

樱桃果实酶促褐变及其影响因素的研究

方莹 李雨念 王梅志 李佳冰 钟艺萃 王海英

(中南民族大学 生命科学学院, 南方少数民族地区生物资源保护与综合利用工程中心, 武汉 430074)

摘要 以红灯品种的樱桃果实为材料,对果实中的多酚氧化酶(PPO)的酶学特性进行了研究.通过其与邻苯二酚反应后产物的吸光度值的测量,分别研究了樱桃在不同储存条件下褐变度的变化,以及温度、pH值、反应时间和氧化抑制剂L-半胱氨酸、抗坏血酸、柠檬酸和肉桂酸等对PPO活性的影响.结果表明:以0.01mol/L的邻苯二酚作为底物,樱桃果肉PPO分别在反应温度为10℃和pH值为4.0时的活性较高,反应时间为10~15min时活性较高,褐变程度较强.在一定的条件下,几种抑制剂对樱桃果肉的PPO活性呈现出不同的抑制效果,以抗坏血酸的抑制效果为最佳.

关键词 樱桃;酶促褐变;多酚氧化酶;抑制剂

中图分类号 Q945.6+6 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2017)04-0060-04

Study on the Enzymatic Browning in Cherry

Fang Ying, Li Yunian, Wang Meizhi, Li Jiabing, Zhong Yicui, Wang Haiying

(Engineering Research Center for the Protection and Utilization of Bioresource in Ethnic Area of Southern China, College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract The enzymatic characteristics of Hongdeng cherry polyphenol oxidase (PPO) was preliminary studied by spectrophotometer using catechol as substrate. The change of browning degree in cherry fruits at room temperature and 4℃ and the effects of the pH, reactivity time, temperature and inhibitors such as L-cysteine, Vic, citric acid and 4-hydroxycinnamic acid were studied. The results showed that the optimum conditions as follow: pH is 4.0, the reaction temperature is 10℃, the time of reaction was 10~15 min. Under certain conditions, four kinds of inhibitors presents different inhibiting effect, and the optimum one is Vic.

Keywords cherry; enzymatic browning; polyphenol oxidase; inhibitor

樱桃是某些李属类植物的统称,包括樱桃亚属、酸樱桃亚属、桂樱亚属等.果实外表色泽鲜艳、晶莹剔透、红如玛瑙、黄如凝脂,果实富含糖、蛋白质、维生素及钙、铁、磷、钾等多种元素.樱桃一般于四五月成熟,由于采收期正值高温季节,采摘后贮藏过程中果实容易失水皱缩、掉梗、褐变和腐烂,品质极易败坏,市场供应期甚短.许多研究表明,果实中的多酚氧化酶(PPO)是果实发生酶促褐变,导致果实腐败变质的主要物质,并且对水果加工产品如果汁、果酒等饮料的色泽、品质和风味有很大影响^[1,2].

PPO是一类含铜的氧化还原酶,可以用一元酚和二元酚作底物.在有氧的条件下,PPO将邻位的酚氧化为醌,醌很快聚合成为褐色色素而引起组织褐

变^[3-8].PPO的活性受温度、pH值、底物浓度及作用时间等诸多因素影响,并且不同植物组织中各种因素的影响也各有不同.对樱桃酶促褐变机理的研究主要体现在对樱桃果实中多酚氧化酶的活性研究以及找出抑制其活性的有效方法,本研究对樱桃果实的保鲜、贮藏、运输以及副产品的生产加工有重要的理论价值及实际参考意义.

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂和仪器

1.1.1 材料与试剂

新鲜无损的樱桃果实购自武汉农贸市场.邻苯

收稿日期 2017-06-30

作者简介 方莹(1987-),女,讲师,博士,研究方向:食品科学技术,E-mail:fangying19870808@163.com

基金项目 湖北省自然科学基金资金(2015CFB519);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(CZQ14016);湖北省战略性新兴产业(支柱)产业人才培养计划(GJZ15001)

二酚、三氯乙酸、磷酸二氢钠、氢氧化钠、L-半胱氨酸、肉桂酸、抗坏血酸、柠檬酸等(国药集团化学试剂有限公司)均为分析纯或化学纯。

1.1.2 仪器

紫外可见分光光度计(UV-6100PC型,上海美谱达仪器有限公司),电子天平(FA2004型,上海舜宇恒平科学仪器有限公司),高速冷冻离心机(HC-3018R型,安徽中科中佳科学仪器有限公司),恒温水浴锅(HH-S型,常州翔天实验仪器厂),pH计(FE20型,梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 PPO的提取

樱桃洗净去核后,按1:1(w/v)比例加入预冷的0.05 mol/L pH 6.5磷酸盐缓冲液,低温捣碎至匀浆,然后将匀浆液于6000 r/min下冷冻离心15 min,上清液即为酶的粗提液,低温保存备用。

1.3 褐变度的测定

采用消光值法^[9]测定。樱桃果肉样品10 g与冷却蒸馏水按1:10(w/w)混合并匀浆30 s后冷冻离心(6000 r/min 5 min),取上清液于室温和4℃条件下贮藏。0、2、4、6、8、10 d后取上清液部分于25℃保温5 min,在410 nm测定其吸光度值,结果以 A_{410} 表示褐变度。

1.4 不同影响因素对樱桃果肉PPO活性的影响

1.4.1 温度对PPO活性的影响

反应体系包括0.05 mol/L pH 6.5的缓冲液3 mL,邻苯二酚1 mL,粗酶液1 mL,该体系分别在10、20、25、30、40、50℃条件下反应10 min,然后加入1 mL三氯乙酸终止反应,测定其吸光度值。以吸光度值为纵坐标,温度为横坐标,绘制曲线,以确定樱桃果肉中PPO活性测定的最佳反应温度。

1.4.2 pH值对PPO活性的影响

配制不同缓冲液,使反应体系的pH值分别为3.0、4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、8.0、9.0。反应体系包括缓冲液3 mL,粗酶液1 mL,邻苯二酚1 mL,25℃保温5 min,反应后加入1 mL三氯乙酸终止反应,于410 nm处测定其吸光度值。

1.4.3 反应时间对PPO活性的影响

按上述取样,反应体系在25℃恒温水浴中分别反应5、10、15、20、30、40 min后测定吸光度值。作图以确定樱桃PPO活性测定的最佳反应时间。

1.4.4 抑制剂对PPO活性的影响

吸取粗酶液1 mL,分别加入1 mL浓度为0.1%的L-半胱氨酸、肉桂酸、柠檬酸、抗坏血酸,室温下振荡混匀,再加入2 mL磷酸盐缓冲液,1 mL 0.01

mol/L邻苯二酚,于25℃水浴中反应10 min,然后加入1 mL三氯乙酸终止反应,测定其吸光度值。比较相同浓度下各抑制剂对樱桃果肉PPO活性的影响^[10]。对照组中抑制剂的量由缓冲液替代之,其他做相同处理。

1.4.5 抗坏血酸浓度对PPO活性的影响

吸取粗酶液1 mL,分别加入1 mL浓度为0.0250%、0.0375%、0.0500%、0.1000%、0.2000%、0.3000%的抗坏血酸,室温振荡混匀。再加入2 mL磷酸盐缓冲液,1 mL 0.01 mol/L邻苯二酚,于25℃水浴中反应10 min,然后加入1 mL三氯乙酸终止反应,测定其吸光度值。比较不同浓度的抗坏血酸对樱桃果肉PPO活性的抑制作用。

2 结果与分析

2.1 樱桃果实于贮藏期间褐变度(BD)的变化

樱桃果肉在室温和4℃贮藏条件下,BD均呈稳定上升趋势(图1),表明切分可导致褐变现象的迅速发生,并且随着时间增长,褐变反应会持续进行^[11,12]。相比而言,室温贮藏条件下樱桃样品的褐变程度显著高于4℃贮藏条件下的樱桃样品,这说明低温保存对樱桃酶促褐变有较明显的抑制效果。此外,室温下贮藏的樱桃样品4 d之前快速褐变,8 d之后进入平台期。这可能是因为樱桃自身的底物浓度有限,即多酚类物质随时间消耗减少而使褐变反应进程减缓。

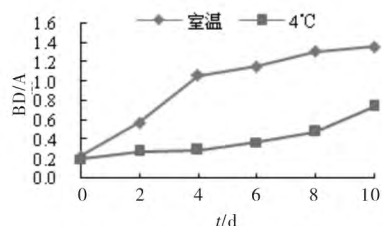


图1 室温和4℃下樱桃果实褐变情况

Fig. 1 The change of browning degree in cherry fruits at room temperature and 4℃

2.2 温度对樱桃果肉PPO活性的影响

从图2可知,樱桃果实PPO在10℃呈现最大的PPO活性,随着温度的上升,PPO活性总体呈下降趋势,但于20~25℃温度范围内维持在较稳定的水平,超过25℃以上时樱桃果肉PPO活性呈明显下降趋势,这同许多果蔬的PPO的最适温度为25~45℃之间的结果有所不同,如火龙果和莲藕中PPO的活力分别在30℃和35℃时达到最高值,鲜切山药中PPO的活力则在45℃时达到最高^[3,9,11]。这说

明鲜切樱桃果肉中的 PPO 活力对温度的敏感性与其它果蔬的 PPO 之间存在一定的差异,耐热性较差,其具体机理仍有待进一步的探究。

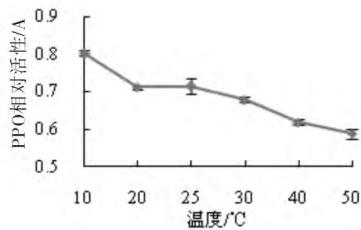


图2 温度对樱桃 PPO 活性的影响

Fig. 2 The effect of temperature on activity of cherry PPO

2.3 pH 值对樱桃果肉 PPO 活性的影响

随着体系酸度的降低,樱桃果肉 PPO 活性最初有微弱的增大趋势(图3),在 pH 值为 4.0 时有一个吸收峰,而当继续增大反应的 pH 值时,樱桃果肉 PPO 活性明显下降,于 pH 5.0~7.0 范围内下降变化率最大; pH 在 8.0 之后进入稳定期。该结果表明,樱桃果肉 PPO 的活性对 pH 值的变化较为敏感,且其最适 pH 值为 4.0。

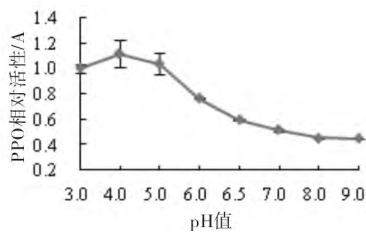


图3 pH 值对 PPO 活性的影响

Fig. 3 The effect of pH value on activity of PPO

2.4 反应时间对樱桃果肉 PPO 活性的影响

由图4可以看出,随着反应时间的延长,吸光度值呈上升趋势,这表明樱桃果肉的酶促褐变反应在该时间段内在持续进行,醌类物质产生使得褐变度增加。相比而言,反应时间在 15 min 之前褐变增长速度较快,约 20 min 之后增长速度减慢。可能原因一方面为樱桃 PPO 活性随着时间的延长而变弱,另一方面是底物浓度随反应时间的延长而逐渐降低。

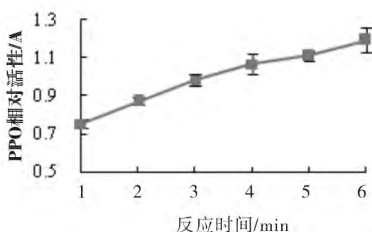


图4 反应时间对 PPO 活性的影响

Fig. 4 The effect of reaction time on PPO activity

2.5 抑制剂对樱桃果肉 PPO 活性的影响

相同浓度的抗坏血酸、肉桂酸、L-半胱氨酸、柠檬酸对樱桃 PPO 活性均有一定的抑制作用(图5) ($p < 0.05$),且抗坏血酸与 L-半胱氨酸的抑制作用较强,肉桂酸与柠檬酸的抑制作用较弱。抗坏血酸与 L-半胱氨酸具有显著性差异 ($p < 0.05$)。因此,可以初步判断几种抑制剂对樱桃 PPO 活性的抑制效果依次为:抗坏血酸 > L-半胱氨酸 > 肉桂酸 > 柠檬酸。该结果与文献报道的结果存在一定差异,推测不同水果的 PPO 存在一定的种属特异性。

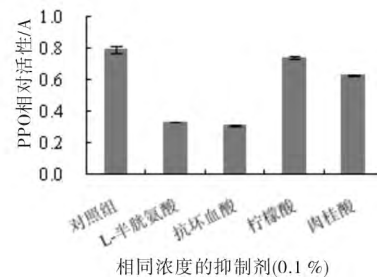


图5 不同抑制剂对 PPO 活性的影响

Fig. 5 The effects of different inhibitors on the activity of PPO

2.6 抗坏血酸浓度对 PPO 活性的影响

抗坏血酸对樱桃 PPO 活性的抑制作用最佳,进一步研究不同浓度的抗坏血酸对樱桃 PPO 活性的影响情况。图6的结果表明,浓度为 0.1% 的抗坏血酸抑制效果最佳,此后若继续增加浓度,抑制效果在浓度为 0.2% 时略有减弱,在浓度为 0.3% 时抑制效果又有一定增强。从食品安全和经济成本的角度出发,添加剂用量也不宜过多。因此,抗坏血酸的添加量以浓度为 0.1% 为宜。

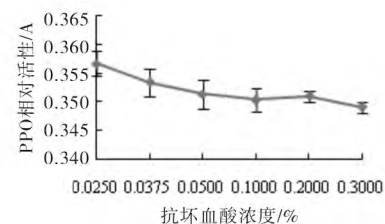


图6 抗坏血酸浓度对 PPO 活性的影响

Fig. 6 The effect of ascorbic acid concentration on the activity of PPO

3 结语

多酚氧化酶(PPO)一直被公认为是引起鲜切果蔬酶促褐变的主要酶类^[13]。由于不同果蔬中多酚氧化酶的酶学特性及其底物各不相同,不同种类或品种的果蔬中 PPO 的活性及其反应条件存在一定的

品种特异性^[14].

本实验发现 樱桃果肉在 4 °C 时褐变度明显低于室温,且褐变不明显.当温度上升到 10 °C 时 PPO 活性显著增加,在 10 ~ 25 °C 之间维持在较高水平,此后逐渐降低,说明樱桃果肉 PPO 的耐热性较差.此外,樱桃 PPO 在 pH 为 3.0 ~ 5.0 时活性较高,pH 值 4.0 时达到峰值,pH 值大于 8.0 时 PPO 活性抑制效果明显.反应时间在 10 ~ 15 min 时褐变快速发生,随着反应时间的增加,吸光值也逐渐增加.4 种抑制剂对樱桃 PPO 均有不同程度的抑制作用,以抗坏血酸的抑制效果最佳.因此,在樱桃果酱、果酒、果干、果汁等副产品的工业生产中,可采用瞬时高温、适当调节 pH 值、控制反应时间以及适度添加浓度适宜的抗坏血酸等方法,合理降低樱桃果肉中多酚氧化酶的活性从而控制其褐变度,进而提高商品的经济价值和营养价值.

参 考 文 献

- [1] 闫真真. 樱桃酒褐变机理及酿造技术研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2013.
- [2] 罗佳丽. 鲜切紫薯褐变机理及控制技术研究[J]. 重庆: 西南大学, 2013.
- [3] 李粉玲, 蔡汉权, 陈 艳, 等. 火龙果果肉的酶促褐变及其抑制措施[J]. 湖北农业科学, 2007, 46(6): 999-1002.
- [4] 谢笔钧. 食品化学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2005: 357-359.
- [5] 赵玉娥, 李瑞芬. 生物化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 46-53.
- [6] 詹嘉红. 橄榄果实中 PPO 和 PDO 活性抑制研究[J]. 亚洲热带植物科学, 2005(4): 14-16.
- [7] 刘 超, 汪晓鸣, 王 宏. 辐照对梨汁多酚氧化酶活性的抑制作用[J]. 核农学报, 2006, 20(4): 331-332.
- [8] 刘桂明, 张怀宇, 邓海阳, 等. 榨菜中多酚氧化酶特性的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 182-185.
- [9] 王青章, 刘怀超, 孙 颖. 莲藕贮藏中褐变度及多酚氧化酶活性的初步研究[J]. 中果蔬菜, 1997, (3): 4-6.
- [10] Guerrero-Beltran J A, Barbosa-Canovas G V, McEvily A J, et al. Inhibition of enzymatic browning in apple products by 4-hexylresorcinol, cysteine and acid[J]. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 2005, 38: 625-630.
- [11] 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.
- [12] Asemota H N, Wellington M A, Odutuga A A, et al. Effect of short term storage on phenolic content, polyphenolase and peroxidase activities of cutyam tubers[J]. J Sci Food Agric, 1992(60): 309-312.
- [13] 程 双, 胡文忠, 马 跃, 等. 鲜切果蔬酶促褐变机理及控制研究进展[J]. 食品与机械, 2009, 25(4): 173-176.
- [14] 詹嘉红. 枇杷果实酶促褐变控制研究[J]. 广州食品工业科技, 2004, 20(4): 49-55.