

谢冬娣,李丹梅,龚振维. 木瓜蛋白酶复合剂抑制淮山酶促褐变的应用[J]. 江苏农业科学,2017,45(24):179-182.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.24.048

木瓜蛋白酶复合剂抑制淮山酶促褐变的应用

谢冬娣,李丹梅,龚振维

(贺州学院食品与生物工程学院,广西贺州 542899)

摘要:以淮山、木瓜蛋白酶等为试验材料,研究木瓜蛋白酶复合剂对鲜切淮山的褐变防控效果,探索生物酶法在淮山鲜切加工中的应用。以多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)、褐变度(BD)为考察指标,在木瓜蛋白酶、抗坏血酸、氯化钠以及柠檬酸单一抑制剂对淮山褐变控制效果研究的基础上,采用正交试验,确定复合抑制剂在淮山褐变控制中的最佳组合。结果表明:柠檬酸、抗坏血酸和木瓜蛋白酶单一抑制剂对于防止鲜切淮山的褐变具有较好的效果,而NaCl溶液对于防止鲜切淮山的褐变效果不明显。采用柠檬酸、抗坏血酸和木瓜蛋白酶进行防褐变正交试验所筛选的最佳浓度组合为0.40%柠檬酸+0.20%木瓜蛋白酶+0.20%抗坏血酸,影响主次顺序为柠檬酸>木瓜蛋白酶>抗坏血酸。验证试验结果表明,BD值为0.194、PPO活性为0.21 U/mL、POD活性为9.2 U/mL的抑制褐变效果优于试验对照组。

关键词:木瓜蛋白酶;复合抑制剂;鲜切淮山;酶促褐变

中图分类号: TS255.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)24-0179-04

鲜切果蔬保持了果蔬原有的新鲜状态,又经过了加工而使产品清洁卫生,是满足现代都市人快速生活节奏的一种果蔬加工方式。淮山(Yam)为薯蓣科薯蓣属薯蓣的根茎,别称怀山药、淮山药,是药食同源的蔬菜。鲜切淮山在加工和贮藏

中极易产生褐变,严重影响其外观,不利于销售。目前对鲜切淮山褐变的控制主要采用物理方法^[1-4],也常使用化学护色方法^[5-7],但有一定局限性,极少有使用生物酶法的报道。由于木瓜蛋白酶已经被证实对抑制酶促褐变有显著效果^[6-8],但目前却尚未有将其用于抑制鲜切淮山褐变的研究。笔者将木瓜蛋白酶结合抗坏血酸(AA)、氯化钠(NaCl)以及柠檬酸(CA),以单一抑制剂对淮山褐变控制效果的研究为基础,采用正交试验优化,研究安全环保的木瓜蛋白酶复合抑制剂对鲜切淮山酶促褐变的影响,以期探索生物酶法在淮山鲜切加工中的应用,为鲜切淮山加工贮藏生产实践提供理论依据。

收稿日期:2016-06-26

基金项目:广西科学研究与技术开发计划(编号:桂科合 14251003);

广西贺州市科学研究与技术开发计划(编号:贺科攻 1541005)。

作者简介:谢冬娣(1968—),女,广西贺州人,副教授,主要从事果蔬贮藏与加工方面的研究。E-mail:xiedongdi@163.com。

- [2] Rahman K, Lowe G M. Garlic and cardiovascular disease: a critical review[J]. Journal of Nutrition, 2006, 136(3): 736-740.
- [3] Choi I S, Cha H S, Lee Y S. Physicochemical and antioxidant properties of black garlic[J]. Molecules, 2014, 19(10): 16811-16823.
- [4] Wang D, Feng Y H, Liu J, et al. Black garlic (*Allium sativum*) extracts enhance the immune system[J]. Med Arom Plant Sci Biotech, 2010, 4(1): 37-40.
- [5] 张桂芝, 张延杰, 莫红丽, 等. 黑蒜的研究进展[J]. 轻工科技, 2015(10): 19-21.
- [6] Amagase H, Petesch B L, Matsuura H, et al. Intake of garlic and its bioactive components[J]. Journal of Nutrition, 2001, 131(3): 955-962.
- [7] Beveridge T, Franze K, Harrison J. Clarified natural apple juice: production and storage stability of juice and concentrate[J]. Journal of Food Science, 1986, 51(2): 411-414.
- [8] Queiroz Y S, Ishimoto E Y, Bastos D H, et al. Garlic (*Allium sativum* L.) and ready-to-eat garlic products: in vitro antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2009, 115(1): 371-374.
- [9] 连毅, 乔旭光, 李燕, 等. 大蒜多酚氧化酶特性的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 290-293.
- [10] 王雪峰, 沈颂东, 连玉官, 等. 大蒜超氧化物歧化酶的分离纯化

及其性质的研究[J]. 安徽农业科学, 2001, 29(3): 408-409.

- [11] 胡君萍, 杨建华, 王新玲, 等. 新疆沙枣果实不同部位总酚的含量测定[J]. 食品科学, 2010, 31(6): 220-222.
- [12] Dorman H J, Kosar M, Kahlos K, et al. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2003, 51(16): 4563-4569.
- [13] 焦中高, 刘杰超, 王思新. 黑莓红色素抗氧化活性的研究[J]. 食品科技, 2003(8): 63-65.
- [14] 尧渝, 江和源, 袁新跃. 茶叶功能成分提取制备专题(二) 茶多酚的提取制备技术[J]. 中国茶叶, 2009(2): 11-13.
- [15] 安东. 黑蒜加工工艺的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011.
- [16] Kwon O C, Woo K S, Kim T M, et al. Physicochemical characteristics of garlic (*Allium sativum* L.) on the high temperature and pressure treatment[J]. Korean Journal of Food Science and Technology, 2006, 38(3): 331-336.
- [17] 王卫东, 王滢, 王超, 等. 美拉德反应对大蒜营养成分和抗氧化性的影响[J]. 食品科技, 2013(4): 42-44.
- [18] Zhu K X, Huang S, Peng W, et al. Effect of ultrafine grinding on hydration and antioxidant properties of wheat bran dietary fiber[J]. Food Research International, 2010, 43(4): 943-948.

1 材料与方法

1.1 试验材料及主要药品

主要材料:贺街淮山,为国家地理标志保护产品;保鲜袋;木瓜蛋白酶(酶活性 100 万 U)、抗坏血酸、氯化钠、柠檬酸、邻苯二酚、H₂O₂、愈创木酚,以上药品均为分析纯。

1.2 试验处理方法

挑选外皮完好、无病害、无机械损伤的淮山,切成厚度为 3~4 mm 的斜片^[2],然后用不同浓度的抑制剂浸泡处理 1 h,晾干表面处理液后,平铺装入保鲜袋中,置于 5℃ 冷藏库贮藏。抗坏血酸浓度设为 0.10%、0.15%、0.20%、0.25%、0.30%。氯化钠浓度设为 0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%。柠檬酸浓度设为 0.25%、0.30%、0.35%、0.40%、0.45%。木瓜蛋白酶浓度设为 0.10%、0.15%、0.20%、0.25%、0.30%。设不浸泡处理为对照组。试验观察贮藏期 5 d,第 5 天检测淮山的多酚氧化酶(PPO)活性、过氧化物酶(POD)活性、褐变度(BD)等指标。试验设 3 个重复。

在单一抑制剂单因素试验基础上,筛选出抑制褐变效果明显的 3 个因素及其浓度水平,进行正交试验,确定各种抑制剂与木瓜蛋白酶的最佳组合。正交试验各因素浓度水平设计见表 1。

表 1 各因素浓度水平

水平	因素		
	A:柠檬酸 浓度(%)	B:抗坏血酸 浓度(%)	C:木瓜蛋白酶 浓度(%)
1	0.30	0.15	0.15
2	0.35	0.20	0.20
3	0.40	0.25	0.25

1.3 指标检测方法

褐变度的测定:采用吸光度法,将样品直接打碎,取适量样品按体积比 1:10 添加蒸馏水,低温下匀浆 2 min,过滤后取滤液于 25℃ 保温 5 min,在波长 410 nm 处测定其吸光度,重复 3 次,以 D_{410 nm}×10 表示褐变度。褐变度越高,表示褐变越严重。

多酚氧化酶活性测定:采用邻苯二酚法^[9],以 1 min 内吸光度变化 0.01 为 1 个酶活性单位,单位 U/mL。过氧化物酶活性测定:采用愈创木酚法^[9],以 1 min 内吸光度变化 0.01

为 1 个酶活性单位,U/mL。

2 结果与分析

2.1 柠檬酸抑制鲜切淮山酶促褐变效果

2.1.1 柠檬酸处理对淮山褐变度的影响 图 1 显示,在 5℃ 的冷藏条件下,鲜切淮山经过不同浓度柠檬酸处理,其褐变度 BD 值均低于对照组。其中,在 0.25%~0.40% 柠檬酸浓度范围内,随着柠檬酸浓度增大,淮山的 BD 值一直呈现下降趋势;柠檬酸浓度为 0.40% 时的 BD 值最低,与对照组差异最大;而在柠檬酸浓度为 0.45% 时淮山的 BD 值较高,但仍低于对照组。结果表明,柠檬酸处理浓度在 0.40% 时,对鲜切淮山的褐变抑制效果较好。

2.1.2 柠檬酸处理对淮山 PPO、POD 活性的影响 图 2 显示,鲜切淮山经过不同浓度柠檬酸处理,其多酚氧化酶活性均明显比对照组低,即表明柠檬酸能抑制鲜切淮山的 PPO 活性。原因可能是柠檬酸处理既调节反应体系 pH 值,又对 PPO 的辅基起到螯合作用^[6],从而抑制 PPO 活性。当柠檬酸浓度为 0.30%~0.45% 时,各处理组淮山 PPO 活性差异不明显,其中 0.35% 浓度处理的淮山 PPO 活性最低,与 0.25% 浓度处理的差异较大。表明浓度为 0.35% 的柠檬酸抑制 PPO 活性效果比较明显。图 2 也显示,在柠檬酸浓度试验范围内,各处理组淮山的多酚氧化物酶活性均比对照组低,但不明显;各处理组淮山 POD 活性差异也不明显,即表明柠檬酸能较好地抑制鲜切淮山的 PPO 活性,但不能很好地抑制鲜切淮山的 POD 活性,这类似于李红涛等研究的柠檬酸不能有效抑制淮山贮藏期间 POD 活性的结果^[7]。

2.2 抗坏血酸抑制鲜切淮山酶促褐变效果

2.2.1 抗坏血酸处理对淮山褐变度的影响 从图 3 可以看出,鲜切淮山经不同浓度抗坏血酸处理,除浓度为 0.3% 的处理外,其余浓度的抗坏血酸溶液处理的淮山的褐变度(BD 值)均比对照组的低。原因可能是因为抗坏血酸作为还原剂,阻止醌类物质进一步自发聚合形成色素物质^[6]。其中,浓度为 0.10%、0.15%、0.20% 抗坏血酸处理的 BD 值差异不明显,而 0.25% 抗坏血酸处理的淮山的 BD 值最低,与对照组、0.30% 处理组差异明显,说明 0.25% 抗坏血酸对淮山褐变抑制效果较好。

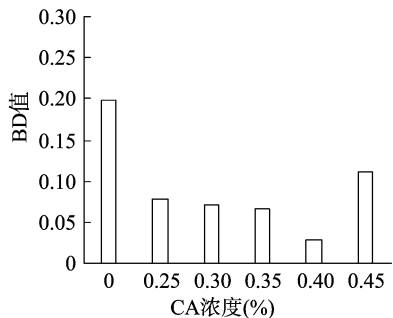


图1 CA对淮山褐变度的影响

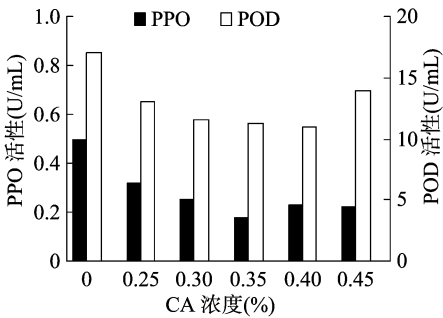


图2 CA对淮山 PPO 和 POD 活性的影响

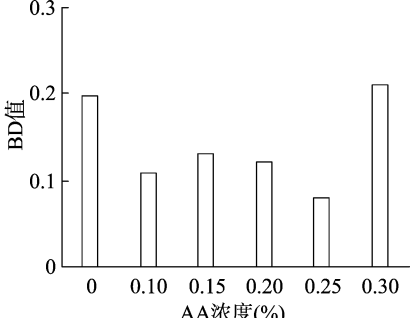


图3 AA对淮山褐变度的影响

2.2.2 抗坏血酸处理对淮山 PPO、POD 活性的影响 从图 4 可以看出,不同浓度的抗坏血酸处理的鲜切淮山 POD 活性均比对照组的低。从 0.10% 浓度处理开始逐渐下降,到 0.20%

浓度处理降到最低点,之后,随着抗坏血酸处理浓度的升高,淮山的 POD 活性逐渐升高。结果表明,在一定范围内,淮山 POD 活性随着 AA 浓度增加而降低,之后随着浓度增加而升

高。其中 0.20% 抗坏血酸溶液对淮山 POD 活性抑制效果较好。经过抗坏血酸处理的淮山的 PPO 活性也都比对照组的低,但是波动较大,在 0.15%、0.20% 浓度处理时分别达到最低、最高的 PPO 活性。这可能是由于抗坏血酸虽有金属螯合作用,但是同时抗坏血酸也具有还原性、氧化性,能将氧化的醌还原为酚类物质而抑制褐变,但其本身比酚类物质更易于氧化褐变^[7]。

2.3 木瓜蛋白酶抑制鲜切淮山酶促褐变效果

2.3.1 木瓜蛋白酶处理对淮山褐变度的影响 蛋白酶可导致一些促进褐变的酶系失活,从而抑制褐变的发生^[6]。从图 5 可以看出,经不同浓度木瓜蛋白酶处理的淮山的 BD 值大部

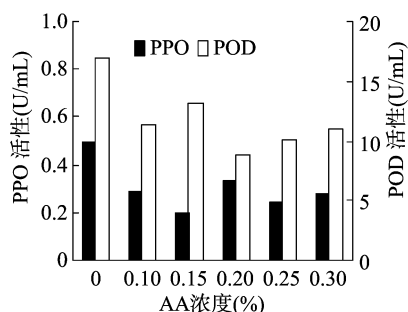


图4 AA 对淮山 PPO 和 POD 活性的影响

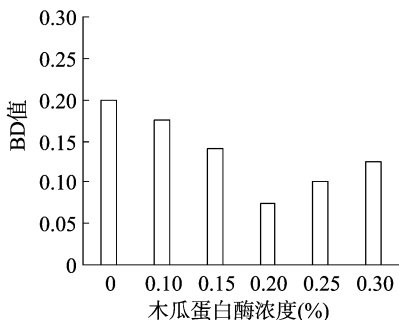


图5 木瓜蛋白酶对淮山褐变度的影响

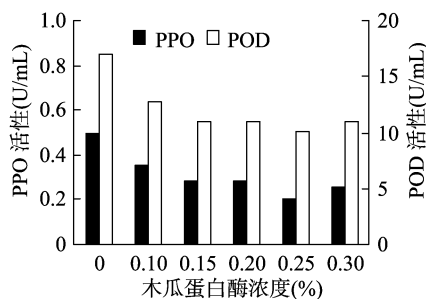


图6 木瓜蛋白酶对淮山 PPO、POD 活性的影响

2.4 氯化钠抑制鲜切淮山酶促褐变效果

2.4.1 NaCl 处理对淮山褐变度的影响 由图 7 可以看出,在处理浓度 0.5% ~ 0.8% 范围内,经 NaCl 处理的鲜切淮山的 BD 值随着 NaCl 溶液浓度的增加而逐渐升高,且大部分都高于对照组,表明 NaCl 溶液不能很好地保持淮山的感官特质,而且随着浓度的增加,效果越来越差。

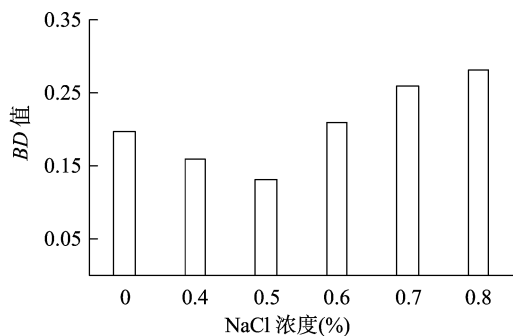


图7 NaCl 对淮山褐变度的影响

2.4.2 NaCl 处理对淮山 PPO、POD 活性的影响 NaCl 可以通过降低果蔬表面的氧溶解度而抑制 PPO 的氧化作用,亦或是使褐变酶发生盐析作用,从而抑制褐变^[1]。由图 8 可以看出,经过不同浓度 NaCl 处理的鲜切淮山的 PPO 活性基本上比对照组的低,在 NaCl 处理浓度为 0.5% ~ 0.8% 范围内,鲜切淮山 POD 活性均比对照组的低,但差异均不明显,其中 0.5% 浓度 NaCl 处理的淮山 PPO 活性最高,并且达到对照组水平;随着处理浓度的升高,淮山 PPO 活性逐渐下降,但是下降缓慢。0.4% 浓度处理的淮山 POD 活性最高,超过对照组水平。试验结果表明,NaCl 溶液对鲜切淮山的 PPO、POD 活性有一定的抑制作用,但是效果均不明显。

分比对照组的低,表明木瓜蛋白酶对于控制淮山的褐变度有一定的效果,但是在低浓度时效果不明显,其中 0.20% 浓度的木瓜蛋白酶抑制淮山褐变的效果最明显。

2.3.2 木瓜蛋白酶处理对淮山 PPO、POD 活性的影响 从图 6 可以看出,经过不同浓度木瓜蛋白酶处理的鲜切淮山的 PPO、POD 活性均比对照组的低。原因可能是由于木瓜蛋白酶与醌类物质偶联中断醌聚合,或与 PPO、POD 的辅基螯合而抑制了酶的活性^[6]。在处理浓度 0.10% ~ 0.25% 范围内, PPO、POD 活性随木瓜蛋白酶浓度增大而降低;在处理浓度在大于 0.25% 之后有升高的趋势。结果表明,0.25% 木瓜蛋白酶浓度处理对淮山 PPO、POD 活性的抑制效果较好。

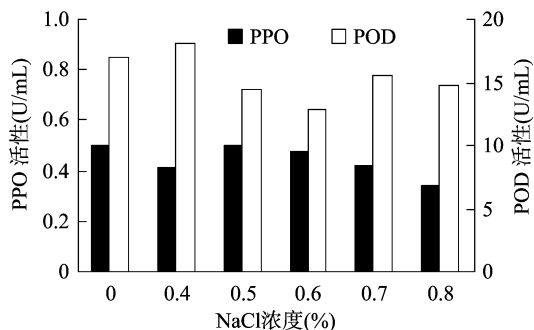


图8 NaCl 对淮山 PPO、POD 活性的影响

2.5 复合因素处理抑制鲜切淮山褐变的结果与分析

根据“2.1”至“2.4”节的结果分析,柠檬酸、抗坏血酸和木瓜蛋白酶单一处理的鲜切淮山各项指标都比对照组的好,表明其抑制鲜切淮山褐变的效果比较好;而经过 NaCl 溶液处理的鲜切淮山各项指标与对照组很接近,有些比对照组差。因此选择柠檬酸、抗坏血酸和木瓜蛋白酶作为正交试验的因素。

根据图 1 至图 8 的数据进行综合分析,由于引起淮山褐变的酶主要是 PPO,所以在用褐变抑制剂处理鲜切淮山时,以 PPO 活性作为首要指标来判断各浓度抑制剂防褐变效果的强弱,以其他 2 项指标作为辅助指标,每个因素选择 3 个浓度水平(表 1)进行正交试验。试验的结果与分析分别见表 2、表 3。

从表 3 可以看出,在 BD 值、PPO 活性、POD 活性方面,A 是主要因素;在 BD 值、PPO 活性方面,C 是次要因素,B 是次要因素;在 POD 活性方面,B 是次要因素,C 是次要因素。综合考虑可知,3 个因素对 3 个指标影响的主次顺序为 A > C > B。因素 A、因素 C 的水平按“少数服从多数”原则

分别选择 A₃、C₂。因素 B 对 3 个指标的影响水平各不相同,难以选择。因此,对组合 A₃B₁C₂、A₃B₂C₂、A₃B₃C₂ 进行验证试验。验证结果中,A₃B₂C₂ 组合(柠檬酸浓度 0.40%、抗坏血酸浓度 0.20%、木瓜蛋白酶浓度 0.20%)最优,获得 BD 值 0.194、PPO 活性 0.21 U/mL、POD 活性 9.2 U/mL 的抑制褐变效果。

表 2 复合抑制剂正交试验结果

试验号	试验因素			试验结果		
	A	B	C	BD 值	PPO 活性 (U/mL)	POD 活性 (U/mL)
1	1	1	1	0.281	0.20	15.7
2	1	2	2	0.130	0.40	11.4
3	1	3	3	0.131	0.450	12.2
4	2	1	2	0.165	0.35	21.6
5	2	2	3	0.302	0.60	22.0
6	2	3	1	0.422	0.60	12.5
7	3	1	3	0.345	0.40	13.6
8	3	2	1	0.215	0.25	12.7
9	3	3	2	0.284	0.20	9.4

表 3 复合抑制剂正交试验结果分析

检测指标	类别	因素		
		A	B	C
BD 值	k ₁	0.181	0.230	0.306
	k ₂	0.296	0.216	0.193
	k ₃	0.281	0.279	0.259
	R	0.115	0.063	0.113
PPO 活性	k ₁	0.350	0.317	0.350
	k ₂	0.517	0.417	0.317
	k ₃	0.283	0.417	0.483
	R	0.234	0.100	0.166
POD 活性	k ₁	13.1	17.0	13.6
	k ₂	18.7	15.4	14.1
	k ₃	11.9	11.4	15.9
	R	6.8	5.6	2.33

3 讨论与结论

本试验遵循降低酸度、金属螯合作用、醌还原作用、醌偶联作用等褐变控制机制,探讨冷藏(5℃)条件下鲜切淮山酶促褐变的控制措施。有关研究表明,鲜切果蔬的褐变主要是酶促褐变,大多认为与酚类物质含量和 PPO 活性密不可分^[1,10-11],淮山多酚氧化酶的最适 pH 值=6.0^[12],那么降低介质中的 pH 值,可以控制酚酶的活性,抑制其催化作用。通常通过添加酸控制 pH 值使酚酶的活性丧失^[6]。PPO、POD 都是以金属离子作为辅基的一种蛋白质,它被金属螯合物所抑制。柠檬酸是良好的酸化剂,除了通过调节反应体系 pH 值来抑制褐变外,其结构中的 3 个羧基还可以对金属离子起到较强的螯合作用^[6]。而抗坏血酸既有金属螯合作用,也可作为醌还原剂,从而清除自由基和活性氧,将氧化的醌还原为酚类物质^[3]。木瓜蛋白酶属于巯基蛋白酶,活性中心含半胱

氨酸,可以作为醌类偶联剂,能与醌类物质形成无色的复合物,从而中断醌类物质聚合成色素物质;同时木瓜蛋白酶可以通过与 PPO、POD 活性位点的金属离子不可逆结合而抑制褐变相关酶的活性^[6]。为了达到良好防褐变效果,单一抑制剂长期使用或者高浓度使用会带来成本高、危害健康等问题。因此,多种抑制剂复合使用可起到协同增效作用,既可以避免以上问题,也可成为鲜切淮山加工及贮藏过程中的防褐变控制方向。

本研究发现,鲜切淮山极易褐变,与相关报道有相同的结论。在试验过程中发现单独用柠檬酸或抗坏血酸处理鲜切淮山时,在 PPO 活性、POD 活性这 2 个指标中,不同浓度影响酶活性强弱的顺序差别较大。这可能是由于抗坏血酸虽然是一种 PPO 活性抑制剂,但作为抗氧化剂,它比酚类物质更易氧化褐变,故不宜单独用于防止淮山褐变;而柠檬酸、植酸、氯化钙等复合剂仅对 PPO 活性有抑制作用,在鲜切淮山贮藏期间还会使 POD 活性有所提高^[7]。

综上试验结果表明,柠檬酸、抗坏血酸和木瓜蛋白酶抑制鲜切淮山的褐变具有较好的效果,而 NaCl 溶液对于防止鲜切淮山的褐变效果不明显;采用柠檬酸、抗坏血酸和木瓜蛋白酶进行正交试验所筛选的最佳抑制剂组合为 0.40% 柠檬酸+0.20% 木瓜蛋白酶+0.20% 抗坏血酸,各抑制剂作用主次顺序为柠檬酸>木瓜蛋白酶>抗坏血酸。本试验将木瓜蛋白酶用于鲜切淮山褐变控制是首例,其效果接近柠檬酸和抗坏血酸,优于氯化钠,说明其效果较好,值得推广。

参考文献:

[1]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.

[2]杨振生,付晏昆. 速冻山药生产工艺研究[J]. 企业科技与发展,2004(2):47-48.

[3]王安建,黄纪念,王玉川. 微波真空冻干山药生产工艺的研究[J]. 食品工业,2007(5):35-36.

[4]范文广,王庆国,毛春芳. 热处理控制鲜切山药褐变研究[J]. 食品与发酵科技,2009,45(2):38-41.

[5]范文广. 鲜切山药褐变控制技术研究[D]. 泰安:山东农业大学,2009.

[6]孙芝杨,钱建亚. 果蔬酶促褐变机理及酶促褐变抑制研究进展[J]. 中国食物与营养,2007(3):22-24.

[7]李红涛,袁书林. 山药加工无硫护色方法研究[J]. 食品科技,2010(4):81-83,87.

[8]张京芳. 鲜切莲藕酶褐变的控制方法[J]. 资源开发与市场,2005,21(2):91-92.

[9]徐玮,汪东风. 食品化学化学实验和习题[M]. 北京:化学工业出版社,2008.

[10]闵婷,谢君,郑梦林,等. 果蔬采后酶促褐变的机制及控制技术进展[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):273-276

[11]冯英娜,巫建华,颜志明,等. 丝瓜耐褐变性和种质资源分类的研究进展[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):199-201.

[12]陈艳珍,任广跃,张仲欣. 怀山药多酚氧化酶特性及其无硫护色研究[J]. 中国食品添加剂,2009(5):107-112.