

# 基于多酚氧化酶活性的苦杏仁酶促褐变化学控制研究

张清安<sup>1\*</sup>, 范学辉<sup>1,2</sup>, 申 辉<sup>1</sup>, 史美娜<sup>1</sup>, 田呈瑞<sup>1</sup>

<sup>1</sup>陕西师范大学食品工程与营养科学学院; <sup>2</sup>陕西师范大学生命科学学院, 西安 710062

**摘要:** 为了有效控制苦杏仁加工中的酶促褐变, 本研究以经 Sephadex LH-20 纯化分离的苦杏仁多酚氧化酶为对象, 研究了常见的酶促褐变化学抑制剂—抗坏血酸、半胱氨酸、柠檬酸、亚硫酸钠和偏重亚硫酸钠对苦杏仁多酚氧化酶活性的影响。结果表明, 所选用的各种化学抑制剂均具有一定的抑制苦杏仁多酚氧化酶活性的效果, 在试验范围内呈量效关系; 其中, 抗坏血酸、半胱氨酸和柠檬酸对苦杏仁多酚氧化酶活性的抑制效果要优于亚硫酸钠和偏重亚硫酸钠, 可以用来对苦杏仁加工中的酶促褐变进行控制。

**关键词:** 苦杏仁; 多酚氧化酶; 褐变; 控制

中图分类号: TS255. 6

文献标识码: A

## Control of Enzymatic Browning by Chemical Inhibitors Based on the Activity of Polyphenol Oxidase from Apricot Kernel

ZHANG Qing-an<sup>1</sup>\*, FAN Xue-hui<sup>1,2</sup>, SHEN Hui<sup>1</sup>, SHI Mei-Na<sup>1</sup>, TIAN Chen-ru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China;

<sup>2</sup>School of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

**Abstract:** In this paper, the crude extracts of Polyphenol Oxidase (PPO) from Apricot kernel were purified by column chromatography stuffed with Sephadex LH-20, and then the inhibition of PPO activity was studied by chemical inhibitors like ascorbic acid, cysteine, citric acid, sodium sulfite and sodium metabisulfite in order to control the enzymatic browning during the industrial processing of Apricot kernel. The results show that all the inhibitors chosen had good inhibitions on the PPO activity within the conditions tested, and there was a good relationship between the dose and its effect. Among the chemical inhibitors, the inhibiting effect of ascorbic acid, cysteine and citric acid on the PPO activity was better than that of sodium sulfite and sodium metabisulfite, which may be used to control the enzymatic browning in Apricot kernel processing industry.

**Key words:** apricot kernel; polyphenol oxidase; browning; control

褐变是食品加工、贮藏过程中常见的现象, 虽然这样的反应更多时候不是我们所期望的, 但出于食品加工的需要有时还必须有这样的反应发生, 如焙烤行业等。一般来说, 食品加工中的褐变可以分为酶促褐变和非酶促褐变两类。酶促褐变是指由多酚氧化酶催化下多酚类化合物的氧化反应。由于水果、蔬菜中含有丰富的酚类物质和酚类氧化酶类, 所以酶促褐变是该类食品加工、贮藏过程中的主要褐变类型; 对于酶促褐变主要从钝化多酚氧化酶活性、减少氧气和底物含量等方面入手进行解决<sup>[1]</sup>。

目前, 对食品加工过程中的酶促褐变机理和控制措施研究较多<sup>[2-4]</sup>, 但未见到杏仁加工过程中酶促褐变机理及其控制的相关研究, 有限研究也仅限于杏果及其加工产品<sup>[5-9]</sup>。在我国对于杏仁的加工较为粗放, 缺乏对其进行精深加工及综合利用, 杏仁产量的 80% 左右以原料形式卖出。对于杏仁产品(杏仁罐头、杏仁露)的加工, 去除杏仁种皮是必经工序。但由于苦杏仁中含有的酚酸类物质和多酚氧化酶会在去皮后迅速氧化褐变, 从而影响杏仁的营养和经济价值, 因此褐变控制已成为制约苦杏仁深加工产业的瓶颈和急需突破的关键技术。

鉴于国内外尚无有关苦杏仁去皮过程中褐变及控制方面的研究报道, 本研究以苦杏仁多酚氧化酶活性控制为目标, 尝试用不同化学抑制剂研究其对苦杏仁多酚氧化酶活性的抑制效果, 以期为解决杏

收稿日期: 2013-10-25 接受日期: 2014-01-31

基金项目: 国家自然科学基金(31101324); 陕西省自然科学基金(2011JQ2003); 中央高校基本科研业务费专项资金(GK201302039 GK201404006)

\* 通讯作者 E-mail: qinganzhang@snnu.edu.cn

仁去皮加工过程中的酶促褐变控制提供理论依据和参数,进而带动杏仁加工产业的快速发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

苦杏仁购自西安市西北药材市场。

硫酸铵、氢氧化钠、邻苯二酚:天津市科密欧化学试剂有限公司产品;磷酸氢二钾、乙酸钠钾、乙酸钠:天津市天力化学试剂有限公司产品;磷酸二氢钾:天津市登丰化学品有限公司;冰乙酸:天津市富宇精细化工有限公司产品;无水乙醇、丙酮、柠檬酸、抗坏血酸、半胱氨酸、亚硫酸钠和偏重亚硫酸钠:西安化学试剂厂产品;以上试剂均为分析纯。

Sephadex LH-20:高效分离的凝胶介质,北京楚德易科技有限责任公司;PVP K30:聚乙烯吡咯烷酮 K30,由德国 BASF 公司进口分装上海蓝季科技发展有限公司代理销售。

### 1.2 仪器设备

电子天平(PL203):梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产品;HH-SA 电热恒温水浴锅:北京科伟永兴仪器有限公司产品;TU-1810 紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司产品;真空冷冻干燥机:Alpha-4 真空冷冻干燥机:德国 christ 公司;TGL-16G 冷冻离心机:上海安亭科学仪器厂产品;FW400A 万能粉碎机:北京科伟永兴仪器有限公司;PHS-3C pH 计:上海(雷磁)仪电科学仪器股份有限公司。

### 1.3 研究路线

苦杏仁→粉碎→加丙酮→真空抽滤→收集滤渣→缓冲液溶解滤渣提取多酚氧化酶→离心→收集上清液加饱和硫酸铵→离心收集沉淀→冷冻干燥→柱层析→收集酶液→研究化学试剂的抑制作用。

### 1.4 苦杏仁多酚氧化酶的提取

将经  $(-28 \pm 0.5)^\circ\text{C}$  冷冻处理掉的苦杏仁与 PVPK30(酚类物质去除剂<sup>[10]</sup>)按 100:1(g/g)比例一起粉碎后,快速取出放入预冷丙酮中;在低温下处理 1 h 后用布氏漏斗抽滤,直至成为白色粉末。

称取 100 g 上述白色苦杏仁粉末与 500 mL 磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L pH 7.00)混匀,提取一定时间后以 3000 rpm 离心 15 min<sup>[11,12]</sup>;取上清液用 40% 硫酸铵于 4 °C 下盐析,后以 11000 rpm 离心 10 min 收集沉淀并于真空下冷冻干燥,即得苦杏仁多酚氧化酶粗提物,低温保存待用。

### 1.5 苦杏仁多酚氧化酶的纯化

以 Sephadex LH-20 作为柱填料(1.6 × 20 cm)对粗酶提取物进行层析纯化,用 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.00)洗脱,流速为 0.5 mL/min,收集流出液(1-60 管,每管 5 mL),然后分别测定每一管流出液的酶活性和 280 nm 处的吸光值。

酶活力测定:将 2.0 mL 磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L pH 7.00)和 0.5 mL 1.0 mol/L 邻苯二酚溶液加入比色皿中,混匀后再加入 0.1 mL 酶液迅速震荡,后在 410 nm 处记录其 3 min 内吸光值的变化,每 15 秒记录一次。以吸光值增加的最初直线部分计算酶活力,一个酶活力单位 U 定义为在测定条件下 1 min 引起 0.001 个吸光值的改变<sup>[1,7]</sup>。

### 1.6 几种化学物质对苦杏仁 PPO 活性的影响

分别配制浓度为 0.01%、0.02%、0.03%、0.05%、0.10% 和 0.50% 的抗坏血酸溶液,然后按照酶活力测定方法另外加入 0.3 mL 抗坏血酸溶液,并以未加入化学抑制剂时的酶活力为 100% 计算加入抑制剂后的相对酶活力,研究化学抑制剂对苦杏仁多酚氧化酶活力的影响效果。

按照上述方法分别配制浓度为 0.05%、0.10%、0.20%、0.50%、1.00% 的半胱氨酸溶液;0.10%、0.20%、0.30%、0.50%、1.00% 的柠檬酸溶液;0.50%、1.00%、1.50%、2.00%、5.00% 的亚硫酸钠溶液;0.50%、1.00%、1.50%、2.00%、5.00% 的偏重亚硫酸钠溶液;分别研究其对苦杏仁多酚氧化酶活性的影响。

### 1.7 数据处理

实验数据均是三次测定结果的平均值,并采用 SPSS 软件进行统计学处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 苦杏仁多酚氧化酶柱层析纯化结果

由图 1 可知,柱子经平衡除杂后所接前 5 管洗

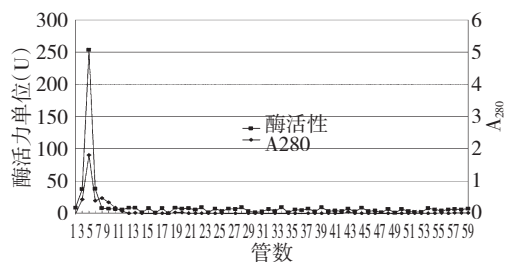


图 1 苦杏仁多酚氧化酶柱层析纯化图

Fig. 1 Purification of PPO by Sephadex LH-20 column

脱液中多酚氧化酶的相对活力较高,其变化与对应的  $A_{280}$  值一致,说明经柱层析后苦杏仁多酚氧化酶相对较纯;经与纯化前活性比较,纯化后活性提高了近 30 倍,说明该方法适合用于纯化苦杏仁多酚氧化酶。收集经纯化的酶液留作后续实验用。

## 2.2 不同化学试剂对苦杏仁 PPO 活性的影响

### 2.2.1 不同浓度抗坏血酸对苦杏仁 PPO 活性的影响

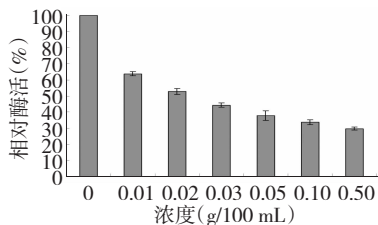


图 2 不同浓度抗坏血酸对苦杏仁 PPO 活性的影响

Fig. 2 Effect of ascorbic acid concentrations on the PPO relative activities

图 2 结果表明,随着抗坏血酸浓度的增大,苦杏仁多酚氧化酶的相对活性降低,呈量效关系;抗坏血酸浓度达 0.5% 时,苦杏仁多酚氧化酶相对活性不足 30%,说明抗坏血酸可以抑制多酚氧化酶的活性,从而用于有效抑制苦杏仁加工过程中的酶促褐变。抗坏血酸对 PPO 体系的作用机理是多方面的,既可以整合 PPO 活性中心的铜离子,又可以将 O-醌还原成 O-二羟基酚,甚至还可以被 PPO 直接氧化,表现为竞争性抑制作用<sup>[2,4]</sup>。

### 2.2.2 不同浓度半胱氨酸对苦杏仁 PPO 活性的影响

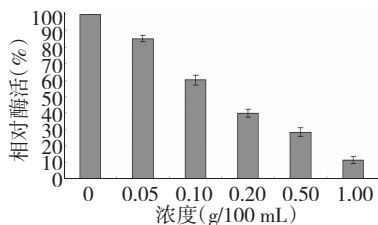


图 3 不同浓度半胱氨酸对苦杏仁 PPO 活性的影响

Fig. 3 Effect of cysteine concentrations on the PPO relative activities

图 3 结果表明,半胱氨酸的浓度与苦杏仁多酚氧化酶的相对活性呈显著负相关,即随着半胱氨酸浓度的增大苦杏仁多酚氧化酶相对酶活力逐渐降低,当浓度达到 1% 时 PPO 酶活力的 90% 被抑制,因此该浓度的半胱氨酸可以用于抑制苦杏仁加工时的酶促褐变。半胱氨酸作为一种还原剂,既能消耗

植物组织中的氧,又可与酶促褐变底物反应生成的醌类化合物进行加成,使其不再进一步形成黑色素,从而抑制褐变程度的加深<sup>[4]</sup>。

### 2.2.3 不同浓度柠檬酸对苦杏仁 PPO 活性的影响

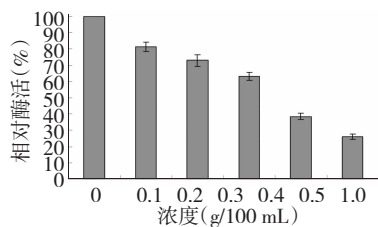


图 4 不同浓度柠檬酸对苦杏仁 PPO 活性的影响

Fig. 4 Effect of citric acid concentrations on the PPO relative activities

大多数多酚氧化酶在 4.0 以下的 pH 时几乎完全失去活性,因此可以利用调酸降低 pH 的方法对酶促褐变进行抑制。由图 6 结果可以看出,适当浓度的柠檬酸可以有效抑制苦杏仁 PPO 的活性,用作果蔬加工的护色剂,其作用机理是使 PPO 偏离其最适 pH,同时其三个羧基也能够整合 PPO 活性中心的铜离子<sup>[2,7]</sup>。

### 2.2.4 不同浓度亚硫酸钠对苦杏仁 PPO 活性的影响

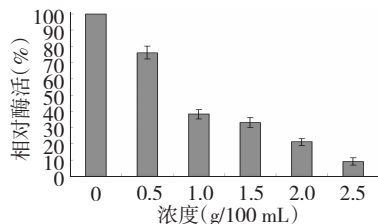


图 5 不同浓度亚硫酸钠对苦杏仁 PPO 酶活性的影响

Fig. 5 Effect of sodium sulfite concentrations on the PPO relative activities

图 5 结果表明,各浓度亚硫酸钠溶液均具有一定的抑制苦杏仁 PPO 活性的作用,浓度与酶活力的抑制呈量效关系;其抑制机理一方面是由于亚硫酸

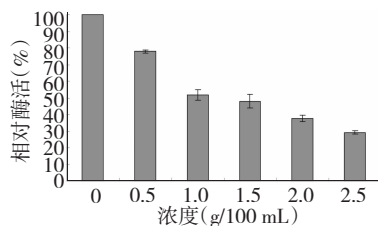


图 6 不同浓度偏重亚硫酸钠对 PPO 活性的影响

Fig. 6 Effect of sodium metabisulphite concentrations on the PPO relative activities

钠中 SO<sub>2</sub> 对酶的直接抑制作用,另一方面是其还原作用;此外,它与羰基的加成也限制了羰基化合物进一步聚合褐变<sup>[4,8]</sup>。

### 2.2.5 不同浓度偏重亚硫酸钠对苦杏仁 PPO 活性的影响

由图 6 结果可以看出,苦杏仁多酚氧化酶活性受到不同程度抑制,且偏重亚硫酸钠浓度与酶活力的抑制程度呈正相关,即浓度越大酶活力降低越多(被抑制程度越大)。相比较而言,同浓度的亚硫酸钠对苦杏仁多酚氧化酶活力的抑制效果要好于偏重亚硫酸钠。

## 3 结论

褐变是食品加工中常见的现象,其中有些褐变是加工者不希望发生的,如果蔬加工过程中的酶促褐变。苦杏仁中含有丰富的酚类物质和多酚氧化酶,在加工中一旦苦杏仁皮退去后,杏仁中的多酚氧化酶、酚类物质就会在氧气的作用下发生酶促褐变,从而影响杏仁产品的质量,所以如何有效对苦杏仁中多酚氧化酶活性进行抑制是解决苦杏仁加工中酶促褐变的关键。本研究针对几种化学抑制剂对苦杏仁多酚氧化酶活性的影响首次开展了研究,结果表明可以用 Sephadex LH-20 对苦杏仁 PPO 进行有效的纯化分离;在所选用的化学抑制剂中,抑酶效果与浓度呈正相关,相比较而言,实验条件下抗坏血酸、半胱氨酸和柠檬酸的抑酶效果要比亚硫酸钠、偏重亚硫酸钠的效果好。

### 参考文献

- 1 Wang Z(王璋). Food Enzymology. Beijing: China Light Industry Press, 1990.
- 2 Shen JY(沈金玉), Huang JY(黄家音), Li XL(李晓莉). Advances in research on mechanism of enzymatic browning and inhibition methods for fruits and vegetables. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2005, 26: 150-156.
- 3 Kang ML(康明丽), Mou DH(牟德华). Study on browning Chinese chestnut during the processing and its inhibition. *J Hebei Univ Sci Tech*(河北科技大学学报), 2003, 4: 72-76.
- 4 Sun ZY(孙芝杨), Qian JY(钱建亚). Progress in mechanism of enzymatic browning and its inhibition of fruits and vegetables. *Food Nutri in China*(中国食物与营养), 2007, (3): 22-24.
- 5 Özdemir M, Seyhan FG, Bakan AK, et al. Analysis of internal browning of roasted hazelnuts. *Food Chem*, 2001, 73: 191-196.
- 6 Zhang JF(张京芳), Chen JP(陈锦屏), Tian CR(田呈瑞). Studies on Apricot browning control with different treatments. *Acta Univ Agric Boreali-occidentalis*(西北农业大学学报), 1997, 25(2): 94-98.
- 7 Ci ZJ(慈志娟). Study on mechanism of enzymatic browning and fruit suitability for juicing of Apricot fruits. Taian: Shandong Agriculture University(山东农业大学), Master. 2007.
- 8 Dai GZ(戴桂芝). Study on enzymatic browning control of preserved Apricot during storage. *Sci Tec Food Indus*(食品工业科技), 2003, 24: 138-139.
- 9 Lasekan O, Abbas K. Analysis of volatile flavour compounds and acrylamide in roasted Malaysian tropical almond(Terminalia catappa) nuts using supercritical fluid extraction. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48: 2212-2216.
- 10 Li J(李军). Study on the removal of bitterness from Apricot. Beijing: Beijing Forestry University(北京林业大学), Master. 2012.
- 11 Arslan O, Temur A, Tozlu I. Polyphenol oxidase from malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.). *J Agric Food Chem*, 1998, 46: 1239-1241.
- 12 Zhang BG(张百刚). Study on the characteristics of PPO and enzymatic browning control for Chinese Jujube. Xi'an: Shaanxi Normal University(陕西师范大学), Master. 2006.