

速冻两个月草莓中多酚氧化酶的研究

张墨英

(培训部)

摘要 用组织化学定位法证实了速冻两个月(-20°C)草莓中存在有活性多酚氧化酶,且主要存在于除去线粒体的上层清液中。用分光光度法测定了它的花色素苷、类黄酮和总酚含量。研究了多酚氧化酶活性的影响因素及最适条件,并测定了 7 种抑制剂对酶活性的影响。

关键词 速冻草莓;组织化学定位法;多酚氧化酶;酶活性;抑制剂

0 前言

多酚氧化酶(PPO[E. C. 1. 10. 3. 1])催化氧化酚类化合物的褐变反应是水果或蔬菜采收后贮藏加工过程中出现的普遍现象,特别在组织受到机械损伤后出现得更迅速。一旦发生褐变,果蔬的外观和品质骤然下降,因此必须采取针对性的措施,防止其褐变。本试验欲通过进一步了解速冻两个月(-20°C)草莓中 PPO 的一些性质,寻找该酶活性的有效抑制剂,为防止贮藏过程中草莓的变质探索有效的途径。

1 实验部分

1.1 实验材料及试剂

1.1.1 材料 草莓品种为宝交早生,1990 年合肥地区产。挑选八九成成熟的新鲜草莓果实,经清洗、消毒后速冻(-20°C)保存两个月。

1.1.2 试剂 1% HCl 甲醇溶液、硼酸钠、EDTA 乙二胺四乙酸、柠檬酸、抗坏血酸、偏磷酸、邻苯二酚、对苯二酚、甲酚、间苯二酚、酪氨酸、各种磷酸缓冲液、重蒸馏水(药品均为分析纯)。

1.2 主要仪器及设备

1.2.1 高速自控组织捣碎机 江苏省盐城龙冈医疗器械厂。

1.2.2 高速离心机 北京医用离心机厂。

1.2.3 754 紫外分光光度计 上海第三分析仪器厂。

1.3 实验内容

1.3.1 PPO 的组织化学定位鉴定 在冰冻条件下切草莓薄片厚度为 1.0~1.5mm 数片,保持温度在 5℃ 以下,切后立即放入置于冰浴内的重蒸馏水中。取出一片投入 0.1mol/L, pH 为 7.2 的磷酸缓冲溶液内在 2~5℃ 放置 5min,将薄片移至 1% 对苯二酚液内,在室温下保温 10h 左右,取出放在玻片上观察(可加入一滴重蒸馏水盖玻片观察),取邻近的片子作为对照材料,对照片子经煮沸 10~15min 杀死组织后按上面反应程序进行试验。以 1% 邻苯二酚液同样进行上面的试验。

在速冻草莓中加 pH6.8 0.05mol/L 磷酸缓冲溶液研磨匀浆,低温下经 3000r/min 离心 5min 得到酶粗提液,再在 10000r/min 离心 10min 得到线粒体沉降颗粒和非线粒体上清液两部分。线粒体用匀浆介质清洗,分别测定它们以邻苯二酚和对苯二酚为底物的多酚氧化酶活性,用分光光度计测定加入底物后 5min 的 A 值(410nm)。

1.3.2 花色素苷、类黄酮、总酚的测定 取速冻草莓自然解冻、捣碎、称取草莓酱 1g 置于烧杯中,加入 1% HCl 甲醇溶液 10ml,杯口蒙以透明纸,置于 32℃ 温箱中浸渍至少 4h,过滤、定容至 250ml,用 1cm 比色皿在 754 紫外分光光度计上比色,于 600nm、530nm(花色素苷)、325nm(类黄酮)、280nm(总酚)测定,以 $\Delta A_{530 \sim 600nm} = 0.1$ 作为花色素苷单位,类黄酮、总酚直接以 A_{325nm}/g 干重、 A_{280nm}/g 干重表示。

1.3.3 PPO 测定

a. 酶液提取、纯化 20g 速冻草莓加 20ml pH6.8 的 0.05mol/L 磷酸缓冲液在 4℃ 下研磨提取,5000r/min 离心 20min,取上清液参照谭兴杰^[1]等所述方法经 75% 硫酸铵沉淀部分纯化,得酶液。

b. 酶对底物专一性 取酶液 5ml,加 0.1 mol/L pH 6.8 磷酸缓冲液 5ml,再迅速加入 0.5mol/L 邻苯二酚 0.5ml,摇匀后在 410nm 处测定 10min,20min,30min 时的吸光度。同样,以对甲酚(0.5mol/L),对苯二酚(0.5mol/L)、酪氨酸(饱和)、间苯二酚(0.5mol/L)为底物进行测定。

c. pH 对酶活力的影响 取 6 份酶液,每份 5ml。同时取 0.5mol/L 对苯二酚溶液 1ml,也为 6 份,混合并分别加入 pH 从 5.8,6.2,6.6,7.0,7.4 到 7.8 的磷酸缓冲液(0.2mol/L)各 2ml,反应 10min,20min,30min,测定在 410nm 的吸光度。

d. 抑制剂对 PPO 活性的影响 以 0.2% 硼酸钠,0.1% EDTA,2% 柠檬酸,0.3% 抗坏血酸,2% 偏磷酸,0.1% EDTA + 0.3% 抗坏血酸,2% 柠檬酸 + 0.3% 抗坏血酸作为 7 组抑制剂,在测定前将 pH6.8,0.05mol/L 磷酸缓冲液 2ml 分别与 1.5ml 每种抑制剂混合,置于 30℃ 水浴中保温。取酶液 5ml,0.5mol/L 对苯二酚溶液 1ml 同时置于 30℃ 环境中保温 5min,迅速混合后于 30℃ 保温 10min,分别和上述 7 种溶液(第 6,7 种抑制剂中两种物质各 1ml)混合,于 410nm 处比色测定,参比液是不加抑制剂的酶。

2 结果与讨论

2.1 酶的组织化学定位鉴定

草莓速冻两个月以后,酶组织化学定位试验结果表明,未煮过的片子颜色为深褐色,且

筋络分明(筋的颜色较深),煮过的邻近片子呈淡肉红色,和切片时颜色相同。说明在有足够的底物存在时,速冻草莓组织中的多酚氧化酶不但存在且具有活性,它能使酚类氧化成醌而呈现褐色(底物为对苯二酚和邻苯二酚时颜色相近)。

表 1 速冻两个月草莓组织多酚氧化酶定位试验

组 分	酶活力单位/(g) ⁻¹ 鲜重(×10 ³ 单位)	
	邻苯二酚(0.5ml/L)	对苯二酚(0.5mol/L)
酶粗提液	50	330
线粒体	20	40
非线粒体上清液	40	320

注:每 min A₄₁₀值改变 0.001 所需酶量确定为一个活力单位,测定温度 30℃

表 1 结果表明,速冻两个月后草莓组织中多酚氧化酶活性主要存在于除去线粒体的上清液中,且底物为对苯二酚时活性较高。本试验是在 10000r/min 离心 10min 沉降线粒体,所得上清液中主要包括微体部分,因此该部分中所表现出的最大酶活性,除了可溶性部分的酶以外,不排除微体中也可能有多酚氧化酶存在。

2.2 花色素苷、类黄酮和总酚含量

表 2 速冻两个月后草莓中花色素苷、类黄酮和总酚含量

	花色素苷 (单位×10/g 干重)	类黄酮 (A _{325nm} /g 干重)	总酚 (A _{280nm} /g 干重)
速冻两个月草莓	2.4	0.07	0.33
新鲜草莓	3.5	0.14	0.48

表 2 结果表明,速冻两个月后草莓中花色素苷、类黄酮、总酚和新鲜草莓比较都有不同程度的降低,说明草莓在速冻期间在多酚氧化酶的作用下发生缓慢氧化。实验发现以 1% HCl 甲醇提取花色素苷后的残渣中保留着不能为其它多种溶剂萃取的少量红褐色物质,其量随果实贮放时间而增多,估计是褐变以后形成的高分子聚合物。

2.3 酶活力分析

2.3.1 底物专一性 根据对底物专一性试验结果(表 3),速冻两个月草莓组织中多酚氧化酶对对苯二酚具有最大的氧化活性,间苯二酚、邻苯二酚氧化活性较低,而对对甲酚、饱和酪氨酸不表现氧化活性。

表 3 速冻两个月后草莓中 PPO 底物专一性试验

底物	酶活性(×10 ³ 单位)
邻苯二酚	50
对苯二酚	350
对甲酚	0
饱和酪氨酸	0
间苯二酚	50

注:每 min A₄₁₀值增加 0.001 所需酶量确定为一个 PPO 活力单位,测定温度为 25℃

在荔枝、蘑菇的酶活性研究中,一般都以邻苯二酚作为 PPO 底物。一般认为,邻苯二酚使酶具有较大活性^[2],而速冻两个月后草莓组织液中表现出对苯二酚使酶具有较大活性,它们对底物专一性的差异说明前者和后者的酶具有不同的结构和成分,从表 3 中可以看出,酶活性较低,说明在冰冻(-20℃)条件下没有使 PPO 失活而只是使它活性降低。

2.3.2 最适 pH 以对苯二酚作为底物,它们的最适 pH 为 7.8,且只有一个活性峰(图 1)。以邻苯二酚为底物,它们有两个活性峰,pH 为 6.2 和 8.2(图 2),说明它们可能有同工酶存在。若 pH<7,可使酶活性降低,因此在草莓的冰冻前处理的工艺中,可加些食用酸来降低 pH 值,有利于抑制酶的活性。

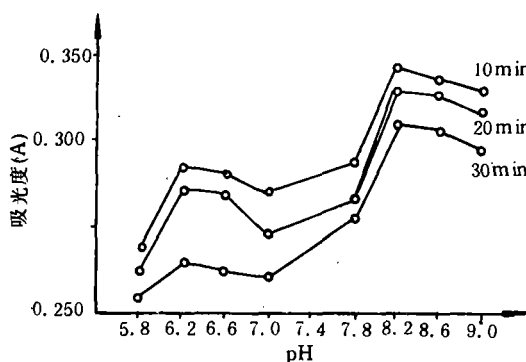


图 1 pH 对酶活力的影响
(底物为对苯二酚)

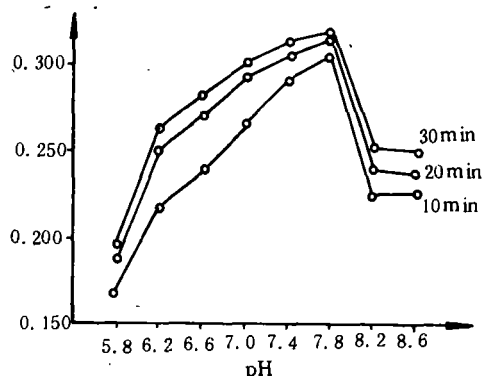


图 2 pH 对酶活力的影响
(底物为邻苯二酚)

2.3.3 抑制剂 在 7 组抑制剂中,它们对 PPO 活性影响见表 4。

表 4 一些抑制剂对速冻两个月后草莓中 PPO 活性影响

抑制剂编号	1	2	3	4	5	6	7	8
抑制%	-6	0.4	-1.6	10.7	19.1	39.8	87.6	0

从表 4 中可以清楚地看出第 7 组抑制剂对 PPO 活性影响最大,同时也可看出,第 4,5,6 三组抑制剂对此酶也有不同程度的抑制作用(对照液 8 无影响)。

草莓组织液发生酶促褐变必须具备三个条件,即有酚类物质、酚酶和氧。要除去基质来防止酚类褐变是不现实的,一般都是以降低酚酶的活性或采取驱氧来防止。在此实验中能起抑制作用的第 4、5、6、7 四组抑制剂中大部分都有抗坏血酸参加,抗坏血酸对抑制褐变有三种作用:一是抗坏血酸氧化酶的基质在酶的催化下,能消耗溶解在汁组织液中的氧,甚至它也可以被多酚氧化酶直接氧化;二是对酚酶辅基铜离子有螯合作用,使其活性降低;三是它能使酚氧化成的醌发生逆反应重新生成酚,使褐变得以防止。在本实验中,第 7 组 2% 柠檬酸+0.3% 抗坏血酸所组成的抑制剂能起最大程度的抑制作用。

3 小 结

本文通过实验证明草莓果实速冻(-20℃)两个月以后还存在有活性的 PPO。据报道^[3]花色苷受酚酶的作用会引起降解,也能导致果蔬质量的降低。本文测定了速冻后草莓果实

中花色素苷、类黄酮和总酚含量,并就此对 PPO 的活性及影响因素作了分析研究,发现草莓在速冻两个月以后以对苯二酚为底物的酶的活性较大,最适 pH 为 7.4~7.8,在所选择的 7 种抑制剂中以 2% 柠檬酸+0.3% 抗坏血酸效果为最好,从而为研究草莓的保鲜技术提供一定的理论依据。

致 谢

本实验得到了安徽省经委食品科技中心检测部全体同志的大力支持,特致谢意。

参 考 文 献

- 1 谭兴杰,李月标.荔枝果皮多酚氧化酶的部分纯化及性质.植物生理学报,1984;10:339~346
- 2 Adnan M Badraw, Dallas E Jones. Nature, 1965;206:622~624
- 3 Mayer A M and Harel E. Polyphenoloxidases in Plants Phytochem, 1979;18:193~215

Studies of Polyphenoloxidase in Quick Freezed Strawberry for Two Months

Zhang Moying

(Dept. of Continuing Education)

Abstract The existence of active polyphenoloxidase in quick freezed strawberry for two months (-20°C) is proved by Organization Chemistry Orientation Method in this paper. This enzyme exists in the supernatant fluid removed mitochondrion principally. The contents of anthocyanidins, flavonoids and total phenols is determined with spectrophotometric method. This paper also studies the factors influencing the activity of polyphenoloxidase and its most appropriate condition, and discusses the influence of seven restrainers on the activity of this enzyme.

Key-words Quick freezed stawberry; Organization chemistry orientation method; Polyphenoloxidase; Enzymic activity; Restrainer