

詹嘉红. 枇杷果实过氧化物酶活性的抑制[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 316–317, 354.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.108

枇杷果实过氧化物酶活性的抑制

詹嘉红

(韩山师范学院生物系, 广东潮州 521041)

摘要:研究了缓冲溶液 pH 值、温度和 3 种抑制剂等因素对枇杷果实过氧化物酶(POD)活性的影响。结果表明, 枇杷果实过氧化物酶的最适 pH 值为 5.4, 在 pH 值 3.0~7.0 范围内保持较高活性;过氧化物酶的最适温度为 35 ℃。维生素 C、硫脲、亚硫酸钠 3 种物质都能较好地抑制枇杷 POD 活性, 且随着浓度的升高, 抑制效应逐渐增强, 抑制效果为:维生素 C > 硫脲 > 亚硫酸钠。

关键词:枇杷;过氧化物酶;酶促褐变;抑制剂

中图分类号:TS255.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)07-0316-02

果蔬的加工和贮藏常与果蔬本身存在的酶类有密切关系, 其中过氧化物酶(POD)是引起果蔬加工过程及贮藏期间变色、变味的重要因素之一^[1-2]。枇杷(*Eriobotrya japonica* Lindl.), 别称卢橘, 是中国南方特有的珍稀水果, 其果肉柔软多汁, 酸甜适度, 味道鲜美, 被誉为“果中之皇”^[3]。枇杷果实有止咳、化痰、理气的药用功效^[4]。作为药食两用的枇杷水果, 自古以来就倍受人们青睐。市面上以枇杷果肉为原料加工的产品种类繁多, 如枇杷饮料、枇杷果酒、枇杷果酱、枇杷果脯等^[5]。但枇杷鲜果不耐贮运及加工, 极易产生褐变而变质。目前, 针对枇杷 POD 活性及其对褐变影响研究报道甚少。为提高枇杷贮藏保鲜和加工品质, 本试验以新鲜枇杷果实为材料, 研究了 pH 值、温度、3 种抑制剂对枇杷果实过氧化物酶活性的影响, 为枇杷加工和贮藏防褐技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

枇杷品种为解放钟, 选择成熟、新鲜无损伤的枇杷果实为供试材料。

1.2 试剂与仪器

磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、柠檬酸、愈创木酚、30% 过氧化氢、亚硫酸钠、硫脲为分析纯。维生素 C 为生化试剂。

UV2100 型紫外可见分光光度计: 尤尼柯(上海)仪器有限公司生产; FA2004 电子天平: 上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂生产; JJ-2 组织捣碎匀浆机: 富华仪器有限公司生产; HH-2 数显恒温水浴锅: 江苏省金坛市友联仪器研究所生产; GL-20G-II 型飞鸽牌低温冷冻离心机; PHS-2C 型精密酸度计: 上海雷磁仪器厂生产。

1.3 方法

1.3.1 枇杷 POD 粗酶液的制备 参照王学奎的方法^[6], 略有修改。将枇杷果实去皮、去核, 称取果肉 10 g, 加入适量

4 ℃ 预冷的磷酸盐缓冲溶液(0.05 mol/L, pH 值 6.0), 冰浴研磨成匀浆, 定容到 25 mL 容量瓶中, 放于 4 ℃ 冰箱里浸提 30 min, 10 000 r/min 离心 20 min, 上清液即为酶的粗提液, 低温保存备用。

1.3.2 枇杷 POD 活性的测定 参照李合生的方法^[7], 略有改进。反应体系为 0.05 mol/L pH 值 5.8 磷酸缓冲液 2.5 mL、0.05 mol/L 愈创木酚 1.5 mL、2% H_2O_2 0.5 mL、0.5 mL 酶液。在室温下, 于 $D_{470\text{ nm}}$ 处比色。酶液加入后开始计时, 1 min 后第 1 次读数, 然后每 30 s 记录 1 次吸光度 D 随时间的变化值, 对照以缓冲液代替酶液, 重复测 3 次。本试验以 $D_{470\text{ nm}}$ 的变化值表示 POD 活性的变化。

1.3.3 pH 值对枇杷 POD 活性的影响 取 pH 值分别为 2.0、3.0、4.0、4.4、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、7.0、8.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 2.5 mL, 按“1.3.2”节方法, 测定不同 pH 值下 POD 活性的变化。以最高酶活力为 100%, 计算 POD 相对酶活性。

1.3.4 温度对枇杷 POD 活性的影响 将未加入酶液的反应体系先分别在 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65 ℃ 条件下保温 10 min, 加入 0.5 mL 酶液后继续在原来的温度条件下保温 3 min, 按“1.3.2”节方法测定不同温度条件下 POD 活性的变化。以最高酶活力为 100%, 计算 POD 相对酶活性。

1.3.5 抑制剂对枇杷 POD 活性的影响 向反应体系分别加入各种浓度的抑制剂 0.5 mL, 缓冲液的量相应减少 0.5 mL, 按“1.3.2”节方法测定 PPO 活性。酶活性大小按无抑制剂时的酶活性百分比表示。各种抑制剂在反应体系中的浓度, 维生素 C: 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mmol/L; 亚硫酸钠: 20、40、60、80、100 mmol/L; 硫脲: 0.01、0.05、0.10、0.15、0.20 mmol/L。

2 结果与分析

2.1 pH 值对枇杷 POD 活性的影响

从图 1 可见, POD 活性受环境 pH 值影响不大。pH 值在较大范围 3.0~7.0 之间, POD 的相对酶活都能保持在 63% 以上, 当 pH 值为 2.0、8.0 时, POD 相对酶活仍有 45.0%、

收稿日期: 2015-08-02

作者简介: 詹嘉红(1963—), 女, 广东揭阳人, 副教授, 主要从事生物化学方面的研究。E-mail: zhanjiahong@163.com。

44.6%。枇杷果实的最适 pH 值为 5.4, 本结果与林建城等报道的枇杷最适 pH 值为 5.0^[8] 有所不同。可能与枇杷品种、酶液纯度不同等因素有关。

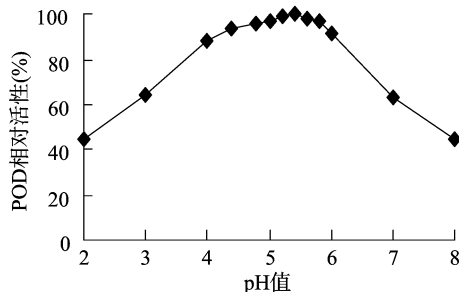


图1 pH 值对枇杷 POD 活性的影响

2.2 温度对枇杷 POD 活性的影响

温度对枇杷 POD 活性影响明显。在 35 ℃ 以下, 酶活性随着温度的上升而升高, 当温度达到 35 ℃ 时, 酶活性最大, 此温度为酶的最适温度, 温度大于 35 ℃ 时, 酶活性迅速下降。枇杷 POD 活性呈现出的这种变化与温度对其他酶活性的影响规律相符合。当反应体系温度为 5.65 ℃ 时, POD 相对活性分别为 33.5%、19.3% (图 2)。表明调节温度能有效抑制 POD 的活性, 特别是在较高温度条件下这种影响更为显著。

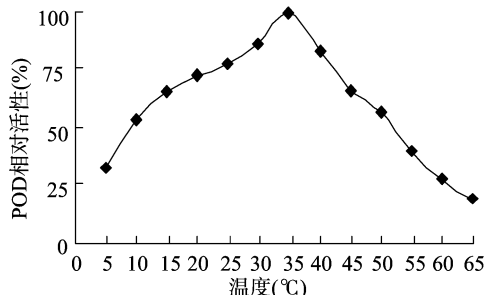


图2 温度对枇杷 POD 活性的影响

2.3 不同抑制剂对枇杷 POD 活性的影响

2.3.1 维生素 C 对枇杷 POD 活性的影响

维生素 C 对 POD 活性有很好的抑制作用。随着维生素 C 浓度的增加, 枇杷 POD 活性逐渐降低, 当维生素 C 浓度为 0.02 mmol/L 时, POD 相对活性降低到 57.8%, 当维生素 C 浓度达到 0.05 mmol/L 时, POD 活性基本被完全抑制 (图 3)。

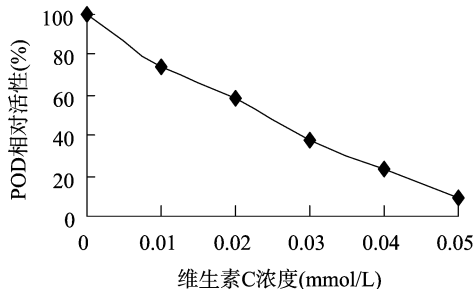


图3 维生素 C 对枇杷 POD 活性的影响

2.3.2 硫脲对枇杷 POD 活性的影响

随着硫脲浓度的增加, 总体抑制 POD 效果越来越明显。在浓度为 0.01 ~ 0.10 mmol/L 范围内, 硫脲对 POD 活性的抑制作用程度变化不大, POD 相对活性仅从 79.7% 降低至 72.9%, 当硫脲浓度

大于 0.10 mmol/L 时, 随着硫脲浓度的增加, POD 相对活性迅速降低, 当硫脲浓度达到 0.20 mmol/L 时, POD 相对活性降低到 28.1% (图 4)。

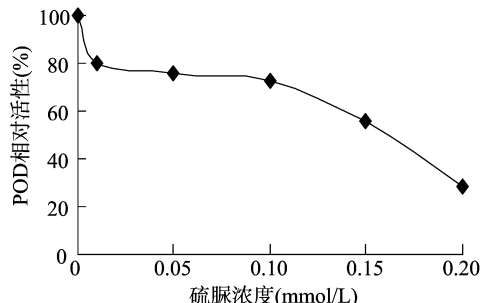


图4 硫脲对枇杷 POD 活性的影响

2.3.3 亚硫酸钠对 POD 活性的影响

亚硫酸钠对 POD 活性的抑制效果与维生素 C 相似。随着亚硫酸钠浓度的增加, POD 活性逐渐降低, 当亚硫酸钠浓度达到 80 mmol/L 时, POD 相对活性降低到 16.8%, 当浓度为 100 mmol/L 时, POD 相对活性降低到 12.1%, 酶促褐变基本得到抑制 (图 5)。

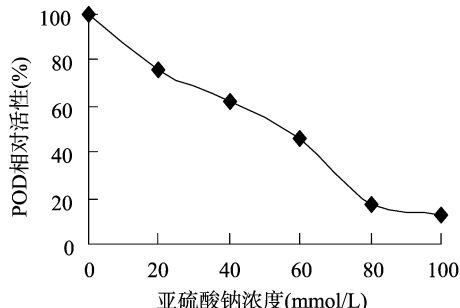


图5 亚硫酸钠对枇杷 POD 活性的影响

从 3 种抑制剂对 POD 活性影响程度可以看出, 3 种抑制剂的抑制效果为: 维生素 C > 硫脲 > 亚硫酸钠。目前认为, 维生素 C 对褐变的抑制并非直接抑制 POD 活性达到的, 而是将 POD 氧化生成的有色醌类物质迅速还原成酚类物质, 从而抑制初产物的生成量, 最终抑制黑色素的生成^[8]; 硫脲抑制可能是通过对酶中二硫键的还原, 使酶变性, 也可能是与铁辅基络合使酶失活^[9]; 而亚硫酸钠抑制褐变主要是通过不可逆地与醌生成无色的加成物, 与此同时降低了酶与一元酚和二元酚作用的活力^[10]。

3 结论与讨论

枇杷果实 POD 的最适温度为 35 ℃, 低温 5 ℃、高温 65 ℃ 均可大大降低 POD 活性, 尤其是高温条件下影响更为显著。因此, 通过高温处理可以有效控制其加工产品的酶促褐变。

枇杷果实 POD 的最适 pH 值为 5.4, 当 pH 值为 2.0、8.0 时, POD 的相对酶活仍有 45.0%、44.6%。因此, 通过控制 pH 值较难起到抑制酶活性的作用。

3 种抑制剂对枇杷 POD 活性均有不同程度的抑制作用, 且抑制作用随着处理浓度的增加而增强。3 种抑制剂的抑制效果为: 维生素 C > 硫脲 > 亚硫酸钠。由于亚硫酸钠、硫脲存在一定安全隐患, 生产上可选用可食性维生素 C 抑制剂来控制枇杷制品的酶促褐变。

(下转第 354 页)

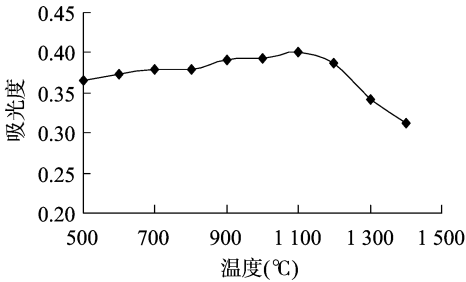


图1 灰化温度对吸光度的影响

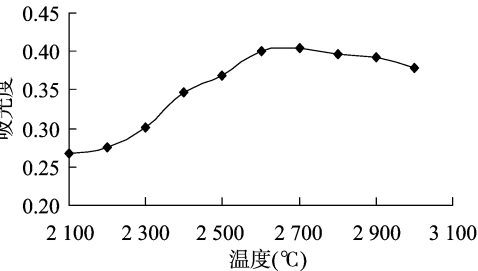


图2 原子化温度对吸光度的影响

行线性回归,得出 Cr 的线性方程为 $y=0.0191x+0.0174$,线性范围为 $0\sim50\text{ }\mu\text{g/L}$,相关系数 $r=0.9991$ 。如果所测土壤样品溶液测试值超出线性范围,仪器将会自动稀释样品溶液至线性范围内后再进行测试。

2.6 方法检出限

按照样品分析的全部步骤,重复 16 次空白试验,计算 16 次平行测试结果的标准差,按 HJ 168—2010《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》中的相关规定,得出检出限为 $0.05\text{ }\mu\text{g/L}$ 。按取样量 0.1000 g 、定容体积 200 mL ,计算得方法的检出限为 0.1 mg/kg 。

2.7 精密度及准确度测试

准确称取土壤标准样品 GBW07423、GBW07429 各 8 份,按优化的试验条件微波消解样品,用石墨炉原子吸收光度法测定样品中的铬含量,结果如表 4 所示。

表 4 土壤标准样品测试结果($n=8$)

标准样品	保证值 (mg/kg)	平均值 (mg/kg)	标准差	相对标准差 (%)
GBW07423	75±5	71.1	2.70	3.8
GBW07429	87±4	84.2	2.86	3.4

2.8 土壤样品测定及回收率试验

对 3 份绿色食品产地土壤,按试验方法测试其中的铬含量,同时做加标回收试验,结果见表 5。

表 5 土壤样品及回收率测试结果

样品编号	样品测试值 (mg/kg)	加标量 (mg/kg)	加标样品测试值 (mg/kg)	回收率 (%)
1	37.6	20.0	58.1	102.5
2	49.5	20.0	67.9	92.0
3	53.7	20.0	71.8	90.5

3 结论

采用 HNO_3+HF 混合酸消解体系对土壤样品进行微波消解,用石墨炉原子吸收光谱法对土壤标准样品 GBW07423、GBW07429 中的铬含量进行测定,并对绿色食品产地土壤样品进行加标回收测定,均取得良好的结果。研究表明,利用微波消解-石墨炉原子吸收光谱法测定绿色食品产地土壤中的铬,精密度高,准确性好,能满足实际样品分析的要求。

参考文献:

[1] Dragovic S, Mihailovic N, Gajic B. Heavy metals in soils: distribution, relationship with soil characteristics and radionuclides and multivariate assessment of contamination sources[J]. Chemosphere, 2008, 72(3): 491-495.

[2] NY/T 391—2013 绿色食品 产地环境质量[S]. 北京:中国农业出版社, 2014.

[3] HJ 491—2009 土壤 总铬的测定 火焰原子吸收分光光度法[S]. 北京:中国环境科学出版社, 2009.

[4] 吴 蝶, 黄 莺. 微波消解测定土壤金属预处理的优化[J]. 西南大学学报:自然科学版, 2013, 38(11): 132-135.

[5] 胡珊珊, 钱秀芳. 微波消解技术在土壤重金属元素测定中的应用[J]. 安徽师范大学学报:自然科学版, 2010, 33(4): 363-366.

[6] 王 刚, 胡跃城, 孙英杰, 等. 微波消解-可见分光光度法测定土壤中的总铬[J]. 光谱实验室, 2011, 28(5): 2662-2665.

[7] 王小琳, 栾桂云, 管泽民, 等. 土壤中总铬测定方法的比较研究[J]. 土壤, 2010, 42(3): 497-501.

[8] 姚朝英, 任 兰. 氯化钼作基体改进剂石墨炉原子吸收光谱法测定土壤中的铍[J]. 岩矿测试, 2012, 31(6): 975-979.

[9] 秦樊鑫, 张明时, 胡继伟, 等. 氯化钼作基体改进剂 GFAAS 法测定中药材中微量铅的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(10): 2123-2126.

(上接第 317 页)

参考文献:

[1] 韩 涛, 李丽萍. 果实和蔬菜中的过氧化物酶[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(1): 69-73.

[2] Gong Q Q, Tian S P. Partial characterization of soluble peroxidase in pericarp of litchi fruit[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2002, 29(6): 891-896.

[3] 李 磊, 陈发河, 吴光斌. 热激处理对冷藏“解放钟”枇杷果实木质化及相关酶活性的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(16): 286-290.

[4] 吴修仁. 中国药用植物简编[M]. 广州:广东高等教育出版社, 1994:373.

[5] 乔 方, 黄略略, 方长发, 等. 基于枇杷果实的加工研究进展[J]. 农产品加工·学刊, 2012(10): 119-123.

[6] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 2 版. 北京:高等教育出版社, 2006:167-168.

[7] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 2000:164-165.

[8] 林建城, 吴智雄, 彭在勤. 枇杷果肉过氧化物酶的分离纯化及其性质研究[J]. 四川农业大学学报, 2007, 25(4): 419-424.

[9] 罗志刚, 姜绍通, 潘丽军, 等. 抗坏血酸和亚硫酸钠在甘薯破碎中抗褐变的研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(5): 52-53.

[10] 张桂芝, 谢朝良, 陈 钢, 等. 阿魏菇中过氧化物酶特性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 150-152.