

褐变抑制剂对苹果多酚氧化酶抑制机理研究

Mechanism of different inhibitors on apple polyphenol oxidase in a model system

易建华 董新玲 朱振宝 赵雪萌

YI Jian-hua DONG Xin-ling ZHU Zhen-bao ZHAO Xue-meng

(陕西科技大学生命科学与工程学院, 陕西 西安 710021)

(College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an, Shaanxi 710021, China)

摘要:为研究不同褐变抑制剂对苹果多酚氧化酶(PPO)活性的抑制机理,采用磷酸缓冲液构建苹果汁模拟体系,选取苹果中含量较多的酚类物质绿原酸作为试验对象,以磷酸缓冲液为苹果汁模拟体系,选取 4-己基间苯二酚(4-HR)、草酸、苯甲酸和对甲氧基苯甲酸为抑制剂,通过模拟试验研究抑制剂对绿原酸模拟苹果汁酶促褐变特性的影响,揭示抑制剂对苹果汁 PPO 的作用机理。结果表明,抑制剂对 PPO 的抑制机理差异较大,其中 4-HR 和草酸对 PPO 的抑制作用为竞争性抑制,植酸为混合性抑制,而苯甲酸为非竞争性抑制。该研究可为利用抑制剂控制苹果汁褐变提供理论依据。

关键词:苹果汁;褐变抑制剂;酶促褐变;PPO;绿原酸

Abstract: In order to study the mechanisms of different inhibitors such as 4-HR, oxalic acid, phytic acid, and benzoic acid on apple polyphenol oxidase (PPO), chlorogenic acid was chosen as substrates in a model apple juice. The results show that the inhibitory mode of 4-HR and oxalic acid were found to be of the competitive type since Km values increased with increasing 4-HR and oxalic acid concentration and Vmax value remained unchanged. Phytic acid was the mixed inhibitor whereas benzoic acid was a noncompetitive inhibitor. This study will provide a theoretical basis for controlling enzymatic browning in apple juice.

Keywords: apple juice; chlorogenic acid; enzymatic browning; apple polyphenol oxidase(PPO); browning inhibitor

苹果汁是人们喜爱的果蔬汁之一,近年来,中国苹果汁的产量增加很快。在世界贸易中,浓缩苹果汁的贸易量逐年提高^[1]。然而在加工和贮藏的过程中,苹果汁易发生褐变反

应,由诱人的金黄色变成棕褐色,色值下降、感官品质劣变,营养价值降低^[2]。果汁的褐变主要是由酶促褐变引起的,这一直是采后生理研究的重点。酶促褐变是在氧气参与条件下,果蔬中的多酚物质经 PPO 催化变色所致^[3]。PPO 是发生酶促褐变的主要酶,存在于大多数果蔬中。鉴于 PPO 对苹果汁品质的不利作用,果汁生产过程中常采用抑制剂抑制 PPO 的活性,从而达到控制褐变的目的,因此,研究褐变抑制剂对苹果多酚氧化酶的抑制机理具有重要意义。

酶促褐变的发生需要 3 个条件,即适当的酚类底物、酚氧化酶和氧。在控制酶促褐变试验过程中,通过除去底物抑制褐变的可能性很小,有研究者^[4]曾设想改变酚类底物的结构,但目前为止未取得成功。实践中控制酶促褐变的方法主要是添加抑制剂影响酶活性。根据抑制剂与酶的作用是否可逆,通常将抑制作用分为不可逆抑制和可逆抑制两类,可逆抑制作用除了竞争性抑制、非竞争性抑制和反竞争性抑制以外,还有混合型抑制剂,混合型抑制剂包括两种类型:非竞争性和反竞争性混合抑制,非竞争性和竞争性混合抑制^[4]。

目前国内外已研究出多种褐变抑制剂,其中 4-HR、谷胱甘肽、β-CD、有机钙盐、半胱氨酸和植物提取物等是研究较多的新型褐变抑制剂。Alvarez-Parrilla 等^[5]发现 β-CD 与 4-HR 有很好的协助作用,这两种抑制剂联合使用对 PPO 活力的抑制效果比单独使用要好,但具体的抑制机理目前尚不清楚。赵坚华等^[6]研究抑制剂对苹果梨中多酚氧化酶的抑制作用表明,苹果梨中多酚氧化酶的最佳抑制剂是谷胱甘肽,可以有效抑制活力,当谷胱甘肽浓度为 300 μmol/L 时,多酚氧化酶的活力降到 50%,当浓度增大到 500 μmol/L 时,多酚氧化酶完全失去活力。周会玲等^[7]对不同品种苹果汁的褐变及其抑制方法的研究表明,对黄元帅苹果汁用 0.32 g/L 的 Vc、对乔纳金苹果汁用 0.48 g/L 的 Vc 在榨汁时进行处理能较好地抑制褐变。然而有关常用抑制剂的机理没有做出系统的研究。

有研究^[8-10]认为,绿原酸、儿茶素是 PPO 的良好褐变底

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:31101326);咸阳市科技局自然科学基金项目(编号:2010k12-16);陕西省人力资源和社会保障厅出国留学人员科技活动项目

作者简介:易建华(1971—),女,陕西科技大学副教授,硕士。
E-mail: yijianhua@sust.edu.cn

收稿日期:2015-05-01

物,是引起果实褐变的主要酚类物质。本研究拟以绿原酸缓冲液为苹果汁的模拟体系,测定不同浓度 4-己基间苯二酚、草酸、植酸和苯甲酸对酶活的影响,通过对酶反应速率和底物浓度做 Lineweaver-Burk 双倒数图,对比 4 种抑制剂的抑制动力学,判定各抑制剂的抑制类型,为果汁褐变抑制剂的选择和使用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

- 富士苹果:购于当地水果市场(每个样品尽量均匀一致);
- 绿原酸:纯度 85%,西安楚康责任有限公司;
- 邻苯二酚、柠檬酸、磷酸氢二钠等:分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;
- 对甲氧基苯甲酸:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;
- 草酸:分析纯,天津市天力化学试剂有限公司;
- 植酸:生化试剂,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

- 九阳料理机:JYL-C020 型,山东九阳股份有限公司;
- 高速低温离心机:CT15RT 型,上海天美生化仪器设备工程有限公司;
- 精密酸度计:PB-10 型,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;
- 电热恒温鼓风干燥箱:GZX-GF-101-3-5 型,上海跃进医疗器械有限公司;
- 电子天平:BS323S 型,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;
- 漩涡混合器:QL-901 型,海门市其林贝儿仪器制造有限公司;
- 磁力搅拌器:JBZ-14H 型,上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司;
- 紫外可见分光光度计:UV759S 型,上海荆和分析仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 苹果 PPO 的提取

将低温下冷藏的新鲜苹果清洗、

去皮、切成小块,称取 150 g 果肉放入料理机中,立刻加入 300 mL 含 2%聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)pH 6.8 的磷酸盐缓冲液(4℃预冷)进行榨汁。浊汁于 4℃、12 000 r/min 离心 30 min,取上清液,加入 500 mL 丙酮(4℃预冷),搅拌待沉淀产生,置于 4℃、12 000 r/min 离心 15 min,取沉淀物,冷冻干燥,再加入含 1% Tween-80 的磷酸盐缓冲液,再次离心 15 min,得上清液,即为 PPO 粗酶液^[11]。

将粗酶液加入到 95%的(NH₄)₂SO₄溶液中,在 4℃下静置 2 h,然后于 12 000 r/min 离心 30 min,将所得沉淀溶于 10 mL pH 6.50 的磷酸缓冲液中,置于 4℃透析 24 h,期间换透析液 4 次^[12]。

1.2.2 苹果 PPO 活性测定

根据文献^[13]。

1.2.3 抑制剂对 PPO 酶促反应的抑制作用

用 pH 6.50 的磷酸缓冲液分别配制不同浓度的 4-HR(0.05,0.1,0.2,0.5 mmol/L)和底物绿原酸(0.1,0.5,1,5,10 mmol/L)溶液,于比色皿中加入 0.3 mL 浓度为 0.05 mmol/L 4-HR,再加入 0.3 mL(纯化)PPO 酶液(体系总酶活为 10 U),平衡 10 min 后加入 2.4 mL 浓度 0.1 mmol/L 绿原酸溶液,并开始计时,于 420 nm 下每隔 15 s 测定吸光值 A,连续测定 3 min。改变底物浓度和抑制剂浓度,测定不同浓度抑制剂对酶活力的影响,做 3 组平行试验。以酶促反应速率(每秒吸光值的变化)与底物浓度之间的动力学关系作图,研究酶促反应遵循米氏(Michaelis-Menten)动力学方程,并做 Lineweaver-Burk 双倒数图,判断抑制剂的抑制类型^[14]。草酸、植酸和苯甲酸试验方法同上。

2 结果与分析

2.1 4-HR 对苹果汁模拟体系酶促褐变的抑制作用

4-HR 对绿原酸模拟果汁酶促褐变的抑制作用及其机理见图 1。由图 1(a)可知,底物浓度一定时,酶促反应速率随 4-HR 浓度的增大而降低。从图 1(b)可以看出, Lineweaver-Burk 双倒数是一组纵轴截距不变的直线,即酶促反应最大速率(V)不变,但米氏常数(K)随着 4-HR 浓度增大而变大,说明 4-HR 是 PPO 的竞争性抑制剂。这与 Alvarez-Parrilla 等^[5]的研究结果一致。

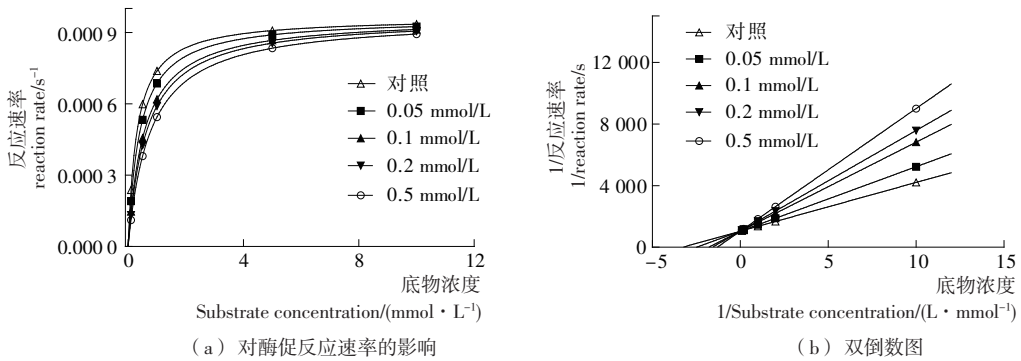
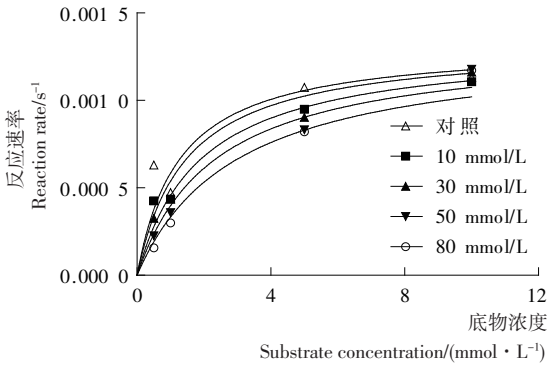


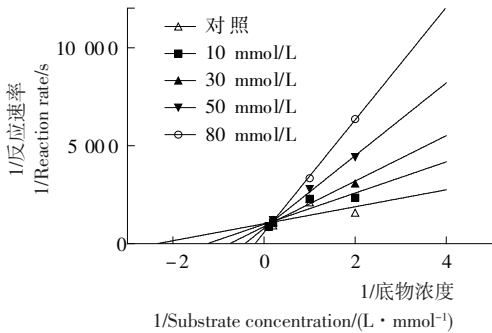
图 1 4-HR 对苹果汁模拟体系中 PPO 的抑制作用
Figure 1 The inhibition of 4-HR on apple PPO

2.2 草酸对苹果汁模拟体系酶促褐变的抑制作用

草酸对绿原酸模拟果汁酶促褐变的抑制作用及其机理见图 2。由图 2(a)可知,底物浓度一定时,随着草酸浓度的增大,酶促反应逐渐降低。由图 2(b)可知, $V_{\max}$ 不变, K_m 随着抑制剂浓度的增大而增大,说明草酸对 PPO 的抑制能力表现为浓度依赖性,即浓度越大,抑制作用越强,对 PPO 的抑制属于竞争性抑制,宋连军等^[15]研究表明草酸对 PPO 的抑制机理表现为不可逆效应,与本试验结果有所不同。而 S. M. Son 等^[16]研究表明,不同儿茶素浓度下,酶促褐变速率随草酸浓度的增大而降低,抑制类型属于竞争性抑制,这与本试验结果一致。



(a) 对酶促反应速率的影响



(b) 双倒数图

图 2 草酸对苹果汁模拟体系中 PPO 的抑制作用
Figure 2 The inhibition of oxalic acid on apple PPO

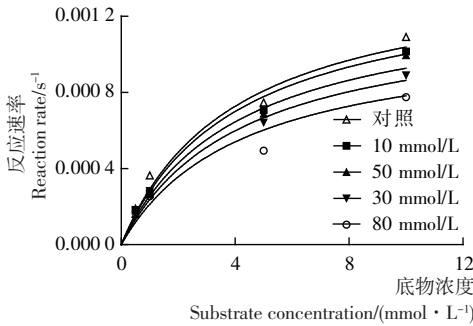
2.3 植酸对苹果汁模拟体系酶促褐变的抑制作用

植酸(肌醇六磷酸)是一种很强的抑制剂^[12],具有 12 个羧基,能够通过金属螯合作用来抑制多酚氧化酶的活性^[17]。虽然有报道指出植酸对果蔬汁有护色效果,但目前关于植酸在苹果汁中的应用研究不深入,赵玉生等^[18]研究表明,植酸及其盐天然无毒,是理想的植物性食品护色保鲜剂,应积极推广。

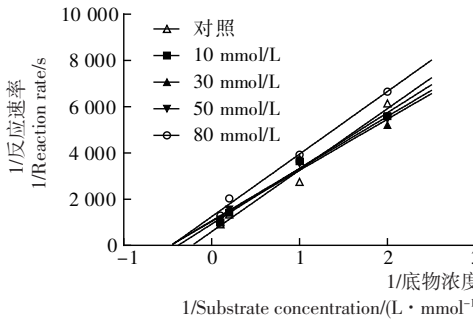
本试验研究植酸对模拟果汁酶促褐变的抑制作用及其机理见图 3。由图 3(a)可知,加入植酸后酶促反应速率明显降低,且随着植酸添加量的增加,酶促反应速率逐渐降低,该研究结果与宋连军等^[19]的研究结果一致。由图 3(b)可知,加入植酸后,酶促反应的 $V_{\max}$ 增大, K_m 降低,不符合可逆抑制类型中的任一模式,可见,植酸对 PPO 的作用属于混合型抑制。

2.4 苯甲酸对苹果汁模拟体系酶促褐变的抑制作用

苯甲酸对绿原酸模拟果汁体系褐变的抑制动力学见图 4。由图 4 可知,酶促反应中加入苯甲酸后,最大反应速率 $V_{\max}$ 变小, K_m 不变;不同浓度抑制剂的双倒数直线相交于

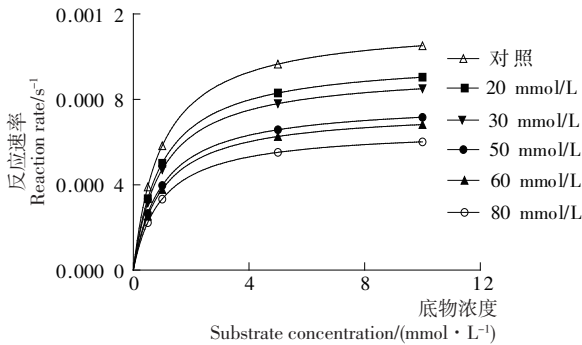


(a) 对酶促反应速率的影响

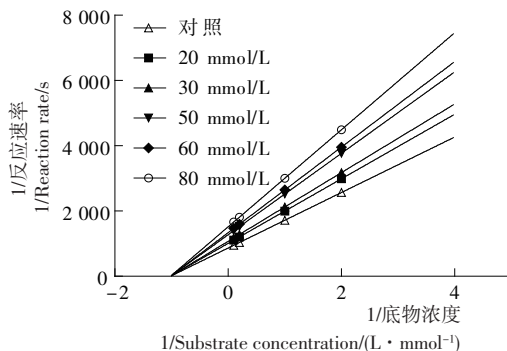


(b) 双倒数图

图 3 植酸对苹果汁模拟体系中 PPO 的抑制作用
Figure 3 The inhibition of phytic acid on apple PPO



(a) 对酶促反应速率的影响



(b) 双倒数图

图 4 苯甲酸对苹果汁模拟体系中 PPO 的抑制作用
Figure 4 The inhibition of benzoic acid on apple PPO

横轴,纵轴截距因抑制剂的存在而变大,抑制分数与抑制剂浓度成正比,与底物浓度无关,说明苯甲酸是 PPO 的非竞争性抑制剂,这与黄晓丹等^[20]研究结果一致,即苯甲酸能抑制蘑菇酪氨酸酶的单酚酶和二酚酶的活性,其效应为可逆抑制效应,苯甲酸对二酚酶的抑制作用表现为非竞争性抑制。

3 结论

4-HR、草酸、植酸和苯甲酸对 PPO 酶催化绿原酸模拟果汁体系褐变均有抑制作用。不同抑制剂对含绿原酸模拟果汁中 PPO 抑制机理不同。4-HR 和草酸对 PPO 抑制作用为竞争性抑制,植酸为混合性抑制,苯甲酸酶为非竞争性抑制。本试验只对苹果中含量较多的绿原酸酶促褐变抑制机理进行研究,而苹果中多酚物质种类繁多,因此,抑制剂对其他主要酚类物质酶促褐变的抑制作用,还有待于进一步研究。

参考文献

1 仇农学,肖旭霖,邓红. 陕西省浓缩品果汁行业可持续发展的战略思考[J]. 农业工程学报,2000,16(1):122~124.

2 张少颖,王向东,于有伟,等. 微波预处理原料对苹果汁褐变的影响[J]. 农业工程学报,2010,26(5):347~351.

3 Gui Fen-qi,Wu Ji-hong,Chen Fang,et al. Inactivation of polyphenol oxidases in cloudy apple juice exposed to supercritical carbon dioxide[J]. Food Chemistry,2007,100(4):1 678~1 685.

4 刘树兴. 食品化学[M]. 北京:化学中国计量出版社,2008.

5 E Alvarez-Parrilla,L A de la Rosa,J Rodrigo-Garcia,et al. Dual effect of β -cyclodextrin(β -CD)on the inhibition of apple polyphenol oxidase by 4-hexylresorcinol(HR)and Methyl Jasmonate(MJ)[J]. Food Chemistry,2007,101(4):1 346~1 356.

6 赵坚华,郑玉淑,李官浩,等. 苹果梨中多酚氧化酶抑制剂的抑制效果研究[J]. 食品科学,2010,31(2):277~279.

7 周会玲,段长青,周存田,等. 不同品种苹果汁的褐变及其抑制方法研究[J]. 西北农林科技大学学报,2001,29(1):91~93.

8 Awad M A,de Jager A. Flavonoid and chlorogenic acid concentrations in skin of Jonagold and Elstarapples during and after regular

(上接第 58 页)

9 M Friedman,T E Fitch, W E Yokoyama. Lowering of plasma LDL cholesterol in hamsters by the tomato glycoalkaloid tomatine [J]. Food Chemical Toxicology, 2000,38(7):549~553.

10 Alison M Fewell, James G Roddick. Interactive antifungal activity of the glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine[J]. Phytochemistry,1993,33(2):323~328.

11 王明娟,胡昌勤,金少鸿. 氨基糖苷类抗生素在蒸发光散射检测器中响应因子的一致性考察 [J]. 药学学报,2002,37(3):204~206.

12 洪建文,胡昌勤,盛龙生. 喹诺酮类抗生素在蒸发光散射检测器中响应因子的一致性考察 [J]. 药学学报,2003,38(9):695~697.

13 Fang L, Wan M, Pennacchio M, et al. Evaluation of evaporative light-scattering detector for combinatorial library quantitation by reversed phase HPLC [J]. J. Comb Chem., 2000,2(3):

254~257.

14 Robert J Houben, Kommer Brunt. Determination of glycoalkaloids in potato tubers by reversed high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A,1994,661(1~2):169~174.

15 王守兰,朱佳. 高效液相色谱法测定马铃薯中 α -茄碱的含量[J]. 食品科学,1996,17(6):60~61.

16 肖文,李勤,熊兴耀,等. 高效液相色谱法分析马铃薯中 α -茄碱 [J]. 分析化学,2011,39(9):1 459~1 460.

17 Lan Dao, Mendel Friedman. Comparison of glycoalkaloid content of fresh and freeze-dried potato leaves determined by HPLC and colormetry[J]. Agric. Food Chem.,1996(8):2 287~2 291.

18 Sotelo A, Serrano B. High-performance liquid chromatographic determination of the glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine in 12 commercial varieties of Mexican potato [J]. Agric. Food Chem.,2000,48(6):2 472~2 475.