

香蕉多酚氧化酶褐变性质的研究*

张 勇¹ 池建伟² 温其标¹ 张名位² 胡 飞¹

1(华南理工大学食品与生物工程学院, 广州 510640)

2(广东省农科院生物所, 广州 510640)

摘 要 以邻苯二酚为底物通过采用分光光度计测定氧化产物的方法,对香蕉果肉中多酚氧化酶(PPO)的催化特性、最适温度、最适 pH 值、热稳定性等性质进行了研究。结果表明,香蕉 PPO 的最适温度为 25℃,最适 pH 为 5.0,75℃水浴处理 5 min 酶基本完全失活,100℃水浴处理 20s 可钝化 PPO 的活性,且香蕉 PPO 存在同功酶。实验中同时考察了柠檬酸、抗坏血酸、NaHSO₃ 和半胱氨酸对 PPO 的褐变抑制效果。

关键词 香蕉,多酚氧化酶,褐变,同功酶

香蕉成熟后质地柔软,较难长期保鲜或储运,因此开展香蕉深加工势在必行,但香蕉在加工过程中极易褐变而影响了其加工性能及感官质量。香蕉褐变的主要原因是香蕉组织中多酚氧化酶(polyphenol oxidase,简称 PPO)催化各种酚类底物发生氧化,首先氧化成醌,然后再聚合成黑色素^[1]。实验中对香蕉多酚氧化酶特性加以研究,为在香蕉加工过程中避免或减轻褐变的产生,生产品质上乘的产品提供理论参考。

1 主要材料、试剂和仪器

1.1 主要材料

香蕉(市售新鲜八成熟香蕉,颜色浅黄)。

1.2 试 剂

PVR(聚乙烯吡咯烷酮),PEG(聚乙二醇),丙酮,Tween80,邻苯二酚,均为分析纯,磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 6.86)。

1.3 仪 器

分析天平(AEG-120G),高速组织捣碎机(DS-1 型),冷冻离心机(3K30, Sigma),冰箱,紫外可见分光光度计(752C 型),磁力搅拌机(JB-2 型)。

2 方 法

2.1 多酚氧化酶(PPO)的提取

参照塔卡基酶的提取方法^[2]。

2.2 测定波长的选择

取磷酸缓冲液 2 mL,加入 0.2 mol/L 邻苯二酚溶液 1.0 mL、0.1 mL PPO 粗酶液至比色杯中,室温下迅速混和均匀,然后在波长 370~460 nm 间测光密度变化。

2.3 多酚氧化酶活力测定^[3]

在比色杯中迅速加入磷酸盐缓冲液 2 mL、0.2 mol/L 邻苯二酚 1.0 mL 和 0.1 mL PPO 粗酶液,摇匀后在上述所选波长 400 nm 处比色测定,酶液加入后开始计时,每 60 s 记录 1 次吸光度 A 值随时间的变化值,以 20 min 内最初直线段的斜率($\Delta A/t$)计算酶活力。酶活力以在此测定条件下每分钟 A 值改变 0.001 为 1 个酶活力单位(U)。

2.4 底物浓度与反应速度的关系

室温时,在 2 mL 磷酸盐缓冲液中,分别加浓度为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14、0.16、0.18、0.20 mol/L 的邻苯二酚 1.0 mL,然后加入 0.05 mL PPO 粗酶液,迅速摇匀,在波长 400 nm 处每 60 s 记录 2 次反应产物的

第一作者:硕士研究生。

* 2001 年广东省农业攻关项目(广东几种主要水果蔬菜加工与保鲜(No. B202))

收稿时间 2003-10-29, 改回时间 2003-12-09

吸光度(A_{400} 值),并求出相对最大的反应速度。(以最大的 $\Delta A/\text{min}$ 来表示,以下同)。

2.5 酶浓度与反应速度的关系

室温时,在磷酸盐缓冲液 2 mL 中,加浓度为 0.1 mol/L 邻苯二酚 1.0 mL,然后分别加入 PPO 粗酶液 0.005、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1 mL,分别在波长 400 nm 处每 60 s 记录 1 次反应产物的 A_{400} 值,并求出相对最大的反应速度。

2.6 酶活力与 pH 值关系的测定

在室温 20℃、pH 值分别为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 的一系列 2 mL 磷酸盐缓冲液中,分别加浓度为 0.1 mol/L 邻苯二酚 1.0 mL, PPO 粗酶液 0.05 mL,按 2.3 节方法测定不同 pH 值对酶活力的影响。

2.7 多酚氧化酶的最适温度及热稳定性

取磷酸缓冲液 20 mL、浓度为 0.1 mol/L 的邻苯二酚 10 mL 和 PPO 粗酶液 0.5 mL 分别在 40、50、60、70、80、90℃ 的水浴中保温 5 min,取出冷却至室温,在波长 400 nm 处测酶活力;另备一份在 100℃ 水浴中分别热烫 5 s、10 s、15、20、25、30、35、40、50、55、60 s,取出后均迅速冷却,按 2.3 节方法测定酶活力。

2.8 不同添加剂对多酚氧化酶的影响

室温时,取 2 mL 磷酸盐缓冲液,底物浓度 0.1 mol/L 邻苯二酚 0.1 mL,粗酶液 0.05 mL,保温 10 min,分别加入柠檬酸、抗坏血酸、 NaHSO_3 ,调节这些添加剂在反应液中的浓度,然后测定 PPO 活性。

3 结果与分析

3.1 反应体系工作波长的选择

体系反应产物在可见光波 370~460 nm 下的吸光度如图 1。由图 1 可知,体系反应产物在可见波长 400 nm 处有最大吸收峰,即在此吸收波长处,体系产物的吸光度最大,因此在以后的测定中均采用 400 nm 为工作波长。

3.2 底物浓度与反应速度的关系

浓度对反应速度的影响如图 2 双相特征曲

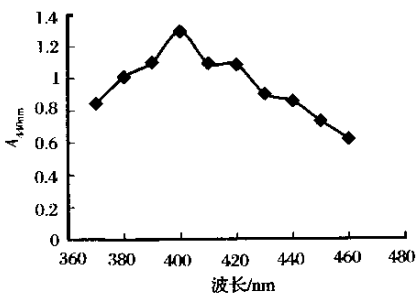


图 1 工作波长的选择

线所示。在底物浓度较低的情况下,随着底物浓度增加,酶活力也相应地增加,反应速度也相应增加,但当底物浓度达到 0.12 mol/L 时,即使再增加底物浓度,反应速度也不再增加。在底物浓度达到 0.2 mol/L 时仍保持一定的反应速度,即未观察到对酶活力明显的抑制作用。根据 Henri 解释,反应在低底物浓度时,并非所有的酶分子都能与底物分子相结合,而是随着底物浓度增加,愈来愈多的酶分子与底物相结合,当浓度达到一定程度时,所有的酶分子与底物相结合时(酶被底物饱和),进一步增加底物浓度也不能提高反应速度,这时的反应速度被称为最高速度 V_{max} [4]。根据米氏方程,底物浓度小于 0.02 mol/L,反应显示一级动力学特征;底物浓度大于 0.12 mol/L 时反应速度与底物浓度无关,表现出零级反应的动力学特征。

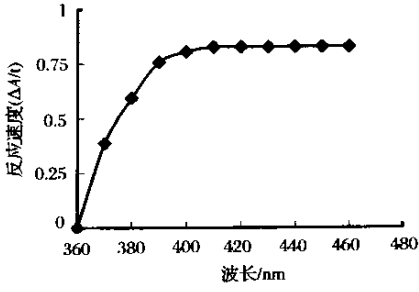


图 2 底物浓度与反应速度的关系

3.3 酶浓度与反应速度的关系

由图 3 可知,在酶液相对浓度较低时,随着酶浓度的增加其反应速度的增加十分明显,而当酶液达到 0.08 mL 时,反应速度的增加趋于稳定,这是由于酶的作用产物抑制了酶的活力

的原因。

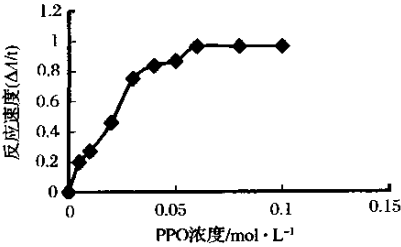


图3 PPO 浓度与反应速度的关系

3.4 酶活力与 pH 值的关系

图4为反应体系吸光度-pH 值的关系曲线。从图4可知,反应体系的 pH 值对香蕉 PPO 酶活力影响比较明显,在 pH 值 5.0~6.5 之间吸光度最大,说明此 pH 值范围内酶活力最大;在 pH<5.0 时,随着 pH 值的降低,酶活力也逐渐降低,表现为体系反应速度逐渐变慢。当 pH<3.0 时 PPO 活性显著被抑制;体系 pH>6.5 时,随着 pH 值的增大,酶活力逐渐减小。当 pH<8.5 时,酶活力得到了显著的抑制。其原因是 PPO 为碱性蛋白质,在较强的酸性条件下,辅基铜将以铜离子的形式解离出来,从而使酶失活;而在碱性条件时,辅基铜会解离成 Cu(OH)₂,使酶活力显著降低^[9]。同时由图4可知,香蕉 PPO 的最适 pH 值为 5.0,同时在 pH6.0 还有 1 个吸收峰,这表明香蕉 PPO 有同功酶存在,已有文献报道了牛蒡^[5]、草菇^[6]、板栗^[7]、莲藕^[3,8]等的多酚氧化酶具有同功酶。因此,调节 pH 值能有效抑制 PPO 活性,可以减轻香蕉加工中的酶褐变的程度。

3.5 酶活力与温度的关系

采用调节温度来控制酶催化反应速度是非常重要的。一方面,在低温下保藏食品能减少

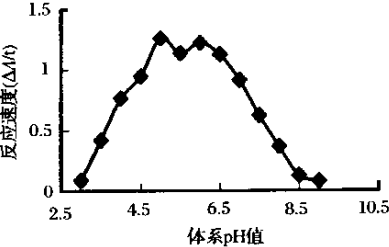


图4 酶活力与 pH 的关系

酶对软化、不良风味的产生和成熟等的影响;另一方面,在食品加工中采用高温处理能破坏或钝化所有的酶活力。此外,在酶测定中准确地控制温度是得到可靠重复数据的先决条件^[4]。温度对多酚氧化酶的影响是双重的,一方面温度升高能加快酶催化反应速度进程,另一方面促使酶蛋白变性,是 2 种对抗效应综合反应。图5为 PPO 粗酶液在不同温度下处理 5 min 后的效果图。由图5可知,香蕉 PPO 的最适温度为 25℃,在 20~35℃ 之间反应反应速度最大,即酶活力最大,低于 20℃ 酶活力较低,高于 40℃ 酶开始钝化,到 75℃ 处理 5 min 后,酶基本不可逆失活,80℃ 以上酶已没活性;从图6可以看出,酶液沸水浴钝化处理时,前 5 s 及 10~15 s 酶钝化较缓,5~10 s 较快,15~20 s 又减缓,过了 20 s 基本没有活性,出现这种现象可能

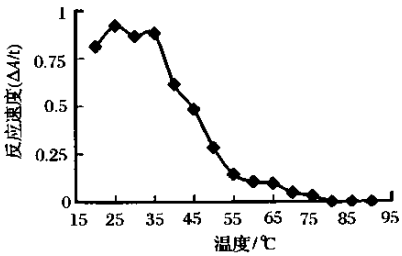


图5 温度对 PPO 活性的影响

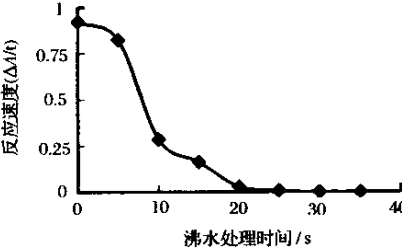


图6 沸水浴对 PPO 活力的影响

是由于同功酶^[2]的存在。因此,在沸水浴中处理超过 20 s,香蕉果肉中的多酚氧化酶及其同功酶基本全部钝化失活。一般地说,存在于完整组织或匀浆中的酶,由于它的结构被其他胶体物质(蛋白质、碳水化合物和果胶等)所保护,从而比起它以纯化的形式存在时更为耐热,因此在香蕉加工中应考虑组织状态对热传递的影响与化学物质对褐变的保护作用,从而选择合

适的加工温度以控制加工质量。

硫酸氢钠、半胱氨酸均对香蕉 PPO 活性的抑制有比较明显的效果。

3.6 不同添加剂对 PPO 活性的影响

由表 1 可知不浓度的柠檬酸、抗坏血酸、亚

表 1 不同添加剂对 PPO 活性的影响

抑制剂	柠檬酸						抗坏血酸				
浓度/mol·L ⁻¹	0.0	0.096	0.144	0.192	0.24	0.326	0.0	0.01	0.02	0.03	0.04
吸光度(A)	0.973	0.466	0.291	0.096	0.058	0.006	0.973	0.747	0.487	0.282	0.002

抑制剂	NaHSO ₃						半胱氨酸				
浓度/mol·L ⁻¹	0.0	0.012	0.024	0.036	0.048		0.0	0.0165	0.0495	0.0825	0.1155
吸光度(A)	0.973	0.742	0.549	0.024	0.003		0.973	0.539	0.214	0.133	0.012

由表 1 可以看出 随着柠檬酸浓度的增加 , 抑制作用越来越强。这是因为柠檬酸的 3 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 ,使之远离 PPO 最适 pH 值而降低其活性。当反应液柠檬酸浓度为 0.326 mol/L 时可有效地抑制褐变。

同时由表 1 可知 ,抗坏血酸的有效抑制浓度为 0.04 mol/L ,其在多酚氧化酶体系中对酶褐变的抑制机理是与中间产物邻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。另据报道^[9,10] ,抗坏血酸有漂白作用 ,用在此体系中可能会使反应产物生成稳定的无色产物 ,本实验未见明显的漂白现象。

NaHSO₃ 对 PPO 反应体系的抑制作用较复杂。一方面 ,其不可逆地与反应中间产物醌加成生成无色的产物 ;另一方面 ,还有漂白和防止微生物污染的作用。低浓度的 NaHSO₃ 就对 PPO 有着明显的抑制作用 ,当浓度达到 0.048 mol/L 时 ,抑制效果更好。

半胱氨酸对 PPO 活性的抑制作用是和酶促褐变反应的中间产物醌生成稳定的无色物质 ,抑制了次级氧化和聚合反应 ,阻止了黑色素的生成。当半胱氨酸的浓度达到 0.115 mol/L 就起到良好的抑制作用。

在实际生产中较为理想的抑制剂是抗坏血酸和半胱氨酸 ,它们既有较好的抑制效果 ,又是食品中固有的营养成分 ,且安全性高。NaH-SO₃ 具有较强的抑制、护色作用 ,也常用作 PPO

的抑制剂 ,但考虑 SO₂ 在食品中的残留问题 ,同时考虑到其不能与抗坏血酸混合使用 ,否则会降低抗坏血酸及 NaHSO₃ 的抑制效果^[11]。

4 小 结

(1)香蕉多酚氧化酶的酶促褐变的产物在可见光波长 400 nm 处有最大吸收峰。

(2)多酚氧化酶的最适 pH 值为 5.0 ,在 pH 值 5.0~6.5 范围内酶活力最大 ;其他 pH 值下均表现出不同程度的抑制 ,因此可通过调节 pH 值来控制香蕉褐变的程度。

(3)香蕉中多酚氧化酶存在同功酶 ,相应最适 pH6.0。

(4)多酚氧化酶对热敏感 ,其最适温度为 25 ,75℃ 处理 5 min 酶基本全部钝化 ,100℃ 时多酚氧化酶全部钝化的临界时间为 20s ,因此在香蕉加工中可以利用高温短时热烫来控制褐变程度的发生。

(5)0.326 mol/L 的柠檬酸、0.04 mol/L 的抗坏血酸、0.048 mol/L 的 NaHSO₃ 和 0.115 5 mol/L 的半胱氨酸可有效的抑制香蕉多酚氧化酶的活性 ,减轻或防止香蕉酶促褐变的发生。

参 考 文 献

1 卢丽霞 郭秀莲 . 香蕉罐头的研制[J]. 农牧产品开发 ,1996(10) 29~30

2 塔卡基 杨方琪 ,高福成 . 广东芝麻香蕉加工中的酶褐变研究(I) [J]. 无锡轻工业大学学报 ,1994 (1) :10~11

3 黄建韶 ,田宏现 . 莲藕中多酚氧化酶的性质 [J]. 吉

首大学学报(自然科学版) 2002(6):82~83

4 王 璋. 食品酶学[M]. 北京:中国轻工业出版社 1996:86~92

5 乔旭光,夏向东,张步志等. 牛蒡多酚氧化酶酶学性质的研究[J]. 山东农业大学学报,1997(9):328~330

6 于 新,黄小丹,冯 彤等. 草菇多酚氧化酶及过氧化物酶特性的研究[J]. 仲恺农业技术学院学报,1998(11):32

7 叶兴乾,张贵平. 板栗多酚氧化酶性质的研究[J]. 上海交通大学学报,2001(3):175

8 杨 明,汪志军. 莲藕中多酚氧化酶特性的研究[J]. 江苏农学院学报,1996(1):83

9 姜绍通,罗志刚,郑 志等. 甘薯中多酚氧化酶活性的测定及褐变控制[J]. 食品科学,2001(3):138~139

10 塔卡基,杨方琪,高福成. 广东芝麻香蕉加工中的酶褐变研究(II)[J]. 无锡轻工业大学学报,1994(2):85~87

11 张 洪,黄建韶. 马铃薯中多酚氧化酶的酶学特性研究[J]. 食品工业科技,2002(4):41

Study on the Browning Characteristics of Polyphenol
Oxidase in Banana

Zhang Yong¹ Chi Jianwei² Wen Qibiao¹
Zhang Mingwei² Hu Fei¹

1(College of Food & Bio.Eng., South China University of Technology, Guangzhou, 510640)

2(Agro Biotechnical Research Institute Academy of Agricultural Sciences Guangdong, Guangzhou, 510640)

ABSTRACT The characteristics of polyphenol oxidase (PPO) of banana was investigated by spectrophotometer using catechol as substrate. The results showed that the optimal temperature was 25℃, pH 5.0. The PPO was inactive at 75℃ for 5 minutes and the extinct condition of PPO was 20 s at 100℃. The PPO has isoenzyme in banana. Effect of Citric Acid, Ascorbic Acid, Sodium Sulfite and Cysteine on PPO was also studied.

Key words banana, polyphenol oxidase, browning, isoenzyme

欧盟批准将甾醇用于降胆固醇食品中

欧盟委员会批准了几个添加甾醇的新食品,以扩大欧洲市场上降低胆固醇食品的数量。这一举动也将推动 4 家相关公司的甾醇销量,这 4 家公司分别是设在美国的 ADM 公司、食品巨头联合利华和 2 家芬兰公司。2003 年欧洲甾醇市场的市值为 7 500 万欧元,由于新批准食品的推动,预计 2004 年将增长 15%。

植物甾醇和甾醇酯在欧盟以外的市场已经被广泛应用,而欧盟只是在最近才批准在某些食品中应用。ADM 公司的植物甾醇和甾醇酯产品在北美、欧洲和东亚国家的食品产品中已经使用了多年。这次欧盟委员会决定在欧盟市场允许使用植物甾醇和甾醇酯的产品是:沙拉调料及蛋黄酱;牛乳类产品如混合水果或谷物的牛乳产品;黄色油脂涂布料;发酵类产品包括酸乳、大豆饮料和干乳(在这些产品中乳脂和蛋白质已经部分被植物脂肪或植物蛋白质所取代)。

ADM 公司批准为新食品中甾醇和甾醇酯的最重要的供应者,另一家美国公司 ForbesMedi-Tech 公司正在等待它用木材加工的副产品制得的甾醇产品在新食品中应用,欧盟要求他们的产品必须证明是没有转基因成分的。芬兰 Teriaka 公司生产的甾醇批准用于黄色油脂涂布料、混合牛乳的果汁饮料和酸乳以及干酪产品中,该甾醇被认为是“纯天然”,而且在加工过程中不需要昂贵的酯化过程,所以其价格比其他甾醇产品便宜。联合利华生产的植物甾醇酯已经批准在牛乳和牛乳类产品中使用。Multibene 的产品用于黄色油脂涂料、牛乳和酸乳型产品和调味料。

欧盟委员会曾对每一项新批准的食品标签都有明确的要求。因此它也对甾醇产品标签提出了新的一般性规定,以后批准的添加甾醇产品都将按此规定执行。规定对每一份的量都有详细的要求,推荐食用量要达到每天 3g 以上,标签上对降低胆固醇的陈述是“本产品专为希望降低血液胆固醇水平的人使用”。这对于引起消费者对降低胆固醇食品的注意是必要的。

政策、法规、标准