

蒋长兴,焦云鹏,熊清平,等. 山药氧化酶特性及茶黄素的合成[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):277-280.

山药氧化酶特性及茶黄素的合成

蒋长兴¹, 焦云鹏², 熊清平¹, 李松林¹

(1. 淮阴工学院生命科学与化学工程学院, 江苏淮安 223003; 2. 江苏食品职业技术学院, 江苏淮安 223003)

摘要:采用硫酸铵盐析、Sephadex G-75 柱层析等方法得到山药多酚氧化酶(PPO), 纯化倍数为 52.5 倍, 活力回收率为 16.45%。结果表明:PPO 最适温度为 35 ℃, 最适 pH 值为 5.0。温度 55 ℃时 PPO 较为稳定, 酶活性为 55%; pH 值 6.5~7 范围内酶活性变化不大, 约为 80%。山药 PPO 催化合成茶黄素, 产量为 28.1%。茶黄素-3-没食子酸酯(TF-3-G)、茶黄素-3'-没食子酸酯(TF-3'-G)、茶黄素双没食子酸酯(TFDG)、茶黄素(TF) 含量分别为 12.4%、2.78%、9.46%、0.85%。

关键词:山药; 多酚氧化酶; 茶黄素; 合成

中图分类号: S632.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0277-03

山药为薯蓣科薯蓣属蔓生植物, 主要分布于热带和亚热带地区, 全世界有 600 种以上, 我国有 90 余种^[1-2]。山药营养价值较高, 富含多种必需氨基酸、维生素、多糖、皂苷元、黄酮等活性保健成分^[3]。我国山药的传统加工主要以中药或滋补品为主, 近年来出现山药全粉、精粉等, 加工规模与市场占有率不断提高^[4]。然而, 山药加工中存在护色难题。山药褐变主要由酶促反应引起, 多酚氧化酶(PPO) 是主要参与酶之一^[5]。多酚氧化酶在食品工业应用中具有积极的一面。在茶深加工中, 多酚氧化酶能催化茶多酚合成茶黄素。茶黄素是一类茶多酚氧化产物, 具有抑菌、抗病毒、降血脂、防治心血管疾病等功效。目前, 茶黄素主要从红茶中提取制备, 但由于红茶中茶黄素含量较低(0.2%~2%), 茶黄素的实际利用受到很大限制, 因此人们不断探索新的茶黄素制备途径。有研究表明, 植物源多酚氧化酶合成茶黄素较为可行^[6]; 源于梨和蓝莓匀浆的多酚氧化酶可以催化茶多酚生成茶黄素, 茶黄素含量分别为 367.5、457.3 mg/g^[7]。源于苹果、菇类、石榴的多酚氧化酶催化茶多酚生成茶黄素的研究成果已有专利可查。然而, 关于山药多酚氧化酶合成茶黄素的报道甚少。本试验对山药中多酚氧化酶进行分离纯化、性质及催化合成茶黄素等方面进行研究, 为山药多酚氧化酶合成茶黄素的工业化应用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 原料

新鲜山药, 市售; 硫酸铵、邻苯二酚、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠为常规分析纯试剂; 醋酸、乙腈、乙酸乙酯为色谱纯试剂; 茶黄素标样购自 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

HPLC 1100 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司)、shim

-packvp-ods 液相色谱柱(150 mm×4.6 mm×5 μm)、旋转蒸发仪、组织捣碎机、高速冷冻离心机。

1.3 方法

1.3.1 PPO 的提取 取新鲜山药切碎混匀, 准确称取 20 g, 加入 50 mL 已预冷的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值 6.8), 匀浆 30 s, 4 ℃静置 1 h, 减压抽滤, 4 ℃、12 000 r/min 离心 30 min, 取清液, 得 PPO 酶液。

1.3.2 PPO 分离纯化

1.3.2.1 硫酸铵分级沉淀 取 10 mL 酶液若干份, 加入干燥硫酸铵粉末, 得不同饱和度硫酸铵(10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%), 4 ℃静置 3 h, 4 ℃下 10 000 r/min 离心 30 min, 向沉淀物加入磷酸盐缓冲液 3 mL, 透析 24 h, 间隔 6 h 更换透析液。

1.3.2.2 Sephadex G-75 柱层析 将透析后的酶液用 Sephadex G-75 柱(1.6 cm×10 cm)进行洗脱, 洗脱条件: 上样量 10 mL, 洗脱液为 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 6.8), 洗脱速度为 0.25 mL/min。分步收集流出液(5 min/管), 检测 $D_{280\text{ nm}}$, 测定 PPO 活性, 绘制洗脱曲线, 收集活性峰, 合并收集液。

1.3.3 PPO 活性测定 取 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 6.8) 2.0 mL 于离心管中, 加入 0.2 mol/L 儿茶酚溶液 1.5 mL, 30 ℃水浴预热 5 min, 加入 200 μL 酶液, 混匀检测 $D_{408\text{ nm}}$, 加入酶液, 计时, 每 30 s 记录一次 $D_{408\text{ nm}}$ 的变化, 并以最初直线段的斜率来计算酶活性。吸光度增加 0.001 的酶量为一个酶活性单位(U)。

1.3.4 PPO 最适温度和最适 pH 值 取 pH 值为 5.4 的反应液 3.0 mL 在 10~70 ℃下保温 10 min, 立即加入 0.02 mL 酶液, 测定 PPO 活性, 确定 PPO 最适温度; 分别配制不同 pH 值的 0.2 mol/L 柠檬酸、醋酸、磷酸、硼酸的缓冲液, 以儿茶酚为底物, 测定 PPO 活性, 确定 PPO 最适 pH 值。

1.3.5 PPO 的热稳定性和 pH 稳定性 取酶液 2.0 mL, 置于 25~75 ℃下保温 0~6 h, 冷却至室温, 测定 PPO 残余酶活性; 分别取 PPO 酶液 2.0 mL, 用 pH 值为 3.0~8.0 的缓冲液定容至 10 mL, 4 ℃冰箱放置 24 h, 以儿茶酚为反应底物, 连续测定 PPO 活性。

收稿日期: 2012-12-18

基金项目: 江苏省淮安市农业科技支撑计划(编号: SN12036)。

作者简介: 蒋长兴(1977—), 男, 河南漯河人, 博士, 主要从事天然产物资源开发、天然产物活性评价与利用等方面的研究。Email: jlc2x3@gmail.com。

1.3.6 PPO 酶促合成茶黄素 称取 100 mg 茶多酚,置于 50 mL 具塞试管中,加入 20 mL pH 值为 4.8 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液,振荡,充分溶解,加入酶液 10 mL,摇匀,30 ℃ 反应 2 h,间歇振荡,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,用等量的乙酸乙酯萃取 3 次,上层液待测。

1.3.7 茶黄素 HPLC 检测^[8] 流动相 A 为 2% 醋酸,流动相 B 为乙腈-乙酸乙酯(体积比 7:1),流速为 0.8 mL/min,柱温为 40 ℃,检测波长为 280 nm,进样量为 10 μ L,梯度洗脱,流动相 B 在 30 min 内从 18% 线性梯度变化到 30%,32 min 回到初始状态,平衡 5 min。

2 结果与分析

2.1 PPO 的硫酸铵分级沉淀

由图 1 可以看出,随着硫酸铵饱和度增加,PPO 活性不断提高,当硫酸铵饱和度小于 30% 时,PPO 活性较低,当硫酸铵饱和度为 70% 时,酶液 PPO 活性最高。因此,可采用 30% 饱和度的硫酸铵沉淀去除杂蛋白,用 70% 饱和度的硫酸铵沉淀提取 PPO,所得产品杂蛋白含量低,PPO 损失少。在 PPO 的提取纯化工艺中,添加聚乙烯吡咯啉酮(PVP)可以有效清除酚类物质,防止 PPO 失活。另外,酚类的氧化产物醌类能够抑制 PPO 活性。因此,也可以加入维生素 C 以保持 PPO 活性^[9]。

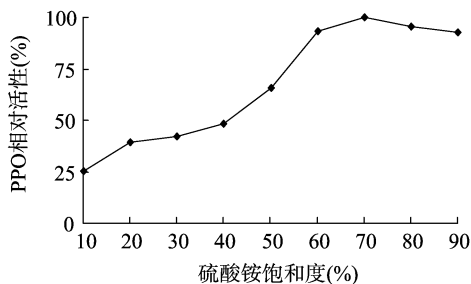


图1 山药PPO的硫酸铵分级沉淀曲线

2.2 PPO 的 Sephadex G-75 柱层析

PPO 经饱和度 70% 硫酸铵沉淀、透析后得到的酶液,采用 Sephadex G-75 凝胶柱层析进行分离,所得的洗脱曲线见图 2-a。由图 2-a 可以看到,在洗脱过程中出现 3 个明显的紫外吸收峰,第 1 个峰蛋白含量较高,且 PPO 酶活性也很高(图 2-b),表明该峰为 PPO 酶蛋白;其余 2 个峰 PPO 酶活性很低,表明它们主要为杂蛋白。本研究结果表明,经 40% ~ 70% 硫酸铵分级沉淀、透析、Sephadex G-75 柱层析纯化,山药 PPO 回收率分别为 57.53%、40.11%、16.45%,纯度分别提高了 1.365、2.014、52.5 倍。PPO 经透析后酶活性变为原来的 49.6%,酶活性的下降可能与透析过程中铜离子浓度下降有关。

2.3 PPO 的酶学性质

2.3.1 PPO 的最适温度 温度对酶活性的影响有 2 个方面:一是随着温度升高,酶的活性也增强,二是随着温度升高,酶逐渐变性,酶活性下降。由图 3 可以看出,温度对山药 PPO 活性的影响较为显著,温度在 10 ~ 35 ℃ 范围内变化时,山药 PPO 活性随温度的升高而增强;当温度达到 35 ℃ 时,山药 PPO 活性达到最大;温度在 35 ~ 70 ℃ 范围内变化时,山药 PPO

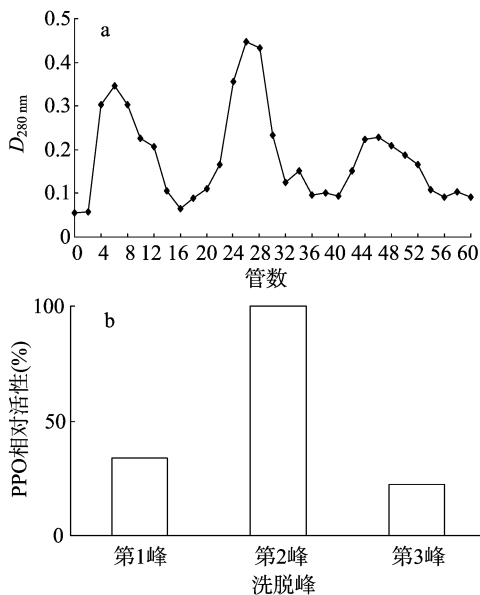


图2 Sephadex G-75凝胶柱层析洗脱曲线及洗脱峰的 PPO 相对活性

PPO 活性随温度升高而下降。这可能与山药中含有多糖-蛋白质有关,低温时山药的多糖-蛋白质对山药 PPO 活性具有保护作用;随着温度升高,山药的多糖-蛋白质解体破坏,保护作用丧失,温度对山药 PPO 活性的影响更加显著^[10]。

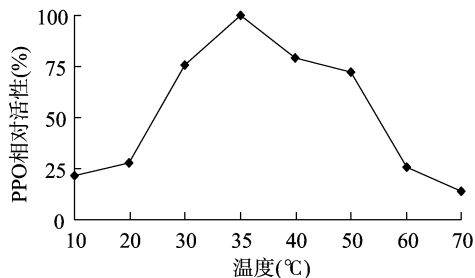


图3 不同温度对PPO相对活性的影响

2.3.2 PPO 的最适 pH 值 pH 值能改变蛋白酶氨基酸链或反应底物的电离状态,是影响蛋白酶活性的决定性因素之一。Ajila 等研究表明,过低或过高的 pH 值会加快酶活性位点亚铁血红素基团的解离,最终导致酶活性下降,组成酶活性中心的辅基必须在适当的离子形式下才能维持和底物结合或起催化反应的活性中心的构象^[11]。由图 4 可以看出,山药 PPO 在 pH 值为 5.0、7.0 时活性较高,在 pH 值 ≤ 3.0 或 pH 值 ≥ 8.0 时活性较低。一般来说,植物源 PPO 的最适 pH 值在 4 ~ 7 之间。因此,山药 PPO 最适 pH 值为 5.0。本研究出现了 2 个山药多酚氧化酶活性较高的 pH 值,可能是因为山药 PPO 以同工酶或多种分子形式存在。

2.3.3 PPO 的热稳定性 由图 5 可以看出,PPO 在所有试验温度下保温 1 h 酶活性均呈下降趋势,当温度较低(25 ~ 55 ℃)时,PPO 热稳定性较好。55 ℃ 下保温 20 min 酶活性为 55.1%,随着保温时间延长酶活性变化不大;75 ℃ 处理 10 min 后酶活性仅为 18.7%。高温下 PPO 的失活可能与酶蛋白高级结构变化有关,酶蛋白高级结构随温度变化的难易程度与分子量有关^[12]。不同来源的酶类由于具有不同的分

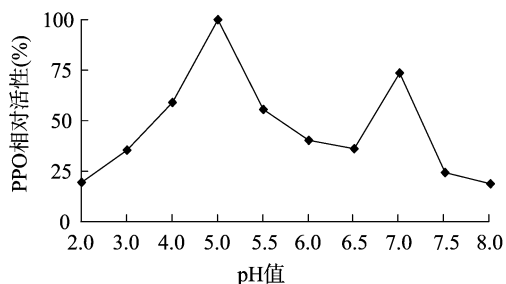


图4 不同pH值对PPO相对活性的影响

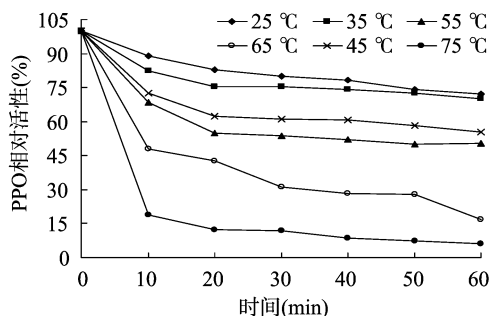


图5 PPO的热稳定性

子量而对温度的敏感性有所差异。有报道指出,植物源多酚氧化酶适宜的温度范围为 20 ~ 40 °C^[13],本研究结论与该报道基本一致。

2.3.4 PPO 的 pH 值稳定性 由图 6 可以看出,在 pH 值 6.5 ~ 7.0 范围内酶活性变化不大,较为稳定,维持在 80% 左右。在 pH 值为 3.0 或 8.0 时,酶活性显著下降:如当 pH 值为 3.0 时,20 min 后酶活性为 28.5%,当 pH 值为 8.0 时,80 min 后酶活性仅为 12.6%。上述结果表明,山药 PPO 在中性环境中较为稳定,对酸碱条件较为敏感。

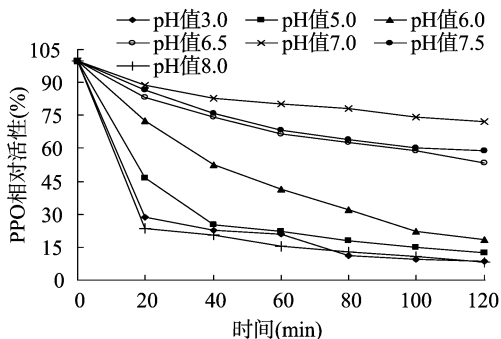
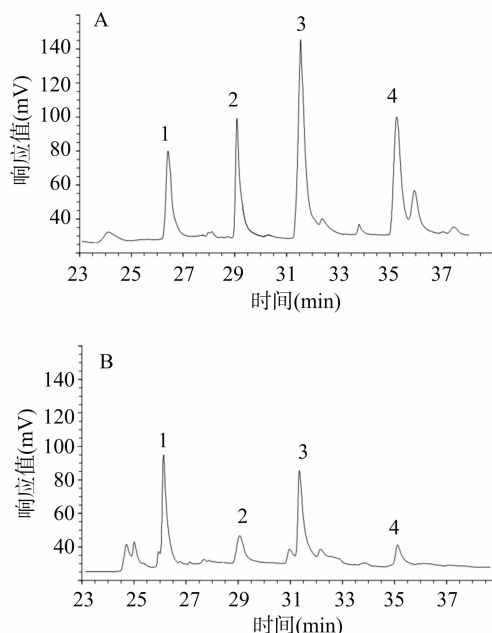


图6 PPO的pH稳定性

2.3.5 PPO 酶促合成茶黄素 本试验以山药作为酶源催化合成茶黄素(茶黄素的产率 = 茶黄素粗制品的量/所加茶多酚的量 × 100%),结果表明,茶黄素产率为 28.1%,低于采用苹果与梨 PPO 所催化生成茶黄素的产率(42.2%、41.1%)^[7]。表明山药 PPO 的催化能力低于苹果与梨的 PPO,也可能是因为本反应条件不是山药 PPO 合成茶黄素的最好反应条件。山药 PPO 合成茶黄素最适反应条件有待进一步研究。由图 7 可以看出,生成的茶黄素单体主要包括茶黄素-3-没食子酸酯(TF-3-G)、茶黄素-3'-没食子酸酯(TF-3'-G)、茶黄素双没食子酸酯(TFDG)、茶黄素(TF)

等,其含量分别为 12.4%、2.78%、9.46%、0.85%。由此可知,TF-3-G、TFDG 生成量较高,而 TF-3'-G、TF 生成量较低。已有研究表明,不同酶源的儿茶素氧化产物单体在构成比例上具有显著差异,梨、苹果 PPO 合成的茶黄素制品中 TF-3-G 含量较高^[7],本研究结论与其基本一致,可能是因为不同来源的 PPO 在同工酶上的差异,山药 PPO 对 L-EGGC、L-EGC 具有较强的催化能力,因而 TF-3-G 生成量较高。

A—标样;B—样品;1—TF-3-G;2—TF-3'-G;3—TFDG;4—TF
图7 山药PPO合成茶黄素的HPLC图谱

3 结论

采用硫酸铵盐析、透析袋透析、Sephadex G-75 柱层析等方法对山药多酚氧化酶(PPO)进行分离纯化,得到纯化的山药 PPO,纯化倍数为 52.5 倍,活力回收率为 16.45%。

对山药 PPO 的酶学性质进行研究,结果表明:PPO 最适温度为 35 °C,最适 pH 值为 5.0。55 °C 时 PPO 较为稳定,酶活性维持在 55% 左右;pH 值 6.5 ~ 7.0 范围内酶活性变化不大,维持在 80% 左右。利用山药 PPO 催化合成茶黄素,茶黄素产率为 28.1%。

采用高效液相色谱法对茶黄素单体进行检测,研究发现茶黄素单体主要包括茶黄素-3-没食子酸酯、茶黄素-3'-没食子酸酯、茶黄素-双没食子酸酯和茶黄素(TF),含量分别为 12.4%、2.78%、9.46%、0.85%。

参考文献:

- [1] 檀子贞,王红育,吴雅静. 山药喷雾干燥粉的加工工艺研究[J]. 食品工程,2010(1):31-33.
- [2] 李红涛,袁书林. 山药产品的功能价值及开发利用探讨[J]. 中国食物与营养,2009(10):15-18.
- [3] 王文亮,孙爱东,祝清俊,等. 山药罐头加工中护色条件的研究[J]. 食品与药品,2007,9(10):24-25.

廖亮,许建,古丽娜孜,等.杏干制作低糖杏脯加工工艺的研究[J].江苏农业科学,2013,41(8):280-283.

杏干制作低糖杏脯加工工艺的研究

廖亮¹,许建²,古丽娜孜¹,侯伟伟¹,李焕荣¹

(1.新疆农业大学食品科学与药学院,新疆乌鲁木齐 830052; 2.新疆维吾尔自治区葡萄瓜果开发研究中心,新疆鄯善 838200)

摘要:以杏干为原料探索低糖杏脯的制作工艺,研究了鲜杏成熟度、亚硫酸盐添加量、杏干复水回软参数、填充剂浓度、真空渗糖工艺参数等因素对制品品质的影响。结果表明,选用颜色青转黄的鲜杏,添加 3.0 g/kg 亚硫酸钠熏制处理得到的杏干品质最佳;杏干复水料液比 1:1、复水 2 h、回软 19 h 后去核最佳;采用真空二次渗糖工艺,麦芽糊精浓度 1%,一次糖液浓度为 30%,二次糖液浓度为 50%,糖液温度 60℃,真空度 0.08 MPa,真空保持时间 30 min,浸糖 24 h,60℃恒温干燥 8 h,所得杏脯湿基含糖量为 45%,水分含量 18%~20%,制品品质优良。

关键词:杏脯;杏干;低糖;真空渗糖;工艺参数

中图分类号: TS255.41 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0280-04

随着新疆林果业的蓬勃发展,果品产量在不断增加,使得市场竞争日趋激烈,因此在看到新疆维吾尔自治区发展林果业重大意义和优越的资源、政策条件的同时,也应看到制约该区林果业可持续发展的一些严峻问题。目前,新疆杏产业的主打产品是半成品、大包装浓缩杏浆,此类产品的市场主要在国内外,市场需求量并不大,且市场扩增速度缓慢,而国内市场又尚未开拓^[1-2],因此,若仍以浓缩杏浆为主打产品扩大生产能力,其市场竞争将会日益激烈。所以只有不断强化杏产业和杏产品的研究与开发,延伸杏产业链,不断开拓市场,杏产业才有持续良好的发展前景^[3]。

目前杏脯的制作加工主要以鲜杏为原料,而鲜杏的季节性强、不易储藏,这为加工企业带来了一定的难度,且加剧了机器设备的闲置率,增加了企业负担。本研究拟以杏干为原料制作低糖杏脯,通过对杏干预处理及影响低糖杏脯品质的工艺进行研究,以期采用杏干制作低糖杏脯提供理论和技术依据。

收稿日期:2013-04-03

基金项目:新疆维吾尔自治区科技攻关项目(编号:200731136)。

作者简介:廖亮(1985—),女,甘肃天水人,硕士,助理讲师,研究方向为微生物与生化药学。E-mail:aico851017@163.com。

通信作者:李焕荣,硕士,教授,研究生导师,研究方向为农产品深加工与综合利用。E-mail:lhrgjw@sina.com。

[4]焦云鹏.山药罐头加工工艺的研究[J].广西轻工业,2006,97(6):7-8,32.

[5]杜德红,陈勇,肖军霞.山药中多酚氧化酶活性的测定及其护色研究[J].安徽农业科学,2011,39(27):16572-16574.

[6]谷记平,刘仲华,黄建安,等.茶黄素生物合成的研究进展[J].福建茶叶,2004(2):19-21.

[7]谷记平,刘仲华,黄建安,等.利用外源多酚氧化酶促氧化制备茶黄素的研

[8]王坤波,刘仲华,黄建安,等.高效液相色谱法测定红茶中的茶黄素[J].色谱,2004(2):151-153.

[9]Erat M, Sakiroglu H, Kufrevioglu O I. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp[J]. Food Chemistry, 2006,

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

库买提杏,采自新疆库车,采后立即运往新疆农业大学食品科学与药学院冷库,按照成熟度分级后于 2℃库温条件下贮存;果糖糖浆、麦芽糊精、柠檬酸、蔗糖,均为食品级;氢氧化钠、盐酸、硫酸铜、酒石酸钾钠、乙酸锌、亚铁氰化钾、盐酸、葡萄糖、甲基红、抗坏血酸、醋酸铅,均为分析纯级。

TA XT Plus 物性测试仪(英国 Stable Micro System 公司); D25/DP-9000 色差仪(美国 HunterLab 公司);真空渗糖装置(自制);DHG-9140 A 电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司);WYT-80 手持糖量计(成都兴晨光光学仪器有限公司);ZF-260 多奇台式真空机(温州市兴业机械设备有限公司);PL-203 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];WA99163 水分活度仪(乌鲁木齐祥生仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 低糖杏脯制作工艺 杏干→清洗→复水→回软→漂烫→一次渗糖→一次浸糖→二次渗糖→二次浸糖→沥糖→整形→烘干→回软→包装。

1.2.2 鲜杏成熟度对杏干品质的影响 将鲜杏按表皮颜色分级为部分青、青转黄(淡黄)2种,在自然条件下晾晒制干,利用感官评价分析成熟度对杏干品质的影响。

1.2.3 亚硫酸盐添加量对杏干和产品品质的影响 以亚硫

95(3): 503-508.

[10]顾林,鲁茂林,姜军,等.山药多酚氧化酶酶学特性及褐变控制研究[J].食品与机械,2006,22(6):26-29.

[11]Ajila C M, Prasada Rao U J S. Purification and characterization of black gram (*Vigna mungo*) husk peroxidase[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009, 60(1/2): 36-44.

[12]Dincer B, Colak A, Aydin N, et al. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits *Mespilus germanica* L., Rosaceae[J]. Food Chemistry, 2002, 77(1): 1-7.

[13]Guo L, Ma Y, Shi J, et al. The purification and characterisation of polyphenol oxidase from green bean (*Phaseolus vulgaris* L.)[J]. Food Chemistry, 2009, 117(1): 143-151.