

黄冠梨果皮多酚氧化酶的酶学特性

龚新明^{1,2}, 崔彦红³, 关军锋^{*}, 李雪梅, 张继封 (1. 西北农林科技大学生命科技学院, 陕西杨凌 712100; 2. 河北省农林科学院遗传生理研究所, 河北石家庄 050051; 3. 河北科技大学, 河北石家庄 050018)

摘要 [目的] 研究黄冠梨果皮中多酚氧化酶(PPO)的酶学特性,为黄冠梨的贮藏保鲜和加工提供理论基础。[方法] 采用分光光度法分别测定在不同反应pH值、不同反应温度、不同底物和抑制剂条件下的PPO活性。[结果] 该酶的最适温度为25℃,50℃以上PPO活力明显受抑制;最适pH值为6.0;以邻苯二酚为底物时, $K_m=0.0317 \text{ mol/L}$;以绿原酸作为底物时, $K_m=0.0189 \text{ mol/L}$;在选定的浓度范围内(0.2~1.0 mmol/L),所用抑制剂的抑制能力从强至弱排列为L-Cys > Vc > $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ > NaHSO_3 > EDTA- Na_2 。较高浓度的 CaCl_2 、NaCl也可对黄冠梨果皮PPO产生抑制作用。 Cu^{2+} 能提高黄冠梨果皮PPO活性。[结论] 绿原酸在黄冠梨果皮酶促褐变中的作用值得重视;采取调节pH值、热烫、添加安全抑制剂可以明显控制该PPO活性。

关键词 黄冠梨;果皮;多酚氧化酶;酶促褐变;特性

中图分类号 S609+.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)31-13541-03

Enzymatic Characteristics of Polyphenol Oxidase in the Pericarp of Huangguan Pear

GONG Xin-ming et al (College of Life Science, Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract [Objective] The research aimed to study the enzymatic characteristics of polyphenol oxidase (PPO) in the pericarp of Huangguan Pear and provide the theoretical foundation for the storage, preservation and processing of Huangguan Pear. [Method] By using spectrophotometry, PPO activity was determined under different reaction pH value, different reaction temperature, different substrate and inhibitor. [Result] The optimum temperature of this enzyme was 25℃ and PPO activity was obviously inhibited at over 55℃. The optimum pH value was 6.0. When pyrocatechol was taken as the substrate, $K_m=0.0317 \text{ mol/L}$. When chlorogenic acid was taken as the substrate, $K_m=0.0189 \text{ mol/L}$. In the range of selected concentrations (0.2 - 1.0 mmol/L), the inhibitory abilities of the used inhibitors were as follows: L-Cys > Vc > $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ > NaHSO_3 > EDTA- Na_2 . CaCl_2 and NaCl at higher concentrations could inhibit PPO in the pericarp of Huangguan Pear. Cu^{2+} could increase PPO activity in the pericarp of Huangguan Pear. [Conclusion] More attentions should be paid to the role of chlorogenic acid in the enzymatic browning of Huangguan Pear pericarp. PPO activity could be obviously controlled by adjusting pH value, blanching and adding safe inhibitors.

Key words Huangguan Pear; Pericarp; Polyphenol oxidase (PPO); Enzymatic browning; Characteristics

多酚氧化酶(Polyphenol oxidase, PPO)是一种含铜酶,广泛存在于各种果蔬中。果实酶促褐变通常是PPO催化酚类物质转变成醌的结果,因此PPO活性是决定果实组织褐变进度和程度的重要因素之一^[1]。黄冠梨果形端正、成熟较早、经济性状好,在我国北方梨区已经广泛发展。其中河北省栽培面积约1.5万 hm^2 。然而,黄冠梨在成熟季节及贮藏期间,套袋梨果表面易发生果皮褐色斑点(俗称“鸡爪病”),该病害发病迅速,一旦发病,会严重降低果实的商品价值。研究表明,黄冠梨果皮出现的褐斑为一种生理性病害,与酚类物质酶促氧化造成的组织褐变关系密切。黄冠梨套袋后病果果皮酚类物质含量及多酚氧化酶活性均高于套袋健康果,酚类物质含量高、PPO活性较强,促进了酶促氧化反应而使果皮组织出现褐变^{2-3]}。但目前人们对黄冠梨果皮PPO特性尚未了解;并且对于PPO酶学特性的研究多采用果肉组织^{4-7]},而采用果皮者较少。因此,研究黄冠梨果皮PPO酶学特性对进一步研究并解决黄冠梨果皮褐斑的产生和黄冠梨的保鲜加工均具有一定意义。

1 材料与方

1.1 材料 套袋后黄冠梨采自河北省农林科学院石家庄果树研究所,采后立即运到实验室,取果皮用液氮速冻, -40℃冷冻待测。

1.2 方法

1.2.1 PPO的提取。取10g冻果皮,加入预冷的pH值6.5浓度0.1 mol/L磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液40 ml,冰浴

匀浆,然后在4℃下8000 r/min离心20 min,取上清液为粗酶液,低温保存备用。

1.2.2 PPO活性测定。用分光光度计法测定多酚氧化酶活性^[8],反应体系为2 ml pH值6.5浓度0.1 mol/L磷酸缓冲液、1 ml浓度0.1 mol/L邻苯二酚,0.2 ml酶液,反应温度为30℃。最后加入酶液快速混匀,使用分光光度计在420 nm波长下测定每30 s吸光值的变化。测定重复3次。并规定每毫升酶液在1 min内使吸光值增加0.001为1个酶活力单位U [1U = 0.001/(ml·min)]。

1.2.3 不同pH值对PPO活力的影响测定。分别在反应介质pH值为4.4~7.0(用柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液配制)和30℃条件下测定PPO活性。

1.2.4 不同温度对PPO活力的影响测定。调整反应体系温度分别为20~60℃,按上述方法测定PPO活性。

1.2.5 不同酚类物质浓度对PPO活力的影响测定。在最适pH值和最适温度(邻苯二酚作为底物时)的条件下,分别在反应体系中加入一定浓度梯度(2.5~80.0 mmol/L)的邻苯二酚和绿原酸溶液(由于溶解度的关系,绿原酸最高为50 mmol/L),测定PPO活性,并进行米氏常数(K_m)的计算。对没食子酸、香豆醛酸、原儿茶酸作为反应底物时的PPO活性也作了测定。

1.2.6 不同化学试剂对PPO活力的影响测定。反应体系以1 ml浓度0.1 mol/L邻苯二酚为底物,加入2 ml含一定浓度化学试剂的缓冲液(最适pH值和最适温度),最后加入0.2 ml粗酶液,测定下列化学试剂对PPO活力的影响:亚硫酸氢钠(NaHSO_3)、抗坏血酸(Vc)、硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2)、L-半胱氨酸(L-Cys)、无水氯化钙(CaCl_2)、氯化钠(NaCl)、硫酸铜(CuSO_4) (均为国产分析纯试剂)。

基金项目 石家庄市重点科技攻关项目资助(07152102A)。

作者简介 龚新明(1984-),男,湖北黄梅人,硕士研究生,研究方向:果蔬采后生理与保鲜加工。* 通讯作者,研究员,博士生导师, E-mail: jurfeng-guan@263.com。

收稿日期 2008-08-18

2 结果与分析

2.1 pH 值对黄冠梨果皮 PPO 活性的影响 试验结果表明,黄冠梨果皮中 PPO 作用的适宜温度为 5.8 ~ 6.4, 最适 pH 值为 6.0, 在 pH 值过高或过低时, PPO 的活性明显受到抑制 (图 1)。

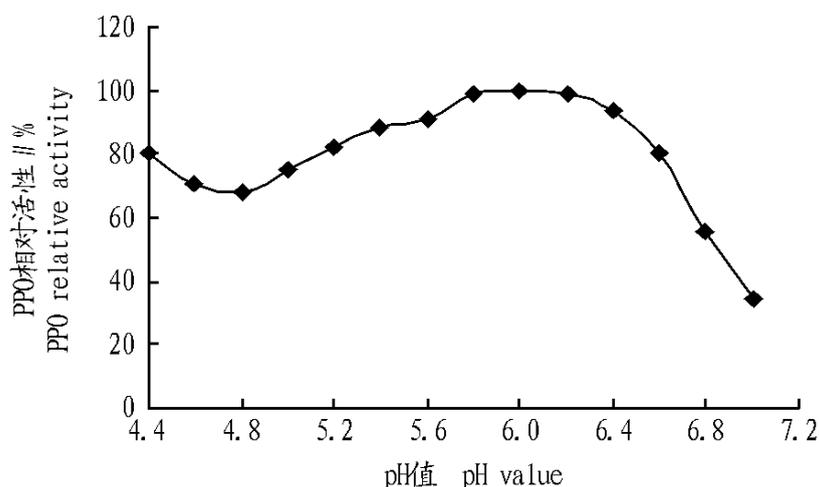


图 1 pH 值对黄冠梨果皮 PPO 活性的影响

Fig. 1 Effects of pH value on PPO activity in the pericarp of Huangguan Pear

2.2 温度对黄冠梨果皮 PPO 活性的影响 黄冠梨果皮中 PPO 作用的适宜温度为 20 ~ 30, 最适为 25, 超过 30 之后, 酶活性呈现下降趋势, 在 55 时, PPO 活性为最大活性的 48% (图 2)。因此, 为抑制黄冠梨的褐变, 在加工过程中可采用热烫的方法使 PPO 失活。

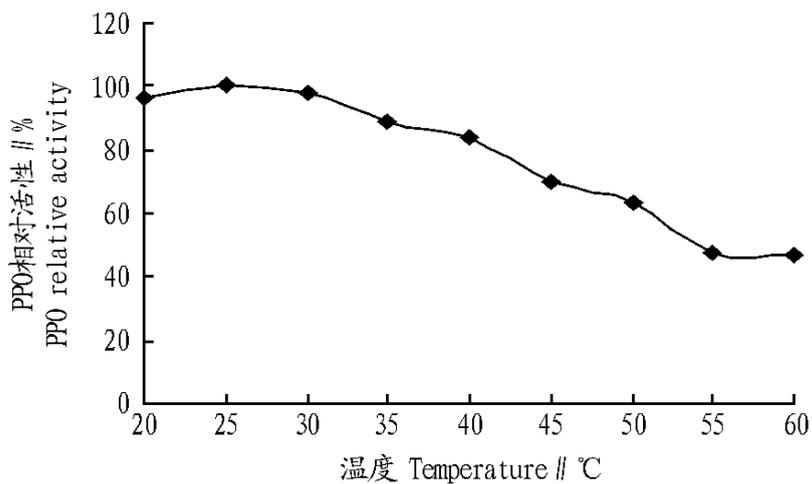


图 2 温度对黄冠梨果皮 PPO 活性的影响

Fig. 2 Effects of temperature on PPO activity in the pericarp of Huangguan Pear

2.3 不同反应时间下 PPO 活力的变化 酶反应速度一般随时间的延长而减慢。黄冠梨的 PPO 活性在 0 ~ 90 s 呈直线变化, 以后变化则逐渐减缓 (图 3)。测定黄冠梨果皮的 PPO 活性, 以产物生成速度来衡量, OD₄₂₀ 能反映产物累积情况。在 90 s 之内, 所测的 OD₄₂₀ 值与时间成一定的正相关; 而在 90 s 之后, 由于受产物等因素的影响, 酶的活性并不能够充分地表现出来, 所以 A₄₂₀ 值增加缓慢, 故反应 90 s 后所测的 OD 值不能代表 PPO 的活性。因此, 在 PPO 的活性测定中, 反应时间应以不超过 90 s 为宜。

2.4 酚类物质浓度对黄冠梨果皮 PPO 活力的影响 以邻苯二酚作为底物时, 当邻苯二酚浓度小于 50 mmol/L 时, 反应速度与底物基本成线性关系; 大于 50 mmol/L 时, 反应速度趋于稳定; 以绿原酸作为底物, 低浓度时随着浓度的增加, PPO 活性相应增加, 但高于 40 mmol/L 时, PPO 活性有下降趋势, 表明高浓度绿原酸对 PPO 活性产生了一定的抑制作用; 且该反应条件下 PPO 对邻苯二酚的催化能力高于绿原酸 (图 4)。该

研究也采用了没食子酸、香豆醛酸、原儿茶酸作为反应底物, 但未检测出 PPO 反应活性, 初步推断这些酚类物质不参与黄冠梨果皮 PPO 活性反应, 因此不是其酶促褐变的反应底物。

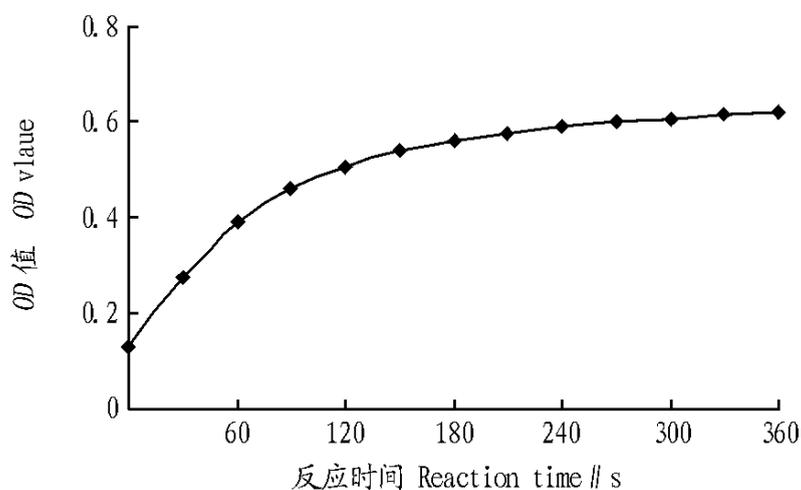


图 3 黄冠梨果皮 PPO 活性与反应时间的关系

Fig. 3 Relationship between PPO activity in the pericarp of Huangguan Pear and reaction time

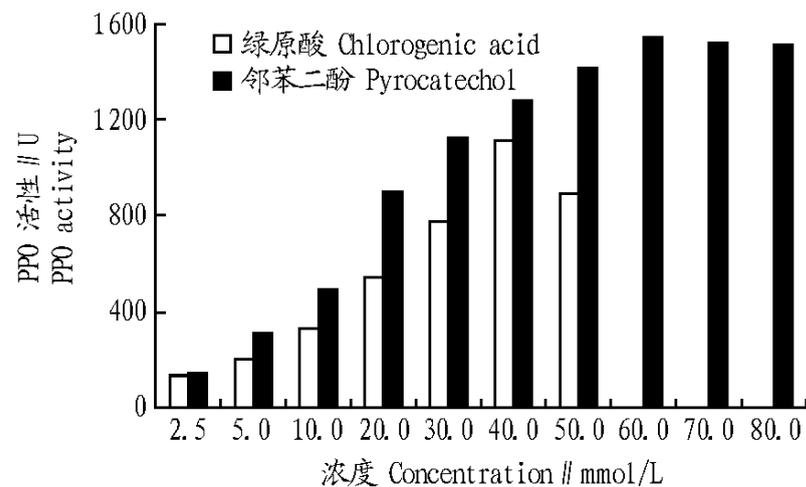


图 4 邻苯二酚和绿原酸对黄冠梨果皮 PPO 活性的影响

Fig. 4 Effects of pyrocatechol and chlorogenic acid on PPO activity in the pericarp of Huangguan Pear

根据 Lineweaver-Burk 双倒数方程 $1/V = K_m/V_{max} \cdot \{1/[S]\} + 1/V_{max}$, 以 $1/V$ 为纵坐标, $1/[S]$ 为横坐标作图, 求得: 以邻苯二酚为底物时, $K_m = 0.0317 \text{ mol/L}$, $V_{max} = 2.235 \times 10^3 \text{ U}$ 拟合直线为 $y = 0.0142x + 0.4475$; 以绿原酸作为底物时, $K_m = 0.0189 \text{ mol/L}$, $V_{max} = 1.1073 \times 10^3 \text{ U}$ 拟合直线为 $y = 0.0171x + 0.9031$ 。 K_m 越小, 反映出底物与酶的亲和力越大, 初步说明与邻苯二酚相比, 绿原酸与 PPO 的亲和力较大, 因此, 在黄冠梨果皮酶促褐变中, 绿原酸的作用值得重视。

2.5 几种化学物质对黄冠梨果皮 PPO 活性的影响 由图 5 可知, 在几种化学物质中, L-Cys 对黄冠梨 PPO 有较好的抑制效果, 浓度 0.2 mmol/L 时, 其抑制率即可达到 50% 以上; 大于 0.8 mmol/L 时, 可完全抑制 PPO 活性。这是因为 L-Cys 是一种理想的抗褐变的天然物质^[9], 它并不是通过对 PPO 活性中心的结构性修饰, 或是发生共价结合来抑制其活性, 而是直接与其酶促反应产物醌类物质结合生成无色的硫氢化合物, 从而抑制褐变的发生。随 Vc 添加量的增大, PPO 活性逐渐变小。当 Vc 的浓度变为 1 mmol/L 时, PPO 的活性可完全被抑制, 这说明 Vc 有较好的防褐变效果。Vc 的抑制作用一方面是作为酶分子中铜离子的螯合剂, 另一方面是作为还原剂将酶促反应的中间产物醌还原成酚。Na₂S₂O₃ 对 PPO 抑制作用很明显, 浓度 0.4 mmol/L 时其抑制率即可达到 50% 以上, 大于 0.8 mmol/L 时可完全抑制 PPO 活性; EDTA-Na₂ 的抑制效

果不明显,1 mmol/L 浓度时抑制效率仅为 4%;NaHSO₃ 的抑制作用也较强,1 mmol/L 浓度时抑制效率即达到 59%。这可能是由于亚硫酸盐的还原性作用于酶中的铜离子,从而抑制了 PPO 的活性。不过由于亚硫酸盐对人体不利,因此在应用时应严格控制。

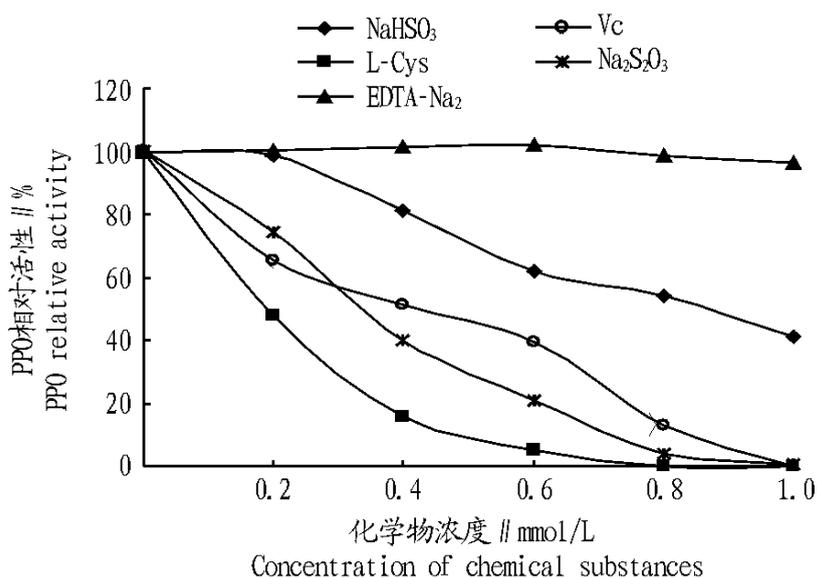


图5 几种化学物质对黄冠梨果皮 PPO 活性的影响

Fig 5 Effects of several kinds of chemical substances on PPO activity in the peicarp of Huanguan Pear

由上可见,在选定浓度范围内(0.2 ~1.0 mmol/L),L-Cys、Vc 和 Na₂S₂O₃ 抑制作用较强,NaHSO₃ 抑制作用稍弱,EDTA-Na₂ 抑制作用最弱。从抑制效率和安全性² 方面考虑,以上抑制剂作用从强至弱排布为 L-Cys > Vc > Na₂S₂O₃ > NaHSO₃ > EDTA-Na₂。因此,在选用黄冠梨褐变抑制剂时可优先选用 L-半胱氨酸和抗坏血酸。

另外,测定发现,CaCl₂、NaCl 对 PPO 活性有一定的抑制作用,但低浓度的 NaCl 抑制作用不明显,较高浓度的 NaCl 抑制作用明显,浓度 0.2 mol/L 时抑制率为 37%,1.7 mol/L 时达到最大,抑制率 69.9%;铜离子能显著提高 PPO 酶的活性,但较高浓度时促进作用减弱,当 CuSO₄ 浓度为 60 mmol/L 时,PPO 活性提高到对照的 210%。PPO 是核基因编码的金属铜蛋白,PPO 前体除了 N 末端和 C 末端之外的中间区域是一个铜结合的保守区域,是 PPO 的活性部位^[10]。在反应体系中加入一定浓度范围的 Cu²⁺ 相当于给 PPO 的铜结合区域补充了铜离子,从而有利于 PPO 活性的提高。这些结果表明,在

(上接第 13522 页)

实度比周边没有车辆通行的区域明显降低。测试点中,最大值为距离地表 8 cm 深处,坚实度为 350 KPa。最小值为距离地表 17.5 cm 以下,坚实度为 100 KPa 左右。在 15 cm 以下,所有测试点的土壤坚实度都降低至 200 KPa 以下。道路中央表层沙土更为松散,地表 10 cm 以上测得的沙土坚实度均在 100 KPa 以内。

3 结论

(1) 割灌机样机在科尔沁沙地的作业表明,所设计制造的小型沙地灌木收割机底盘在科尔沁沙区有较好的动力性能,有足够的牵引性能进行灌木收割作业,在滑转率 40% 时达到最佳的牵引性能,并且在反复通过同一车辙时,不对地表植被造成破坏,土壤坚实度基本没有发生改变。

生产中可通过减少铜制剂(如波尔多液)喷布,增加钙制剂(如氯化钙)处理可有效控制果皮 PPO 活性。

3 结论

(1) 黄冠梨果皮中多酚氧化酶活性测定宜在反应开始 90 s 之前的时期进行。黄冠梨果皮 PPO 的适宜反应温度为 20 ~35 °C,最适为 25 °C,50 °C 以上 PPO 活力明显受抑制。最适 pH 值为 6.0。

(2) 黄冠梨多酚氧化酶反应动力学研究表明,以邻苯二酚为底物时, K_m = 0.031 7 mol/L; 以绿原酸作为底物时, K_m = 0.018 9 mol/L。绿原酸在黄冠梨果皮酶促褐变中的作用值得重视。

(3) 在选定的浓度范围内,所用 PPO 抑制剂作用的大小从强至弱排布为 L-Cys > Vc > Na₂S₂O₃ > NaHSO₃ > EDTA-Na₂。建议在生产加工中采用 L-半胱氨酸和抗坏血酸作为黄冠梨果皮 PPO 抑制剂,推荐浓度范围为 0.2 ~0.8 mmol/L。另外较高浓度的 CaCl₂、NaCl 也可对黄冠梨果皮 PPO 产生抑制作用。CuSO₄ 能明显提高 PPO 活性。建议在生产中减少铜制剂(如波尔多液)喷布,增加钙制剂(如氯化钙)处理,可有效控制果皮 PPO 活性,减少褐变的发生。

参考文献

- [1] CHENG G W, CRISOSTOC H. Browning potential, phenolic composition, and polyphenol oxidase activity of buffer extracts of peach and rectaire skin tissue [J]. J Amer Soc Hort Sci, 1995, 120(5): 835 - 838.
- [2] 关军锋, 及华, 冯云霄, 等. 黄冠梨果皮褐斑病与酚类物质代谢的关系 [J]. 华北农学报, 2005, 20(6): 80 - 83.
- [3] 王文辉, 李振茹, 王志华, 等. 套袋黄冠梨黑点病与钙素营养和果实衰老的关系 [J]. 果树学报, 2005, 22(6): 658 - 661.
- [4] 李桂琴, 刘坤, 张玉星. 雪梨果肉多酚氧化酶的活性研究与纯化 [J]. 食品科学, 2007, 28(12): 297 - 300.
- [5] 程建军, 马莺, 杨咏丽, 等. 苹果梨中多酚氧化酶酶学特性的研究 [J]. 园艺学报, 2002, 29(3): 261 - 262.
- [6] 程建军, 于震新, 于静海, 等. 苹果梨和鸭梨酶促褐变机理的研究 [J]. 食品科学, 2000, 21(2): 71 - 74.
- [7] 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.
- [8] GALEAZZI MA, SCARBIERI V C. Substrate specificity and inhibition of polyphenol oxidase (PPO) from a dwarf variety of banana (Musa cavendishii L.) [J]. Journal of Food Science, 1981, 46(5): 1404 - 1406.
- [9] 孔维宝, 陆健, 赵海峰, 等. L-半胱氨酸抑制多酚氧化酶的机制研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(11): 66 - 70.
- [10] 贺立红, 宾金华. 高等植物中的多酚氧化酶 [J]. 植物生理学通讯, 2001, 8(4): 340 - 344.

(2) 在科尔沁沙区,大中型车辆反复通过,容易引起表层植被破坏、土壤的坚实度下降、土壤含水率降低,使车辆通过性变差,因此,大中型车辆不适宜在科尔沁沙地作业^[6-8]。

参考文献

- [1] 陈忠加. 沙生灌木开发利用现状及收获中存在的问题 [J]. 林业机械与木工设备, 2008, 36(1): 13 - 14.
- [2] 黄祖永. 地面车辆原理 [M]. 北京: 机械工业出版社, 1985.
- [3] 季学武. 仿驼足行走机构及其牵引性能 [J]. 汽车技术, 1997(4): 13 - 17.
- [4] 李慧清, 俞国胜, 陆鑫增. 科尔沁沙地轮式拖拉机牵引性能的实验研究 [J]. 北京林业大学学报, 1996, 18(3): 76 - 80.
- [5] 庄继德. 计算汽车地面力学 [M]. 北京: 机械工业出版社, 2002.
- [6] 刘聚德. 车辆沙地通过性研究中几个关键问题的探讨 [J]. 汽车工程, 1996, 18(2): 103 - 107.
- [7] 陆怀民, 郭秀荣, 赵志国, 等. 防风固沙草方格铺设机器人沙漠通过性研究 [J]. 中国工程机械学报, 2006, 4(4): 389 - 393.
- [8] 张克健. 车辆地面力学 [M]. 北京: 国防工业出版社, 2002.