

刘 辉, 卢 扬, 李 俊, 等. 苦荞茎叶提取物对黑美人马铃薯多酚氧化酶的抑制效果[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(9): 307–309.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.088

苦荞茎叶提取物对黑美人马铃薯多酚氧化酶的抑制效果

刘 辉, 卢 扬, 李 俊, 吕 都, 陈朝军, 雷尊国, 刘永翔

(贵州省农业科学院生物技术研究所, 贵州贵阳 550006)

摘要:多酚氧化酶是植物体内酶促褐变的关键酶。为筛选安全无毒、处理简单的多酚氧化酶抑制剂, 以苦荞茎叶乙醇提取物、水提取物、磷酸盐缓冲液提取物为褐变抑制剂, 研究其对黑美人马铃薯多酚氧化酶的抑制效果。结果表明, 3 种提取物均对马铃薯多酚氧化酶具有显著的抑制效果, 当抑制剂体积为 120 μL 时, 酶活抑制率分别为 70.14%、73.38%、84.53%, 表明磷酸盐缓冲液提取物的抑制效果最佳。对 3 种提取物中总黄酮、蛋白质含量进行定量, 结果表明磷酸盐缓冲液提取物中不仅具有较高含量的黄酮类物质, 同时蛋白质含量也较高, 推测磷酸盐缓冲液提取物抑制效果最好的原因就在于此。研究结果可为探寻马铃薯多酚氧化酶的天然抑制剂和马铃薯深加工过程中褐变控制提供新的思路 and 参考依据。

关键词:苦荞; 茎叶; 多酚氧化酶; 马铃薯; 抑制剂

中图分类号: TS205 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0307-03

“黑美人”马铃薯是一种表皮与果肉均呈黑紫色的马铃薯品种, 它的蛋白质、还原糖、有机酸含量高于普通马铃薯, 而脂肪含量较低, 从而具有高营养、低能量的特点, 是一种健康、营养的食品原料。同时, “黑美人”马铃薯富含普通马铃薯所缺乏的花青素、维生素 C、胡萝卜素等抗氧化物质, 使其兼具抗癌、抗衰老、美容和防止高血压等多种保健作用^[1]。马铃薯中富含的多酚类物质是多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 引起酶促褐变的底物, 而酶促褐变中产生的黑色素对马铃薯的色泽、品质造成很大的影响, 从而降低其深加工产品的质量和市场竞争力。因此, 开发出合适的褐变抑制剂, 对马铃薯加工过程中的褐变过程加以控制, 对提高黑美人马铃薯的应用价值和其加工产品的质量、竞争力具有重要的意义^[2]。

植物提取物作为天然的抑制剂, 具有天然无毒特性, 更易被消费者所接受, 故近年来成为研究的热点^[3-4]。苦荞源于我国西南地区, 在全国广泛种植, 但是分布较集中, 贵州地区苦荞常年种植面积达 4.6 万 hm^2 。荞麦种子已经被开发成各种产品, 如苦荞米饭、苦荞茶、苦荞酥饼等, 而荞秸 (叶、秆) 多作为柴火烧掉, 如能加以开发利用, 其经济效益将会非常可观^[5]。苦荞茎叶中的主要有效活性成分是黄酮类物质 (芸香苷、槲皮素、山奈酚等), 其醇提物表现出较强的抗氧化性, 具有抗癌变、降脂、降压、美容等功效^[6-7]。近年来, 对于苦荞的研究主要集中在成分及药用分析, 很少涉及酶学领域, 苦荞茎

叶提取物对植物 PPO 抑制作用的报道甚少, 特别是酶的抑制作用动力学的研究几乎还是空白。在筛选植物体的多酚氧化酶抑制剂的试验中, 研究发现苦荞茎叶提取物可以对多酚氧化酶产生抑制作用。本研究采用 50% 乙醇提取法、水提取法及磷酸盐缓冲液提取法分别提取苦荞茎叶中的 PPO 抑制剂, 比较这 3 种提取物对马铃薯 PPO 的抑制效应, 为苦荞茎叶提取物在食品保鲜、褐变控制方面的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黑美人马铃薯和苦荞茎叶均由贵州省农业科学院生物技术研究所提供; 芸香苷购自上海永叶生物科技有限公司, 其他试剂均为国产分析纯。所需仪器包括 Allegra 25R 高速冷冻离心机 (美国贝克曼公司)、SJIA-10N 低温真空冷冻干燥器 (宁波市双嘉仪器有限公司)、XL-30C 超微粉碎机 (杭州旭众机械设备有限公司)、UV-2100 双光束紫外可见分光光度计 [北京北分瑞利分析仪器 (集团) 有限责任公司]、RE-52AA 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂) 等。

1.2 方法

1.2.1 黑美人马铃薯 PPO 的提取与纯化 黑美人马铃薯多酚氧化酶的提取与纯化参考彭益强等的方法^[8]。

1.2.2 苦荞茎叶的提取方式 参考曹艳萍等的方法^[9]: 苦荞茎叶在低温真空冷冻干燥器中干燥 3~4 h 后, 用超微粉碎机加工成粉末。取粉末 20 g, 加 200 mL 蒸馏水和 200 mL 乙醇 [水提取物和磷酸盐提取物仅加 400 mL 蒸馏水或磷酸盐缓冲液 (0.2 mol/L, pH = 6.8)] 于大锥形瓶中, 搅拌均匀, 置于超声波清洗器中, 50 $^{\circ}\text{C}$ 下超声波萃取 1.5 h, 用布氏漏斗抽滤得滤液, 用旋转蒸发器蒸发除去乙醇及大部分水分得浓缩液, 用冷冻干燥器干燥成粉末。取冻干粉配成 15 mg/mL 溶液, 15 000 r/min 离心 10 min, 除去沉淀备用。

收稿日期: 2016-03-06

基金项目: 贵州省重大科技专项计划 (编号: 黔科合重大专项字 [2014] 6016); 贵州省农业科技攻关项目 (编号: 黔科合 NY [2013] 3017)。

作者简介: 刘 辉 (1986—), 男, 江西赣州人, 博士, 副研究员, 主要从事食品化学研究。E-mail: liuhui19860822102@126.com。

通信作者: 刘永翔, 研究员, 研究方向为农产品加工。Tel: (0851)

83760818; E-mail: kittyliu0211@163.com。

1.2.3 苦荞茎叶提取物中总黄酮、蛋白质定量分析 黄酮类物质含量测定:参考曹艳萍的方法^[10]进行。蛋白质定量:参照张午燕的方法^[11]进行。

1.2.4 PPO 动力学研究方法 参照林敏等的方法^[12]进行,将其中的底物 *L*-DOPA 换成邻苯二酚,具体操作如下:将 pH 值 6.8 的磷酸缓冲液、0.2 mol/L 的邻苯二酚及 PPO 液在 30 ℃ 的水浴中预保温,在比色皿中依次加入 2.0 mL 的磷酸缓冲液、0.3 mL 的酶液、0.5 ml 浓度为 0.2 mol/L 的邻苯二酚溶液(空白对照为 2.5 mL 的磷酸缓冲液、0.3 mL 的酶液),在反应组和空白对照组中分别加入 0、15、30、60、120、240 μL 的 3 种苦荞茎叶提取物,用 UV-2100 双光束紫外可见分光光度计在 413 nm 处比色,每 4 s 计数 1 次,记录各时刻的吸光度 $D_{413\text{ nm}}$,将在相同时刻测得的 2 个 $D_{413\text{ nm}}$,相减并作图,得苦荞茎叶提取物对黑美人马铃薯 PPO 活性影响的动力学特征曲线。

1.3 数据统计分析

每个样品设 3 个生物学重复,用 SPSS 18.0 统计软件对试验数据进行分析,测定结果以平均值 ± 标准差表示,以 $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 苦荞茎叶提取物对马铃薯多酚氧化酶酶促反应动力学曲线的影响

从图 1-A 中可以看出,水提取物在 15 μL 时,对 PPO 活性抑制效果不明显;在添加量为 30 μL 时,抑制效果才显现,并在 40 s 时,PPO 活性受到完全抑制;在添加量为 60 μL 时,在 32 s 时 PPO 活性受到完全抑制;当苦荞茎叶水提取物含量达到 120 μL 时,16 s 时即使马铃薯 PPO 活性受到抑制;在添加量为 240 μL 时,基本使马铃薯 PPO 完全失活。

从图 1-B 中可以看出,苦荞茎叶醇提取物在 15 μL 时对马铃薯的抑制效果已经开始显现,但是在 1 min 的测定时间内,没有使 PPO 活性完全受到抑制;在添加量为 30、60、120 μL 时使 PPO 完全失活的时间分别为 40、28、16 s;在 240 μL 时,马铃薯 PPO 活性完全受到抑制。

从图 1-C 中可以看出,苦荞茎叶磷酸盐提取物在 15 μL 时对马铃薯的抑制效果显著,在 48 s 时可使马铃薯 PPO 完全失活;在添加量为 30、60、120 μL 时使 PPO 完全失活的时间分别为 32、24、12 s;在 240 μL 时,马铃薯 PPO 活性完全受到抑制。

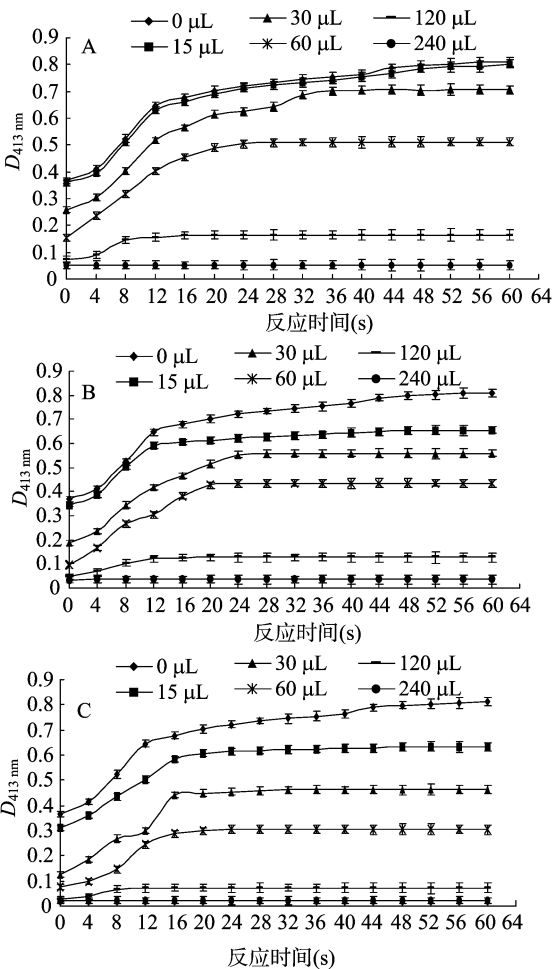
3 种苦荞茎叶提取物对 PPO 活性影响的动力学曲线(图 1)表明:马铃薯 PPO 氧化邻苯二酚的反应和产物的生成速度初始较快,随着反应时间的延长,PPO 的活性逐渐降低,曲线斜率逐渐降低,这是由于生成的醌类物质使多酚氧化酶活性受到抑制的结果,即存在反馈抑制作用。说明 3 种提取物对马铃薯 PPO 的抑制作用都是可逆的。

2.2 3 种提取物对马铃薯 PPO 活性影响的比较

表 1 结果表明,3 种提取物对黑美人马铃薯 PPO 存在显著的抑制效果,且提取物间差异显著,其中以磷酸盐提取物的抑制效果最佳。

2.3 3 种提取物成分分析

由表 2 可以看出,磷酸盐提取物中的蛋白质浓度与总黄酮浓度均较高,水提取物中的总黄酮含量最低。



A—水提取物; B—醇提取物; C—磷酸盐提取物
图1 苦荞茎叶提取物对马铃薯 PPO 活性影响的动力学曲线

表 1 不同剂量的苦荞茎叶 3 种提取物对马铃薯 PPO 活性的影响

苦荞茎叶提取物 剂量(μL)	PPO 平均抑制率(%)		
	水提取物	醇提取物	磷酸盐提取物
0	Of	Of	Of
15	2.16 ± 0.8e	11.51 ± 1.24e	30.94 ± 1.4d
30	6.83 ± 0.9d	17.63 ± 2.13d	37.05 ± 2.1c
60	10.79 ± 1.1c	24.82 ± 2.21c	39.21 ± 2.3c
120	70.14 ± 2.5b	73.38 ± 3.41b	84.53 ± 3.4b
240	99.64 ± 3.8a	99.64 ± 3.42a	99.28 ± 3.2a

注:同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

表 2 水提取物、醇提取物、磷酸盐提取物中基本成分分析

提取物	蛋白质(mg/g)	总黄酮(mg/g)
水提取物	3.63 ± 0.52	32.2 ± 2.42
醇提取物	0.86 ± 0.037	71.4 ± 2.84
磷酸盐提取物	4.55 ± 0.33	58.4 ± 3.02

3 讨论

苦荞茎叶中的主要有效活性成分是黄酮类,已从苦荞茎叶中分离鉴定出芸香苷、槲皮素、山奈酚等多种黄酮类成分^[9,11]。刘文山等发现黄酮物质可抑制苹果多酚氧化酶活

性^[13]。林敏等用柿叶提取物对马铃薯 PPO 的抑制效果进行了研究,发现它可以非竞争性地抑制 PPO 活性^[12]。柿叶提取物中的主要有效活性成分是黄酮,它是一种抗氧化剂,可清除氧自由基,从而阻断氧对 PPO 的激活。同时,黄酮结构中的还原性羟基具有孤对电子,可与 PPO 分子中的 Cu^{2+} 络合,从而影响 PPO 的活性。

本试验研究结果表明:苦荞茎叶水提物、50% 乙醇提取物、0.2 mol/L pH 值 6.8 的磷酸盐缓冲液提取物对黑美人马铃薯 PPO 活性均存在抑制作用,表明苦荞茎叶含有多种 PPO 抑制成分;磷酸盐提取物的抑制效果强于醇提取物与水提取物;3 种提取物对 PPO 的抑制作用均为可逆的。Kubglomsong 等发现从米糠中提取的蛋白质,在 pH 值为 4~5 的环境中,对马铃薯块茎 PPO 具有较强的抑制效应^[14]。同时,对米糠提取物中的有效成分进行高效液相色谱分离并定量分析,发现原儿茶酸、香草酸、香豆酸等对马铃薯 PPO 抑制效果不一致,混合物的抑制效果最佳^[2]。另外发现,各种氨基酸对 PPO 也具有抑制效应^[15]。本试验对 3 种提取物中的蛋白质和总黄酮含量进行了测定,结果表明磷酸盐提取物中的蛋白质含量最高,而总黄酮含量也达到 58.4 mg/g,而醇提取物中的总黄酮含量最高,达到 71.4 mg/g(表 2)。因此,磷酸盐提取物对马铃薯 PPO 的抑制效果最佳,很可能是因为其同时含有较高含量的蛋白质和总黄酮。乙醇提取物中的蛋白质含量远远低于水提取物,而醇提取物对马铃薯 PPO 的抑制效果却强于水提取物,表明苦荞茎叶中对 PPO 产生抑制作用的主要有效成分是黄酮类物质。动物药理试验表明,苦荞叶提取物可提高红细胞超氧化物歧化酶活性,对羟自由基和超氧阴离子均有较强的清除能力^[10,16]。黄酮类化合物含有能提供活泼质子的多酚结构,并以 $\text{C}_6-\text{C}_3-\text{C}_6$ 结构为基本母核^[17],因此,推测黄酮类物质是通过原子的空间排列位阻或改变 PPO 酶蛋白的空间结构,从而阻止底物与酶的结合,其中黄酮化合物中羟基的数目和空间排列是其抑制作用的决定因素,一般羟基数目越多,抑制效果越好,羟基邻位排列比间位排列的抑制作用更佳^[18]。

经过对苦荞茎叶提取物抑制马铃薯 PPO 作用的动力学研究,推测其抑制机理与其抗氧化特性机理及蛋白质、氨基酸与多酚、PPO 的相互作用有关。参考 Sukhonthara 等的研究结果^[2,12,15],笔者认为其可能的机制为:(1)苦荞茎叶提取物对氧自由基的清除作用既阻断了氧与 PPO 反应的引发,同时,削弱了 PPO 的供氧作用,阻断了氧对 PPO 的激活,从而抑制了褐变的强度;(2)黄酮类化合物中的还原性羟基中的孤对电子,可与 PPO 分子中的 Cu^{2+} 发生络合反应,从而达到影响 PPO 酶活性的效果;(3)提取物中的蛋白质、氨基酸可与褐变反应的底物多酚发生反应,形成有色物质并与褐色相区别,从而阻断了褐变反应的发生,或者催化 PPO 氧化产物醌降解,从而减少褐变物质的产生。

4 结论

苦荞茎叶水提取物、醇提取物、磷酸盐提取物对黑美人马铃薯 PPO 均具有显著抑制效果,且均表现为可逆性抑制。在

添加量为 120 μL 时,抑制率分别达到 70.14%、73.38%、84.53%,表明磷酸盐缓冲液提取物对黑美人马铃薯 PPO 的抑制效果最佳。

参考文献:

- [1] 周向军,高义霞,袁毅君,等. “黑美人”马铃薯多酚氧化酶的特性研究[J]. 食品工业科技,2011,32(1):115-117.
- [2] Sukhonthara S, Kaewka K, Theerakulkait C. Inhibitory effect of rice bran extracts and its phenolic compounds on polyphenol oxidase activity and browning in potato and apple puree[J]. Food Chemistry, 2016,190:922-927.
- [3] Supapvanich S, Prathan P, Tepsorn R. Browning inhibition in fresh-cut rose apple fruit cv. Taaptimjaan using konjac glucomannan coating incorporated with pineapple fruit extract[J]. Postharvest Biology and Technology, 2012,73(3):46-49.
- [4] 李伟峰,何玲,冯金霞,等. 生姜提取物对鲜切苹果保鲜研究[J]. 食品科学,2013,34(4):236-240.
- [5] 王立新,刘红梅,胡建风,等. 毕节市苦荞产业发展现状、问题及其对策探讨[J]. 中国种业,2015(6):34-37.
- [6] Guo X N, Zhu K X, Zhang H, et al. Anti-Tumor activity of a novel protein obtained from tartary buckwheat[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010,11(12):5201-5211.
- [7] 刘刚,谭善财,胡细享,等. 黑苦荞茎叶提取物对高血糖小鼠降血糖功能的研究[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,2012,37(2):109-113.
- [8] 彭益强,刘鹏,邓峰,等. 源于马铃薯的多酚氧化酶活性中心必需基团组成与抑制机理[J]. 化工进展,2012,31(2):406-411.
- [9] 曹艳萍,芦翠英. 甜荞麦秸中提取总黄酮的工艺研究[J]. 食品科学,2004,25(11):161-163.
- [10] 曹艳萍. 苦荞叶提取物抗氧化性及其协同效应的研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(8):144-148.
- [11] 张午燕. 生长周期苦荞叶功能性成分动态变化及其叶茶的工艺优化[D]. 太谷:山西农业大学,2014.
- [12] 林敏,邱凌,钟雪,等. 柿叶提取物对马铃薯多酚氧化酶的抑制作用[J]. 广西农业生物科学,2008,27(4):412-416.
- [13] 刘文山,肖凯军,郭祀远. 苹果多酚氧化酶的提取及其抑制作用的研究[J]. 现代食品科技,2006,22(4):82-84.
- [14] Kubglomsong S, Theerakulkait C. Effect of rice bran protein extract on enzymatic browning inhibition in potato puree[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2014,49(2):551-557.
- [15] Ali H M, El-Gizawy A M, El-Bassiouny R E I, et al. The role of various amino acids in enzymatic browning process in potato tubers, and identifying the browning products[J]. Food Chemistry, 2016,192:879-885.
- [16] 李颖,许秀举,邓洋. 苦荞茶对衰老小鼠肝组织 SOD 和 MDA 影响的研究[J]. 食品研究与开发,2015,36(18):42-43.
- [17] 李娜,鲁晓翔. 酪氨酸酶抑制剂的研究进展[J]. 食品工业科技,2010,31(7):406-409.
- [18] 毕云枫,宋凤瑞,刘志强. 天然酪氨酸酶抑制剂的种类及其对酪氨酸酶抑制作用的研究进展[J]. 吉林大学学报:医学版,2014,40(2):454-459.