

文章编号 :1009 - 038X(2003)01 - 0007 - 05

苹果中多酚氧化酶的性质

郝慧英, 赵光鳌, 徐岩, 李斌

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 苹果中的多酚氧化酶是引起苹果及苹果酒褐变的重要原因之一, 用乳化剂及酚结合剂从苹果中提取多酚氧化酶(PPO), 研究其酶学性质: 不同底物的 K_m 、 V_m , 反应的最适温度、pH 及两种底物同时存在时的酶学效应。结果表明: 4-甲基儿茶酚为最适底物, 其最适温度 30 °C, 最适 pH 4.5, 不同浓度咖啡酸对酶的影响不同, 儿茶素对不同浓度绿原酸的酶促反应影响也不同。研究几种效应物对酶活力的影响表明: 偏重亚硫酸钠、半胱氨酸、抗坏血酸为强烈抑制剂, 羧酸类对酶具有抑制效应, 肉桂酸比同一结构形式的苯甲酸抑制效果强。

关键词: 苹果; 多酚氧化酶; 褐变; 抑制剂

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

The Characterization of the Apple Polyphenoloxidase

HAO Hui-ying, ZHAO Guang-ao, XU Yan, LI Bin

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Polyphenoloxidase is one of the major factors to cause the browning of apple and ciders. The characteristics of the polyphenoloxidase extracted from the apple fruit by sodium phosphate buffer (0.2 mol/L, pH 6.5) plus the suitable Triton-X100 and PVPP were studied by using spectrophotometry. The best reaction condition is pH 4.5, 30 °C and using 4-methylcatechol as the substrate. The enzymatic reaction is affected by the two-phenolic compound mixture: Caffeic acid affected the PPO activity, and catechin concentration also affected. The enzymatic reaction of the chlorogenic acid. Effect of several substrates on the activity of PPO was studied, and the result showed that L-cysteine, ascorbic acid, and potassium pyrosulfite are the strong inhibitors. Carboxylic acid has the inhibitory effects, and cinnamic acid series has a stronger inhibiting effect than the benzoic acid series having the same structures.

Key words: apple; polyphenoloxidase; browning; inhibitor

苹果中多酚氧化酶是引起苹果及其深加工产品——苹果酒褐变的主要因素之一。苹果品种不同, 酶活不同, 因此要想以更有效的方式控制酶促

褐变, 了解在具体储藏条件下的褐变机理需要对酶特性有更深入的了解。利用乳化剂(Triton-X₁₀₀)和酚结合剂-聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)相结合的方式提

收稿日期: 2002-08-29; 修回日期: 2002-09-30.

基金项目: 国家科技部“十五”重点项目(2001BA501A0F).

作者简介: 郝慧英(1975-), 女, 河北石家庄人, 发酵工程硕士研究生。

取 PPO, 解决了单纯用丙酮粉预处理而导致的酶特性的改变^[1]. 由于 PVPP 的使用, 避免了酶的粗提物中内源性物质和醌的存在, 减少了其同酶的反应而导致的酶失活.

酶促作用的底物不同, 引起褐变的程度也不同. 目前报道较多的是苹果中多酚氧化酶对单个底物的作用, 对两种底物同时存在时, PPO 对其协同作用的酶促氧化动力学研究甚少.

作者主要研究了酶的性质和两种多酚底物同时存在时, 酶对底物协同影响的作用, 从而更加清楚了解褐变同底物及酶的关系, 并且对不同抑制剂的抑制效应进行了初步研究.

1 材料与方法

1.1 材料

样品: 市场选购精品红富士苹果; 仪器: UV-3000 紫外可见分光光度计, 日本东芝公司制造; pH-S 酸度计, 上海轻工机械厂产品; HIMOL/LAC Centrifuge SCR20BC 高速离心机, 日本日立公司制造.

1.2 方法

1.2.1 PPO 的抽提 称取 20~30 g 去皮的苹果, 溶于 0.2 mol/L 磷酸缓冲液中(含适量的 PVPP 和 Triton-X₁₀₀)用高速打浆机粉碎, 在 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 30 min, 用干酪布过滤. 在上清液中缓慢加入 1.6 倍体积的冷冻丙酮(-13 °C), 9 000 r/min 中冷冻离心 15 min, 将沉淀物溶于含适量 Triton-X₁₀₀ 的 0.2 mol/L 磷酸缓冲液中, 再次离心, 上清液在 -40 °C 冷藏至少一周.

1.2.2 PPO 活性的测定 于 25 °C、pH 6.5 时, 在给定的波长条件下, 用双光束 UV-3000 光电检测器测量通过吸收速率的提高来检测酶活. 酶活单位: 在测定条件下, 吸收值变化 0.001 个单位定义为一个酶活. 儿茶酚、(+)-儿茶素、4-甲基儿茶酚、L-酪氨酸分别采用波长 420 nm, 绿原酸采用 400 nm. 反应混合物中含 3.0 mL 的底物溶液和不同量的酶, 空白样中只含底物溶液. 活性曲线的直线部分作为时间函数来衡量酶活($U(\text{mL} \cdot \text{min})$). 反应速度为单位时间内酶活的变化量. 当出现延迟阶段时, 反应速率由延迟阶段之后的部分进行测量.

1.2.3 酶活影响因素测定

1) pH 对酶活影响 配制 0.05 mol/L 磷酸缓冲液, pH 分别为 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 以 20 mmol/L 4-甲基儿茶酚为底物, 用上述方法测定多酚氧化酶的酶活.

2) 温度对酶活的影响 配制 0.05 mol/L pH 4.5

的磷酸缓冲液, 分别在不同的温度: 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C 等, 分别相隔 5 °C 直至 80 °C, 以 20 mmol/L 4-甲基儿茶酚为底物, 测定多酚氧化酶的酶活.

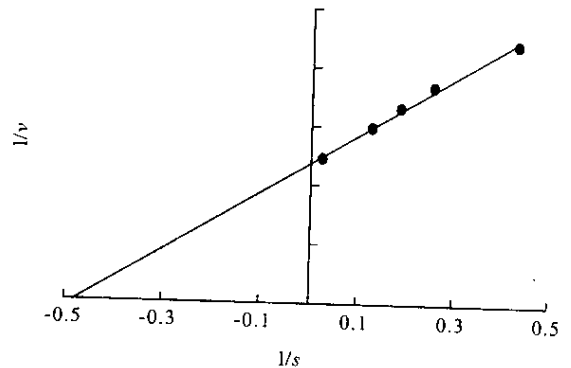
3) 两种底物同时存在时对酶促反应的影响 配制不同浓度的 4-甲基儿茶酚溶液, 分别含有 0, 0.25, 0.5, 1 mmol/L 咖啡酸, 在最适条件下测定多酚氧化酶的酶活; 配制不同浓度的绿原酸溶液, 分别含有 0, 2.5, 5 mmol/L 儿茶素, 在最适条件下测定多酚氧化酶的酶活.

4) 抑制剂对酶活的影响 以 20 mmol/L 4-甲基儿茶酚为底物, 在最适条件下测定不同抑制剂对多酚氧化酶的抑制效应.

2 结果与讨论

2.1 不同底物的动力学参数测定

以不同底物测定酶促反应的动力学性质, 以 4-甲基儿茶酚为例, 其米氏方程见图 1.



V 为反应速度; S 为底物浓度

图 1 4-甲基儿茶酚的米氏方程 (pH 6.5, 25 °C)

Fig.1 The Michaelis-equation of the 4-methylcatechol in pH 6.5, 25 °C 条件下, 测定不同底物的 K_m (mmol/L), V_m ($\Delta U/\text{min}$) 结果见表 1.

表 1 在 pH 6.5, 25 °C 条件下, 测定不同底物的 K_m (mmol/L), V_m ($\Delta U/\text{min}$)

Tab.1 K_m, V_m values under different substrates, pH 6.5, 25 °C

底物	K_m (mmol/L)	V_m ($\Delta U/\text{min}$)	V_m/K_m
4-甲基儿茶酚	2.0776	84.81	40.82
儿茶酚	58.53	294.12	5.025
儿茶素	3.7875	125	33.003
表儿茶素	0.634	21.24	33.51
绿原酸	6.2539	212.76	34.02
L-酪氨酸	-	-	-

表 1 表明,对于苹果中的多酚氧化酶,不同底物的 K_m , V_m 不同.多酚氧化酶对表儿茶素的亲和力最大(K_m 最小),其次是 4-甲基儿茶酚、儿茶素和绿原酸.但表儿茶素的 V_m 却最小,只有 21.24 U/min.综合考虑 V_m 与 K_m ,4-甲基儿茶酚以 V_m/K_m 最大,其次绿原酸、表儿茶素和儿茶素(其中绿原酸、表儿茶素在苹果中的含量丰富),酪氨酸是苹果中多酚氧化酶的较差底物.以 4-甲基儿茶酚为底物研究苹果中多酚氧化酶的性质.

2.2 pH 对多酚氧化酶的影响

以 4-甲基儿茶酚为底物,25 °C 测定不同 pH 时多酚氧化酶的活性,结果见图 2.

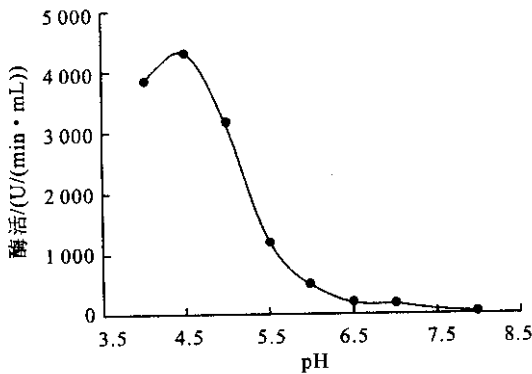


图 2 酶活随 pH 变化

Fig.2 The change of the activity with pH(4-Methylcatechol as the substrate)

从图 2 可以看出,多酚氧化酶的活性对 pH 变化较为敏感,以 4-甲基儿茶酚为底物时,苹果中多酚氧化酶的最适 pH 约为 4.5,这同苹果本身的 pH 接近,可以看出苹果中的多酚氧化酶似乎耐酸能力较强.调节 pH 能有效抑制酶的活性.如图 3 所示,苹果中多酚氧化酶的最适温度为 30 °C.

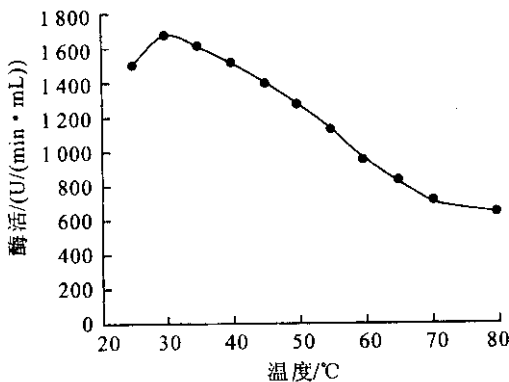


图 3 温度对(4-甲基儿茶酚为底物)酶的影响

Fig.3 The change of the activity with temperature(4-Methylcatechol as the substrate)

万方数据

2.3 两种底物同时存在时多酚氧化酶对其氧化的协同作用

2.3.1 不同浓度的咖啡酸对 4-甲基儿茶酚酶促反应的影响 以 4-甲基儿茶酚为底物,在其最适 pH、最适温度测定咖啡酸存在时,其对多酚氧化酶的影响见图 4.

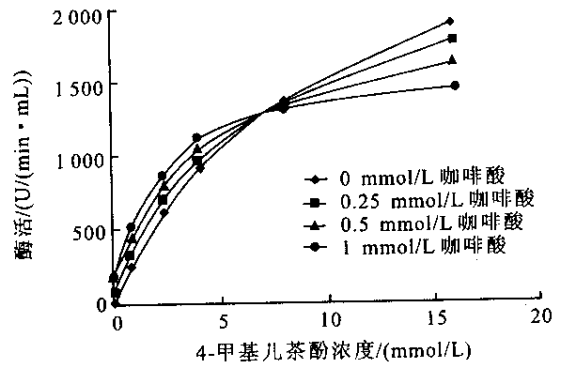


图 4 咖啡酸对 4-甲基儿茶酚酶促反应的影响

Fig.4 The effect of caffeic acid on the enzymatic reaction of the 4-Methylcatechol

从图 4 可以看出,不论咖啡酸含量如何,随着 4-甲基儿茶酚的增大,相对酶活逐渐上升.在 4-甲基儿茶酚较低时,随着咖啡酸含量的增大,酶活上升较快,而在其含量较高时,随着咖啡酸含量的增加,相对酶活上升幅度反而减小.据报道^[3],咖啡酸是 4-甲基儿茶酚酶促氧化的竞争性抑制剂.

2.3.2 在儿茶素和绿原酸值间的相互影响 以绿原酸为底物,在 pH 4.5,30 °C 时测定儿茶素对多酚氧化酶的影响,结果见图 5.

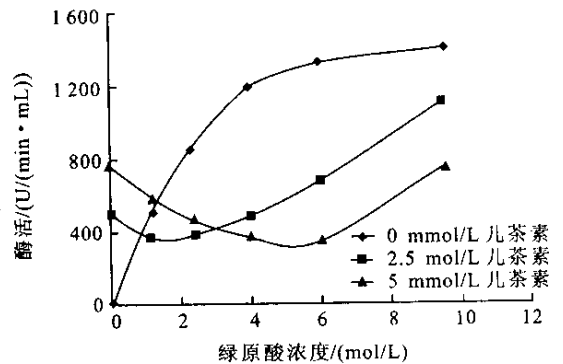


图 5 儿茶素对绿原酸酶促反应的影响

Fig.5 The effect of catechin on the enzymatic reaction of the chlorogenic acid

从图 5 可以看出,在儿茶素浓度不变时,随着绿原酸浓度的增加,其相对酶活随之下降,当下降到一定程度时,随着绿原酸浓度的增加,相对酶活又逐渐上升.

综合图 4、5 可以看出,多酚氧化酶的酶促反应

程度不仅同单个酚的浓度有关,还同两种酚之间的相对浓度有关.

2.4 对酶的抑制效应

根据 Mayer 和 Harel 的报道^[4],多酚氧化酶抑制可分为两大类:一类是同酶的铜离子相互作用,从而降低了酶活;另一类是影响酚类底物的活性部位,从而降低酶活.第一类抑制剂主要是通过铜离子螯合,从而抑制了酶活,例如:叠氮化合物、氰化物等.在第二类抑制剂中,国外已对羧酸类中的苯甲酸和肉桂酸系列的芳香酸进行了广泛的研究,发现这些物质同酚类底物结构类似,属于多酚氧化酶的竞争性抑制剂,但一些文章认为,抑制的类型属于竞争性、非竞争性或混合性,主要依赖于用来检测的底物.另外一些还原性物质抑制酶促褐变,例如 SO₂(实验中以偏重亚硫酸钾计)、半胱氨酸、VC 和硫醇类化合物,它的主要效果或者是将 O-醌还原成 O-二羟基酚例如 VC,或者是同 O-醌形成无色物质例如 SO₂ 和硫醇类化合物.根据 Khan 报道,氨基酸中的半胱氨酸,通过同铜离子结合可形成稳定的化合物.SO₂ 是一个例外,它可直接引起多酚氧化酶的不可逆失活,VC 和硫醇类化合物对酶抑制时酶保持了部分活性.

2.4.1 VC、半胱氨酸和 SO₂ 等抑制剂对多酚氧化酶的影响 底物为 20 mmol/L 4-甲基儿茶酚,在 30 °C, pH 4.5 时测定不同抑制剂对多酶氧化酶的抑制作用,结果见图 6.

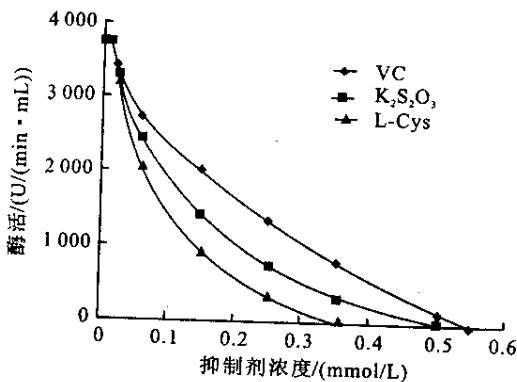


图 6 抑制剂对酶活的影响

Fig. 6 The inhibitory effects of the ascorbic acid, potassium and L-cysteine on the polyphenoloxidase

从图 6 可以看出,在抑制剂浓度相同时,按还原剂反应颜色形成的抑制效果,依偏重亚硫酸钾、半胱氨酸和 VC 的顺序下降,而且,通过对酶活的检测,当抑制剂浓度达到 0.5 mmol/L 时,酶的相对活性几乎都达到 0.用分光光度计测定酶活时,随着抑制剂含量的增加,其滞后阶段越长,随着滞后阶段的延长,相对酶活越来越小.

2.4.2 羧酸类对多酚氧化酶的抑制 以 4-甲基儿茶酚为底物,分别测定苯甲酸系列和肉桂酸系列对多酚氧化酶的抑制效应,结果见图 7,8,结构式见图 9.

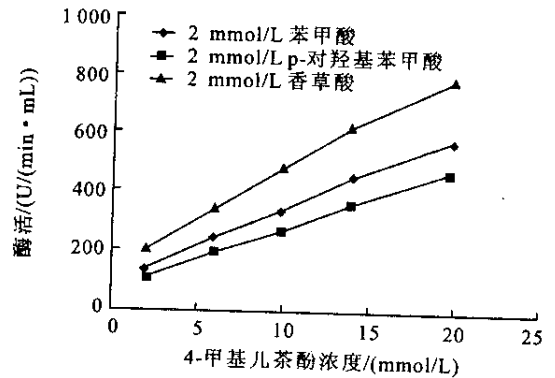


图 7 苯甲酸系列对多酚氧化酶的抑制

Fig. 7 The inhibition of the benzoic series to the polyphenoloxidase

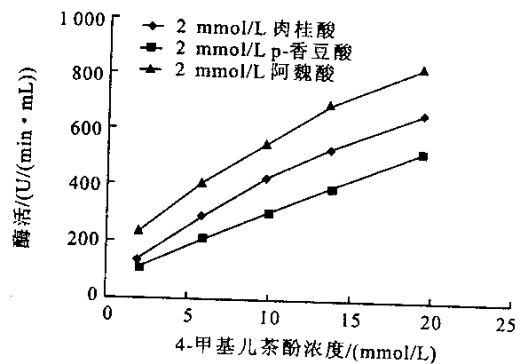
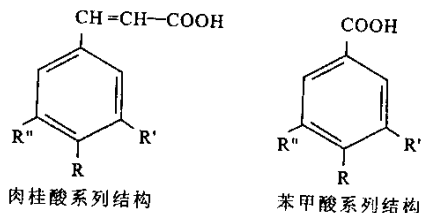


图 8 肉桂酸系列对多酚氧化酶的抑制

Fig. 8 The inhibition of the cinnamic series to the polyphenoloxidase

从图 7,8 可以看出,在两个系列中,含对羟基的底物强化了其对酶的抑制效应,而在邻位上含有甲氧基时,降低了酶同抑制剂的结合.



肉桂酸(R = H, R' = H, R'' = H) 苯甲酸(R = H, R' = H, R'' = H)
p-香豆酸(R = H, R' = H, R'' = H) 对羟基苯甲酸(R = H, R' = H, R'' = H)
阿魏酸(R = H, R' = H, R'' = H) 香草酸(R = H, R' = H, R'' = H)

图 9 肉桂酸系列同苯甲酸系列相对应各种物质结构
Fig. 9 The substrate structures of the benzoic series and cinnamic series

苯甲酸系列同肉桂酸系列比较结果见图 10.

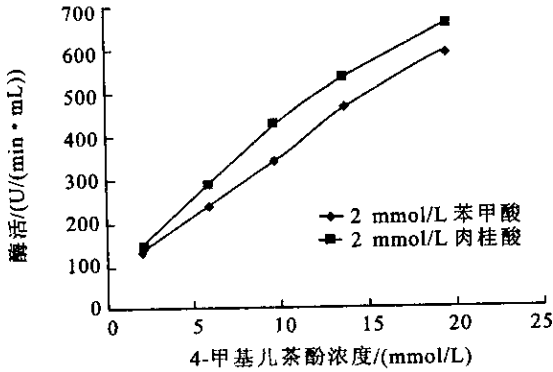


图 10 苯甲酸同肉桂酸对多酚氧化酶抑制的比较

Fig.10 The comparison of the benzoic series with the cinnamic series on PPO inhibition

从图 10 可以看出,肉桂酸比相应苯甲酸系列更能抑制多酚氧化酶的活性.据报道^[4],所有的芳香类羧酸都是酶的竞争性抑制剂,山梨酸同苯甲酸竞争性抑制剂有相似的抑制效果.因此,苯环可能不是造成有抑制效果的绝对结构,因其可被共轭双

键代替^[4].

3 结 论

1) 综合考虑 K_m , V_m , 苹果中多酚氧化酶的最适底物为 4-甲基儿茶酚,最适 pH 为 4.5,最适温度为 30 °C.

2) 多酚氧化酶对多酚的氧化是引起水果及其成品、半成品褐变的主要因素之一,通过对两种底物同时存在时多酚氧化酶活性的研究,发现褐变程度不仅依赖于多酚的浓度和多酚氧化酶的活性,而且还依赖于天然存在于产品中的酚类及其之间的相对浓度.

3) 芳香类羧酸对多酚氧化酶有抑制作用,肉桂酸系列比类似结构的对应苯甲酸系列对多酚氧化酶有较强的抑制作用.

4) 一些还原性的物质例如 SO_2 、半胱氨酸、VC 和硫醇类化合物也能抑制褐变,其中偏重亚硫酸钾抑制褐变的能力较强.

参考文献:

- [1] Ada Men Rocha. Characterisation of 'starking' apple polyphenol oxidase[J]. *J Sci Food Agric*, 1998, 77: 527-534.
- [2] Amiot M J, Tacchini M. Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity[J]. *J Food Sci*, 1992, 57(4): 958-962.
- [3] Arturo H, Janovitz-Klapp. Kinetic studies on apple polyphenol oxidase[J]. *J Agric Food Chem*, 1990, 38(7): 1437-1441.
- [4] Arturo H, Janovitz-Klapp. Inhibitions studies on apple polyphenol oxidase[J]. *J Agric Food Chem*, 1990, 38(5): 926-931.
- [5] 黄建韶,张宏,田宏现.苹果中多酚氧化酶的性质[J]. *食品与机械*, 2001, 38(3): 31-32.

(责任编辑 杨 萌)