了黑色素的生成<sup>[8]</sup>,从而抑制了 PPO 的活性,当其浓度达到 0.10mol/L 时就可起到良好的抑制作用。

## 3 结论

3.1 黄花梨 PPO 的最适 pH 值为 6.0,在 pH 值 5.0~6.0 之间吸光度最大,同时由于同工酶的存在,在 pH5.0 还有一个吸收峰;当 pH 值 <3.0 或 pH 值 > 8.0 时,PPO 酶活力得到了显著的抑制,因此,通过调节 pH 值可有效抑制 PPO 的活性。

3.2 PPO 的最适反应温度为 25℃,高温能钝化 PPO 的活性,能有效抑制酶促褐变的发生,80℃ 处理 5min 可以基本使酶钝化,因此在黄花梨加工过程中可以利用高温短时热烫来控制酶促褐变的发生。

3.3 选用的 4 种抑制剂对黄花梨 PPO 均有一定的抑制作用。0.05 mol/L 的抗坏血酸、0.3mol/L 的柠檬酸、0.25mol/L 的亚硫酸氢钠和 0.10mol/L 的 L-半胱氨酸可有效抑制黄花梨多酚氧化酶的活性。

### 参考文献:

[1]王璋.食品酶学[M].北京:中国轻工业出版社,1996.

- [2] 葛超, 李秀锦, 陈玉民等. 4个品种梨果实多酚氧化酶同工酶比较(简报)[J]. 河北农业技术师范学院学报, 1999, 13(1): 78-80.
- [3] 鞠志国, 苗德全. 莱阳梨多酚氧化酶的纯化及其基本性质的研究[J]. 1990, 7(3): 204-209.
- [4] M. Oktay, I. küfrevioglu, I. Koca?aliskan, et al. Polyphenoloxidase from Amasya Apple. J Food Sci, 1995, 60(3): 494-496.
- [5] 郝志芳, 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, (5): 44-49.
- [6] 蔡金星, 李秀锦, 刘秀凤, 等. 不同品种梨多酚氧化酶特性及其抑制剂的研究[J]. 1999, 13(1): 55-58.
- [7] 张京芳, 曹玉美, 刘生锋, 等. 不同因子对梨多酚氧化酶活性的影响[J]. 1999, 14(3): 32-38.
- [8] 毕阳, 欧阳春光. 苹果梨多酚氧化酶(PPO)的部分特性[J]. 2001, 22(12): 29-31.

## The Characterization of Polyphenoloxidase and Its Inhibitors in Huanghua Pear

LUO Xiao - miao<sup>1</sup>, SHI Bi - bo<sup>1</sup>, ZENG Fan - kun<sup>2</sup>

(1. Food Science Department of Xichang College, Xichang Sichuan 615013;  
2. Southwest university, Chongqing 400716)

**Abstract:** The paper mainly researched the properties of polyphenoloxidase (PPO) extracted from Huang - hua pear. It studied the PPO activities with spectrophotometer using catechol as substrate in different pH, temperature, enzyme concentrations, substrate concentrations and inhibitors. The results showed that there existed isoenzyme in Huanghua pear PPO and its optimal pH and temperature was 6.0 and 25°C. At the same time, the browning inhibitory effects of ascorbic acid, crtric acid, sodium sulfite and L - cysteine on PPO were also studied.

**Key words:** Huang - hua pear; Enzyme browning; Polyphenoloxidase; Inhibitor

(责任编辑:张荣萍)