

小麦粉多酚氧化酶活性测定方法的改进

Improvement in methods for activity measurement of polyphenol oxidase in wheat

周小玲 杨代明 李娜

ZHOU Xiao-ling YANG Dai-ming LI Na

(湖南省振华食品检测研究院, 湖南长沙 410000)

(Hunan Zhenhua Academy of Food Detection and Research, Changsha, Hunan 410000, China)

摘要:选取 3 个小麦粉作为试验材料, 对国家标准征求意见稿《粮油检验 小麦粉多酚氧化酶测定》的方法进行检验, 发现该法因缺少 PPO 粗酶提取过程, 参加反应的酶量较少, 不能反映小麦粉真实的 PPO 活性; 其次 PPO 与底物的反应温度不是最适宜的, 导致酶反应不充分; 第三酶反应后再离心, 使得一部分酶反应产物被沉淀截留, 导致检测数据小且不准确。文章在该基础上对其进行改进, 考察浸提时间、最适反应温度、底物邻苯二酚添加时间对 PPO 活性检测的影响, 优化该检验方法。结果表明: 优化后的检验方法测得的结果较为理想, 采用浸提 4 h、离心后添加邻苯二酚、反应温度 70 °C, 测得的 PPO 活性数值大大提高, 重复性好, 稳定可靠。并采用改进后的方法检测了 50 种小麦粉, 得出不同等级的小麦粉 PPO 的范围。

关键词:多酚氧化酶; 最佳条件; 小麦粉等级与 PPO 范围

Abstract: Three wheat varieties were selected as experimental materials to measure the activity of polyphenol oxidase According to the method from Measurement of Polyphenol Oxidase Activity in Wheat Flour in national standard draft. And found it has three deficiencies: first, because of the lack of crude extaction of polyphenol oxidase, it led to the less quantity of polyphenol oxidase, and couldn't reflect the real state of the activity of polyphenol oxidase; second, because of the unsuitable reaction temperature, it couldn't help the enzyme reaction completely; third, adding catechol before centrifuge made a part of product intercepted by precipitation, thus it has poor stability and exhibited small activity of polyphenol oxidase. Based on this method, explored the influences of different factors on the determination of activity of the polyphenol oxidase to optimize the method, including the extraction time, the heat temperature, and the time for adding substrate. The results revealed of the optimum method seems

to be better than before, the optimum process were: extraction 4 h, add catechol after centrifuge, heat at 70 °C in 15 min, and could get higher activity of polyphenol oxidase and had better repeatability, it was more reliable and stable. Also detected 50 wheat varieties by these two methods, and divided special noodles flour into different level by the activity of polyphenol oxidase.

Keywords: polyphenol oxidase; optimum process; grade wheat flour and PPO range

存在于多种植物中的多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 是近年来谷物化学研究的热点之一^[1-2]。小麦中多酚氧化酶催化细胞内的酚类物质氧化生成醌类物质, 醌类物质进一步与其它醌、氨基酸以及蛋白质聚合生成色素类物质, 从而降低了小麦粉的经济价值^[3-4]。尽管小麦粉中 PPO 含量仅占籽粒 PPO 含量的 3% 左右, 但 SvihusB 等^[5]研究发现 PPO 是加工储藏过程中面制食品发生褐变的主要原因之一。葛秀秀等^[6]研究发现籽粒和面粉 PPO 活性与鲜面片和挂面 24 h 亮度 (L^*) 的变化显著相关。因此, 对籽粒和面粉 PPO 活性的抑制应作为面制品品质改良的主要措施之一^[7-8]。

多酚氧化酶活性常用检测方法为耗氧电极法和分光光度法^[8-10], 其中分光光度计法测定具有操作简单、准确性好等特点, 应用范围较广。本研究采用分光光度计法, 选用邻苯二酚为底物, 在参考《粮油检验 小麦粉多酚氧化酶测定》国家标准征求意见稿中小麦多酚氧化酶的测定方法时, 发现该方法测定不同的小麦粉 PPO 活性时其随温度的变化趋势不一致, 原因可能为多酚氧化酶没有充分与底物发生反应, 导致随着温度的升高, 并未呈现上升或下降的趋势。因此, 本研究拟对《粮油检验 小麦粉多酚氧化酶测定》国家标准征求意见稿中 PPO 的浸提时间 (尽量将 PPO 充分提取出来, 然后再与底物反应)、PPO 最佳反应温度 (即充分提取出 PPO 后考察在什么温度下氧化反应最快) 及底物添加时间 (即提取 PPO 后直接加入底物开始反应, 还是离心去杂后再

作者简介:周小玲 (1984—), 女, 湖南省振华食品检测研究院中级工程师, 硕士。E-mail: zxl0810904625@126.com

通讯作者:杨代明

收稿日期:2015-07-15

添加底物进行反应)3个因素进行探讨,以期为PPO活性检测方法提供理论指导和依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

1.1.1 材料与amp;试剂

小麦粉:从研究小麦多酚氧化酶的50个小麦粉中选出的3个具有代表性样品的小麦粉,1#、2#和3#。3个小麦粉采用周麦22磨制而成,主要区别为灰分不同。其他小麦粉均由克明面业股份有限公司提供,分别来自河南、河北、安徽、山东4个省份。

磷酸二氢钠:分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;

磷酸氢二钠、邻苯二酚:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器

数显恒温水浴锅:HH-2型,上海浦东物理光学仪器厂;

恒温培养摇床:THZ-300型,上海一恒科学仪器有限公司;

高速冷冻离心机:Allegra 64R型,美国贝克曼库尔特公司;

紫外可见分光光度计:UV-2450型,日本岛津公司。

1.2 方法

1.2.1 《粮油检验 小麦粉多酚氧化酶测定》国家标准征求意见稿的方法(以下简称征求意见稿) 称取1.5 g小麦粉,放入50 mL锥形瓶中,加入10 mL pH 6.0的0.2 mol/L磷酸氢二钠—磷酸二氢钠缓冲液混合均匀,再加入2 mL 0.1 mol/L的邻苯二酚溶液,放入恒温振荡器中,在37℃下恒温振荡反应15 min,将反应后的样品迅速放入冰水中,在冰箱中冷冻3 min终止反应。然后将样品倒入50 mL离心管中,于冷冻离心机中4℃、10 000 r/min离心5 min,用滤纸过滤后,在410 nm下测定上清液的吸光度,以空白液作为参比对照。

1.2.2 改进方法 称取1.500 0 g小麦粉于150 mL锥形瓶中,加入12 mL的0.2 mol/L磷酸氢二钠—磷酸二氢钠缓冲液(pH 6.0,4℃),迅速地于振荡器上振荡均匀(100 r/min,12 min),然后放置于4℃的冰箱内,浸提4 h。浸提结束后于10 000 r/min,4℃离心15 min,取上清液过滤后置于另一50 mL离心管中,然后加入2 mL 0.1 mol/L的邻苯二酚溶液,放入恒温水浴锅中,于70℃下反应15 min,然后迅速放入冰浴中(0~4℃)冷却5 min终止反应,用蒸馏水将反应液稀释5倍后在410 nm下测定其吸光度值A(A为5 min内吸光度值的变化)。同时以缓冲溶液替代酶液做相同处理,作为空白对照。

1.2.3 多酚氧化酶活力计算 多酚氧化酶活力单位定义为在测定条件下,每克样品每分钟引起吸光度值改变0.001,则定为1个酶活单位[U/(g·min)],样品中的多酚氧化酶的活力按式(1)计算:

$$R = \frac{\Delta A \times N}{0.001 \times W \times t} \quad (1)$$

式中:

R——多酚氧化酶活性,U/(g·min);

ΔA ——反应时间内吸光度值的变化;

N——稀释倍数;

W——试样的重量,g;

t——水浴加热时间,min。

1.2.4 征求意见稿中反应温度的探索 根据《粮油检验 小麦粉多酚氧化酶测定》征求意见稿中“反应温度对PPO活性测定的影响”一节,做探索试验,将酶促反应的温度分别设为37,55,70℃,其余步骤按1.2.1分别测定1#、2#、3#3个不同等级的小麦粉的PPO活性,并连续测定2 d,考察PPO活性与温度的关系。

1.2.5 浸提时间对PPO活性测定的影响 称取1.5 g小麦粉,放入50 mL锥形瓶中,加入10 mL pH 6.0的0.2 mol/L磷酸氢二钠—磷酸二氢钠缓冲液混合均匀后,放置在4℃的冰箱中静置提取。其中浸提时间分别为0,0.25,0.5,1,4,6,16,24,48 h,其余步骤按1.2.1测定PPO活性。

1.2.6 粗酶液离心处理对PPO活性测定的影响 通过1.2.5试验发现,反应液经过离心后颜色变浅,而沉淀颜色则变深,可见反应后再离心可能导致部分反应产物被沉淀带走,因此有必要考察底物添加时间对PPO活性测定的影响。具体操作:①按照1.2.5提取粗酶液4 h,提取完之后离心(10 000 r/min,4℃离心15 min)获得粗酶液,然后添加底物反应,其余步骤按1.2.1测定PPO活性;②按照1.2.5提取粗酶液4 h,然后添加底物邻苯二酚溶液反应,然后离心(10 000 r/min,4℃离心15 min),其余步骤按1.2.1测定PPO活性。

1.2.7 酶促反应温度对PPO活性测定的影响 通过1.2.4的探索试验,发现酶促反应最适温度并非处在37℃,因此有必要重新考察反应温度对PPO活性测定的影响。具体操作:按照1.2.5提取粗酶液4 h,提取完之后离心(10 000 r/min,4℃离心15 min)获得粗酶液,然后添加底物(2 mL 0.1 mol/L邻苯二酚溶液)反应,反应温度分别设为30,37,40,50,60,70,80,90℃,其余步骤按1.2.1测定PPO活性。

1.2.8 改进方法的重复性与再现性验证 重复试验为同一实验室,同一操作人员按照1.2.2测试方法,连续3 d测试1#、2#、3#3个小麦粉的PPO活性;再现性试验为不同实验室,另一位操作人员按照1.2.2测试方法,连续3 d测试1#、2#、3#3个小麦粉的PPO活性。

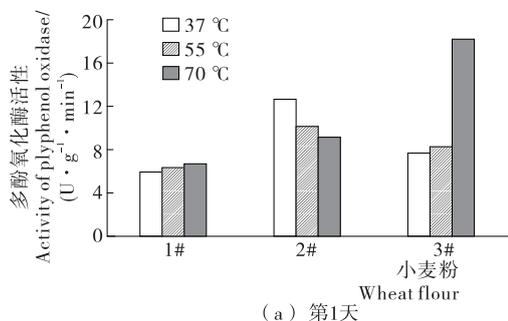
1.2.9 不同检测方法检测PPO的结果比较 采用50个不同产区的面粉按照1.2.1及1.2.2方法检测多酚氧化酶活性。并根据检测结果将面条专用粉的多酚氧化酶进行等级划分。

2 结果与分析

2.1 征求意见稿中反应温度的探讨

《粮油检验 小麦粉多酚氧化酶测定》讨论稿中“反应温度对PPO活性测定的影响”一节中显示PPO活性在35℃左右最高,随着温度的升高PPO活性降低且幅度较大。但通

过探索试验发现 PPO 活性并非随着温度的升高呈降低趋势。由图 1 可知,3 个不同等级的小麦粉无论在第 1 天还是第 2 天检测的结果显示,随温度升高,PPO 活性既有升高也有降低,规律性不显著,由此可见 PPO 活性在 35 °C 左右最高可能有偏差。因此有必要对 PPO 的最适反应温度进行重新探讨。其次从图 1(a)与(b)发现虽然是相同的样品,但是



2 d 检测的结果有很大的差异性,尤其是温度越高,差异性越显著。试验过程中发现随着温度的升高,反应液的颜色越来越深,但经过离心后,颜色又变浅,导致结果变小,因此考虑酶活与温度没有呈现良好关联的原因是反应受到样品中蛋白质等杂质的干扰,并导致连续 2 d 的检测结果重现性不好。因此需要增加去除杂质的离心步骤。

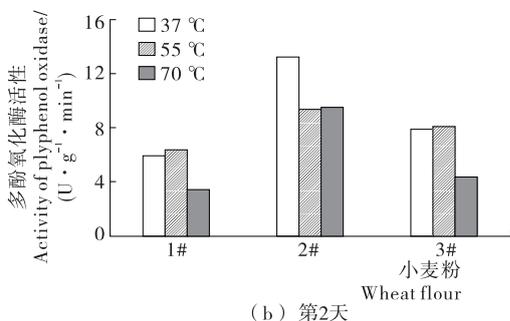


图 1 反应温度与酶活的关系

Figure 1 The relation between the temperature and enzyme activity

2.2 浸提时间对 PPO 活性的影响

由图 2 可知,随着浸提时间的增加,酶活呈上升趋势,可见不浸提粗酶,仅仅依靠反应时的 15 min 边提取边反应是相当不充分的,且存在很大的随意性,导致检测结果的不可靠性。且由图 2 可以得知,2~4 h 是一个飞跃的阶段,变化最大,而浸提时间小于 4 h 或大于 4 h 时,酶活随浸提时间的增加虽然呈上升趋势,但上升缓慢,尤其是 4 h 之后增加趋势更加不显著,因此考虑试验效率及时间成本,将提取时间确定为 4 h。

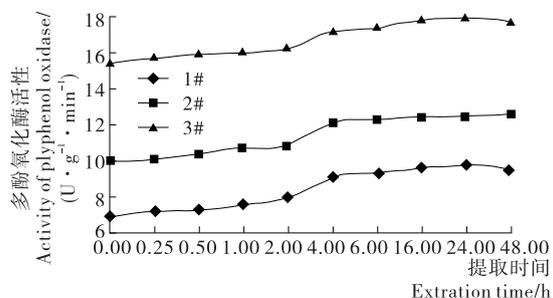


图 2 浸提时间对 PPO 活性的影响

Figure 2 Effect of the extraction time on the activity of polyphenol oxidase

2.3 粗酶液离心处理对 PPO 活性测定的影响

由图 3 可知,先添加底物后离心,得到的溶液颜色明显变浅,沉淀物质的颜色明显变深,酶活较小;先离心后添加底物,酶活则较大。这是因为离心前虽然酶与底物发生了显色反应,但是离心时酶与底物的部分结合产物被蛋白质等杂质或沉淀物吸附而一起被离心出去。随着反应温度的升高,面粉中某些热敏性物质发生受热变性如凝沉、糊化等的情况增加,吸附能力更强。因此当反应温度大于等于 70 °C 时,足以使多数热敏性物质发生变性,从而大大提高了沉淀对酶反应产物的吸附能力。由此可知,检测多酚氧化酶活性时,尤其是在较高的温度下反应,应先将粗酶提取出来进行离心,再添加底物进行反应。

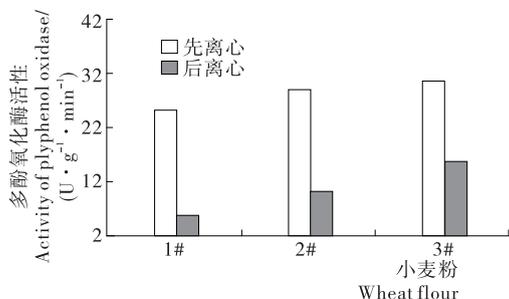


图 3 底物添加时间对 PPO 活性的影响

Figure 3 Effect of time adding substrate on the activity of polyphenol oxidase

2.4 酶促反应温度对 PPO 活性的影响

图 4 展现了酶活随温度的变化趋势。随着温度的升高,酶活呈上升的趋势,具体表现为:在 30~60 °C 时,酶活呈缓慢上升,但 3 个不同等级小麦粉的酶活非常接近,不能充分的反映出不同等级的小麦粉酶活之间的差异;随着温度继续升高至 70 °C,酶活急剧增大,且 3 个小麦粉的酶活形成显著的差异;温度升至 90 °C 后,酶活又开始降低。由此可见 PPO 是耐热性很好的酶,最适反应温度在 70~80 °C。90 °C 时酶活降低的原因可能为酶高温变性所致,因为在试验过程中发现,反应温度升到 90 °C 后,酶与底物反应完成后放置在冰浴

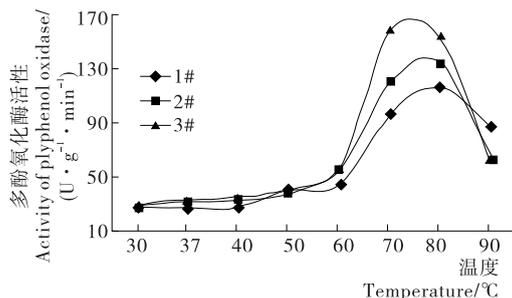


图 4 加热温度对 PPO 活性的影响

Figure 4 Effect of the heat temperature on the activity of polyphenol oxidase

中冷却,出现沉淀,是温度过高导致部分多酚氧化酶发生凝固变性所致。

2.5 改进方法的重复性与再现性验证

2.5.1 重复性验证 按照方法 1.2.2 拟定的检测不再进行独立检测操作,连续 3 d 测定 1#、2#、3# 3 个小麦粉的 PPO 活性,结果见表 1。

表 1 小麦粉 PPO 活性连续 3 d 测定值的精密度

Table 1 The precision of measured PPO activity values in consecutive days

小麦	第 1 天	第 2 天	第 3 天	平均值	标准差 (SD)	相对标准偏差 (RSD)/%
1#	90.99	90.32	94.75	92.02	2.39	2.59
2#	104.67	101.64	107.25	104.52	2.81	2.69
3#	128.51	126.66	129.37	128.18	1.38	1.08

由表 1 可知,在重复性条件下连续 3 d 测定的小麦 PPO 活性比较稳定,标准差 SD 在 1.38~2.81,相对标准偏差 RSD 在 1.08%~2.69%。通常相对标准偏差小于 5%,说明检测结果精密度高。结果表明改进的方法在重复条件下,重复性与稳定性均较好。

2.5.2 再现性验证 由表 2 可知,在再现性条件下连续 3 d 测定的小麦 PPO 活性也比较稳定,标准差 SD 在 2.01~2.29,相对标准偏差 RSD 在 1.58%~2.20%。结果表明改进的方法在再现性条件下,重复性与稳定性均较好。

表 2 再现条件下小麦粉 PPO 活性连续 3 d 测定值的精密度

Table 2 The precision of measured PPO activity values under the reproducing conditions in consecutive days

小麦	第 1 天	第 2 天	第 3 天	平均值	标准差 (SD)	相对标准偏差 (RSD)/%
1#	91.23	93.27	89.26	91.25	2.01	2.20
2#	104.12	108.20	107.96	106.76	2.29	2.14
3#	134.29	130.12	131.89	132.10	2.09	1.58

综上所述,本研究改进的小麦粉多酚氧化酶检测方法在重复条件下测定的结果相对标准偏差不超过 3%,在再现性条件下测定的结果相对标准偏差不超过 3%,可见此方法可信,检测结果可靠。

2.6 不同检测方法检测 PPO 的结果比较

选取 50 种面粉分别采用征求意见稿中的方法与改进方法检测 PPO,并对面条专用粉不同等级面粉的多酚氧化酶活性范围进行分类汇总,结果见表 3。由表 3 可知,对于同一样品,两种方法测得的多酚氧化酶活性值差异显著。征求意见稿中的方法检测值很小,仅为改进方法所测得的 PPO 活性值的 1/20,不同品类的面粉之间 PPO 含量区比较大,因此,采用改进测量小麦粉多酚氧化酶活性结果较为理想。

3 结果与讨论

通过探讨研究,证明 PPO 检测在征求意见稿方法的基础上,还需要延长粗酶液的提取时间,确保小麦粉中的 PPO 充分提取;提取完粗酶后先离心,去除易受高温影响而变性的

表 3 不同品类面粉的多酚氧化酶活性范围

Table 3 The level of different kinds of wheat flour divided by the activity of polyphenol oxidase U/(g·min)

面粉	征求意见稿中的方法	改进方法
超精粉(A1 等级)	≤6	<80
精粉(A2 等级)	6~8	80~95
特一粉(A3 等级)	8~12	95~115
特二粉(A4 等级)	≥12	115~130

物质,防止反应受干扰;选择较适宜的反应温度,确保多酚氧化酶的活性充分发挥。通过重复性试验与重现性试验发现,改进后的方法检测的数值范围较广,能够清晰的划分出不同等级小麦粉 PPO 活性,避免了因吸光度值的微小差异而影响结果;采用征求意见稿中的方法检测的数值很小,在 1 U/(g·min)到 20 U/(g·min)之间,因而要求操作精确,得出的吸光度值非常准确,才可以区分出不同小麦粉间 PPO 的活性差别。

试验证明采用分光光度计在 410 nm 处检测小麦粉多酚氧化酶活性,最佳的测定条件为:料液比 1:8(m:V)、浸提时间 4 h、水浴温度 70 °C、反应时间 15 min、先离心去杂后添加反应底物邻苯二酚。此方法重复性强,重现性好。采用此方法检测 50 个小麦粉的 PPO 活性,并对其按等级进行划分,发现可以很好的区分不同等级的小麦粉,也与做成挂面的色泽变化相一致,表明本研究得到的最佳方法对多酚氧化酶活力的测定结果是稳定可靠的。

参考文献

- 魏益民. 谷物品质与食品加工[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2005: 7~9.
- 刘宏, 汪丽萍, 刘明, 等. 稳定化全麦粉的品质评价[J]. 食品与机械, 2012, 28(2): 6~8.
- 张丹. 小麦制品色泽与多酚氧化酶特性研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2012: 25~32.
- 唐忠. 小麦粉及其制品添加剂的应用[J]. 食品与机械, 1995 (1): 86~89.
- Svihus B, Uhlen A K, Harstad. Effect of starch granule structure associated components and processing on nutritive value of cereal starch[J]. Animal Feed Science and Technology, 2005, 122(3/4): 303~320.
- 葛秀秀. 中国面条颜色及其影响因素研究[D]. 北京: 中国农业科学院作物所, 2003: 23~24.
- 王培慧. 面粉、面色色泽影响因素的研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2012: 19~20.
- 司红起, 马传喜, 王伟. 小麦多酚氧化酶学特性的研究[J]. 粮食饲料与工业, 2008(5): 5~6, 23.
- Lamkin W M, Miller B S, Nelson S W, et al. Polyphenol oxidase activities of Hard Red Winter, Soft Red Winter, Hard Red Spring, White Common, Club, and Durum wheat cultivars[J]. Cereal Chemistry, 1981, 58(1): 27~31.
- 全国粮油标准化技术委员会.《粮油检验 小麦粉多酚氧化酶测定》国家标准征求意见稿[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.