# 广东芝麻香蕉加工中的酶褐变研究(Ⅰ)
## ——多酚氧化酶的提取、分离及其特性研究

塔卡基* 杨方琪 高福成

(食品科学与工程系)

**摘要** 由于香蕉加工中的酶褐变主要是多酚氧化酶引起的,因此本文研究了多酚氧化酶的提取及其特性和交联葡聚糖G-75(SEPHADEX G-75)分离纯化;比较了加入PVP(聚乙烯吡咯酮)和PEG(聚乙二醇)的效果,发现对酶特性有一定的影响。通过差热扫描分析,由SEPHADES G-75分离的两种不同形式的多酚氧化酶蛋白的变性温度分别为93.03℃和89.42℃;最适pH分别为6.8和5.9. 多酚氧化酶与邻-二酚反应产物在λ=414nm下有最高吸收。

**关键词** 香蕉;多酚氧化酶;褐变

## 0 引 言

香蕉是分布于南北纬30℃以内的热带和亚热带水果,果实中含有淀粉、蛋白质、脂肪、果胶、胡萝卜素、维生素$B_1$、$B_2$、维生素C、维生素E及Ca等,是人们喜爱的果品之一。

香蕉成熟后较难在长期内保鲜,因此人们把香蕉加工成各种各样的香蕉制品,以减少浪费。

在加工中酶褐变是令人头痛的一个重要问题。它直接影响到产品的质量。

酶褐变是香蕉(同其它果蔬)受到损伤时,其组织被暴露在空气中,所含的酚类化合物在多酚氧化酶催化条件下进行氧化还原反应而醌式化,再通过一系列的反应而聚合成合色素的过程。这种使食品色泽变褐的显象给果蔬的贮藏与加工带来十分不利的影响,所以人们对防止酶促褐变方法的研究极为重视。

## 1 仪器以及主要材料和试剂

### 1.1 仪器

分析天平,台秤,组织捣碎机(DS-1型),冷冻离心机(FL-20型,RA-3钻头),冰箱,分光

收稿日期:1993-12-01

* 多哥研究生

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

光度计(721 型),恒流泵(HL-2 型),层析柱(1.6×80cm),自动部分收集器(BSZ-100 型)。

### 1.2 主要材料

香蕉(市场上购买的广东芝麻香蕉)。

### 1.3 主要试剂

聚乙烯吡咯烷酮(PVP),聚乙二醇(PEG),磷酸盐缓冲液(0.2mol/L,pH7.0),TWEEN 80,丙酮,SEPHADEXG-75.

## 2 方 法

### 2.1 酶的提取方法

称取 100g 香蕉果肉加入含 1%PVP 的 0.2mol/L,pH7.0 磷酸盐缓冲液(-5℃,250ml),然后用 DS-1 型高速组织捣碎机,再 10000r/min 转速下捣碎 3min,将糊状的香蕉混合物用 FL-20 型冷冻离心机,RA-3 钻头,在 0℃,60000r/min 条件下离心 15min,将清液和沉淀分离,沉淀中再加入含 1%PVP 的 0.2mol/L,pH7.0 磷酸盐缓冲液(-5℃,250ml),然后再与第一次捣碎相同的条件下捣碎 3min,再冷冻离心(条件同第一次);所得的沉淀排除,而所得的清液与第一次得到的清液混合(约为 500ml)。在混合清液中加入已在-18℃下冷却的丙酮(-15℃,1000ml);丙酮要慢慢地加入,一边加入,一边慢慢地搅拌,加入完毕保持 15min,然后冷冻离心(条件同上);所得的清液进行丙酮回收,而所得的沉淀 1000ml,-5℃的含 1%TWEEN80 的 0.2mol/L,pH7.0 磷酸盐缓冲液,捣碎 5s,然后用磁力搅拌机 3℃下搅拌 1h,最后进行冷冻离心(条件同上),所得的沉淀排除,而所得的清液即为多酚氧化酶液,称 PPOα,其量约为 1000ml.

用上述同样的方法,将 PVP 换为 PEG,即得 PPOβ.

### 2.2 酶与底物反应物的光谱吸收

分别将 PPOα,PPOβ,邻-二酚与底物反应产物进行吸收波长的测定。

### 2.3 SEPHADEXG-75 凝胶色谱分离纯化

将 SEPHADEXG-75 在过量的 0.2mol/L,pH7.0 邻酸盐缓冲液中过夜,充分膨胀,然后装入 1.6×80cm 色谱柱用同样的缓冲液洗脱并以 BSZ-100 型自动部分收集器收集,吸脱时采用 HL-2 型恒流泵。为了得到比较好的分离效果,按下表进行不同的加样量和收集量试验。

| PPO 种类 | PPOα | PPOβ | PPOα | PPOα | PPOα | PPOα |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 加样量 | 30 | 15 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 洗脱速率(ml/min) | 1.40 | 1.40 | 0.68 | 0.68 | 0.68 | 0.68 |
| 每根管收集量(ml) | 5 | 15 | 15 | 15 | 10 | 5 |
| 总收集量(ml) | 250 | 250 | 345 | 225 | 600 | 225 |

### 2.4 多酚氧化酶的生理活性检测试验

**2.4.1** 最适温度的测定 在 pH7.0 下进行不同温度(8～72℃)下的酶活力测定。

**2.4.2** 最适 pH 的测定 在最适合温度下进行不同 pH 值(5.6～7.4)下的酶活力测定。

**2.4.3** 米氏常数 $Km$ 的测定 在最适温度和最适 pH 的条件下,进行不同底物浓度下的活

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

力测定后，借助于米氏方程测定 $Km$ .

**2.4.4** *差热扫描分析*(DSC) 称取一定量的所提纯的 PPOA Ⅰ和 PPOA Ⅱ，密封在铝制的小盘里，然后用差热扫描分析仪(DSC7)进行分析，扫描温度为 0～150 C，扫描速率为 5℃/min，记下酶变性时出现的峰值温度。

**2.5 过氧化物酶(POD)生理活性检测试验**

首先选择测定波长为 λ=470nm，然后配制 160mmol/L 愈创木酚的 50%乙醇-水溶液，0.5%$H_2O_2$ 的水溶液后，按 1∶1 混合即为反应底物。

**2.5.1** *最适温度的测定* 在不同温度下底物组成为 2ml 上述配制的溶液和 2ml 缓冲液和 0.5ml 酶液，在 λ=470nm 下测定反应速度。

**2.5.2** *最适 pH 的测定* 底物组成同上，在不同 pH 下测定活力。

**2.5.3** *米氏常数 Km 的测定* 在最适温度和最适 pH 的条件下，改变底物浓度进行 POD 活力测定(借助于米氏方程)。

## 3 结果与讨论

### 3.1 波长的选择

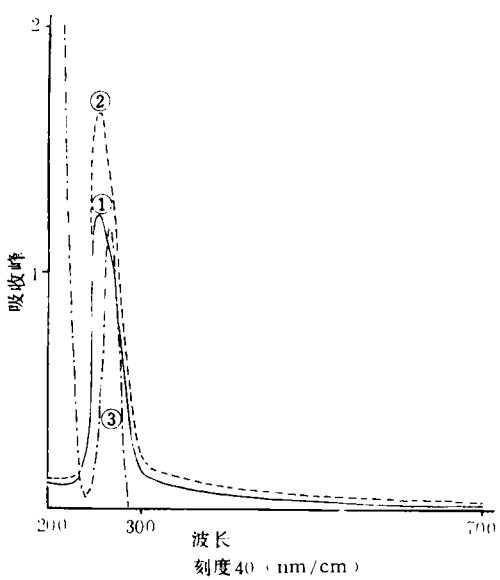



图 1 不同试样的吸收波长

①PPOα 的吸收情况：$A_{max}=A_{265}$任意稀释

②PPOβ 的吸收情况：$A_{max}=A_{265}$

③含 0.001mol/L$H_2SO_4$ 的 0.1mol/L 邻-二酚的吸收情况：$A_{max}=A_{276}$

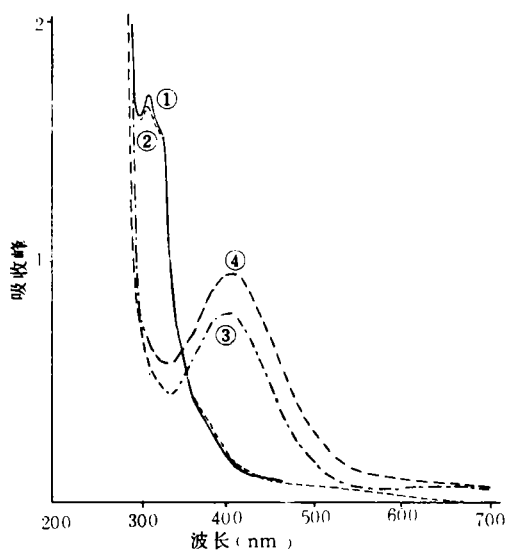



图 2 PPOα，PPOβ 和邻-二酚反应产物的光谱吸收情况

①——失活的 PPOα 与邻-二酚反应的光谱

②……失活的 PPOβ 与邻-二酚反应的光谱

③未失活的 PPOα、PPOβ 与邻-二酚反应的光谱(反应时间短)

④未失活的 PPOα、PPOβ 与邻-二酚反应的光谱(反应时间长)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

由图 1 可见,PPOα、PPOβ 与邻-二酚分别在 265nm、265nm 和 276nm 下有吸收峰。图 2 中①和②与图 1 类似,③④为 PPOα、PPOβ 与邻-二酚产物的光谱吸收情况,虽是同一样品,但③的反应时间比④短。由图 3 可见 PPOα、PPOβ 的反应产物在 414nm 下有吸收峰。这些图都是用自动扫描测定的。图 4 是 721 型分光光度计测定的,反应产物的最大吸收也在 414nm。因此选择该波长为测定波长。此波长与文献报道亦相符。

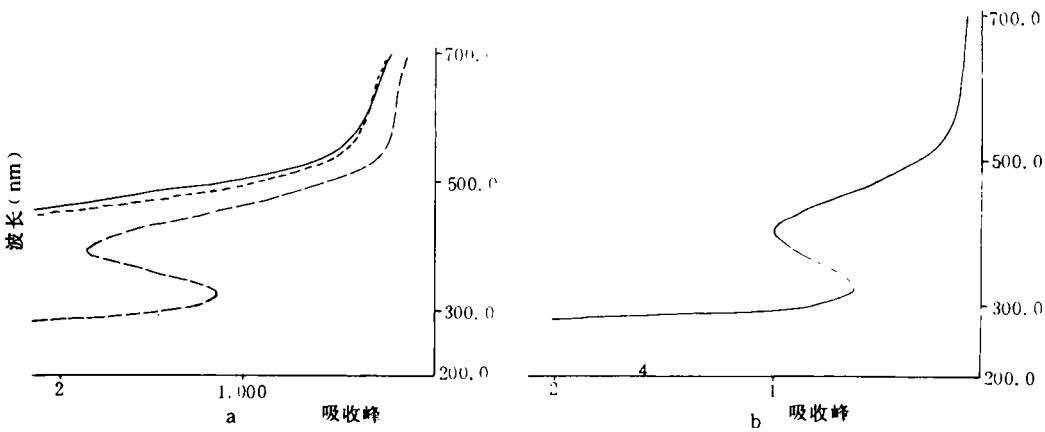



**图 3 反应产物的吸收情况**

(a)No. 1～No. 16 样品(PPOα 与邻-二酚反应产物)的吸收情况:$\lambda_{max}$ = 414nm;最大吸收峰值 $A_{max} = A_{414} = 2.028$

(b)将 No. 1～No. 16 样品稀释一倍后的吸收情况

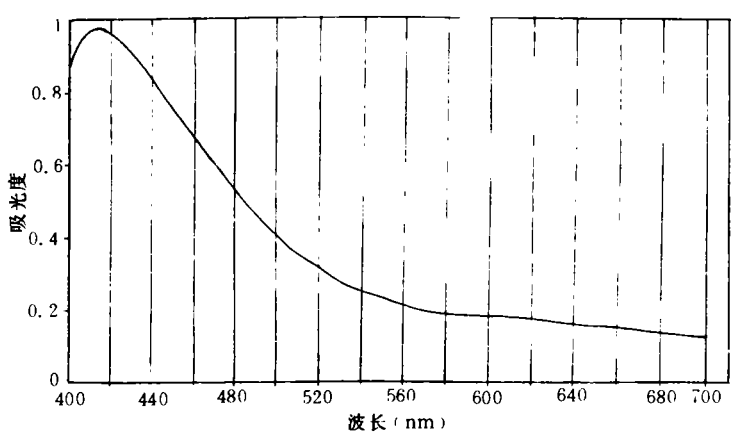



**图 4 波长与吸光度(用 721 型分光光度计)之间的关系曲线**

## 3.2 交联葡聚糖 G-75 凝胶色谱分离纯化

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

图5为PPOα的第一次分离结果，图6为PPOβ的分离结果，因经多次试验发现PPOα与PPOβ的特性差不多，而且在活性测定中，知PPOα的活性比PPOβ强，因此以后的分离纯化均以PPOα为对象进行测定和分析，其结果见图7(a)、7(b)，图8，图9. 图5出现了3条

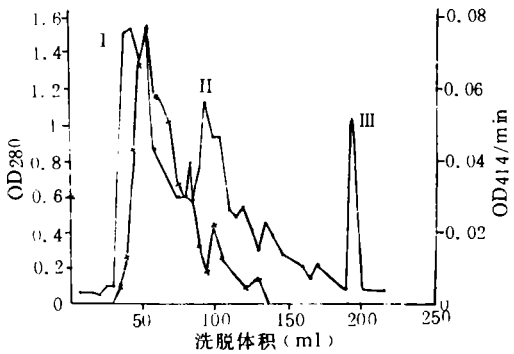



图5 样品PPOα第1次分离后的各段蛋白质(I、II、III)与活性测定

—●—蛋白质 —+—活性

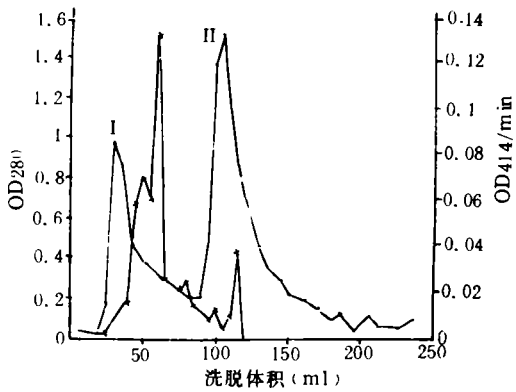



图6 样品PPOβ的各段蛋白质（Ⅰ、Ⅱ）与活性测定（第2次分离）

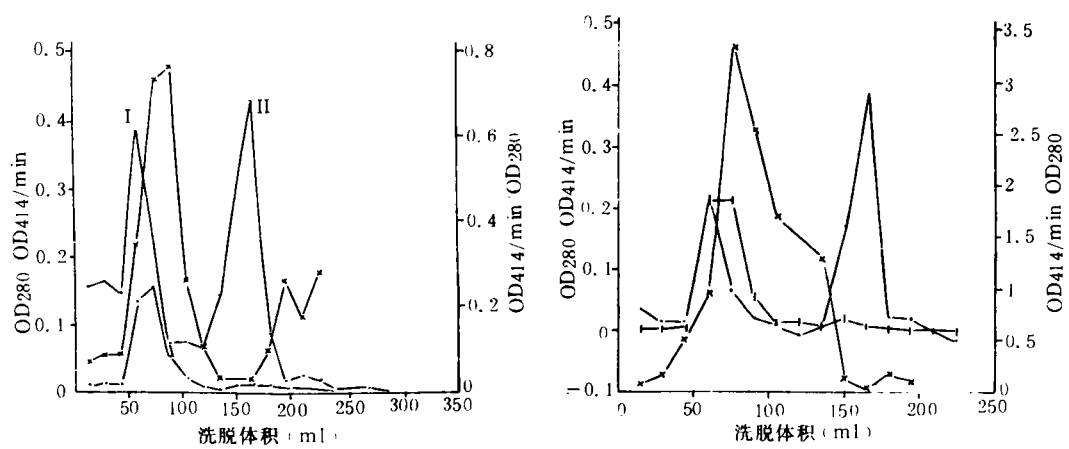



图7 蛋白质及其活性测定

(a)样品PPOα第3次分离 (b)样品PPOα第4次分离除去沉淀物后的溶液

蛋白带，这是由于加样量多使分离效果差所至。而图6，7，8，9中因减少了加样量，均只出现2条蛋白带。由图8看出，当总收集量达300ml时，所有的蛋白质基本上已收集完毕。图7(a)、7(b)较为相似，只是图7(b)中酶的活力比图7(a)强得多，这是因为粗酶液在冰箱中保存一定时间后出现了部分沉淀物，此沉淀物为非活性物质，经除去后使酶的浓度有所提高所致。总之，有交联葡聚糖G-75纯化酶时，当加样量为5ml，洗脱速率为0.68ml/min时，分离

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

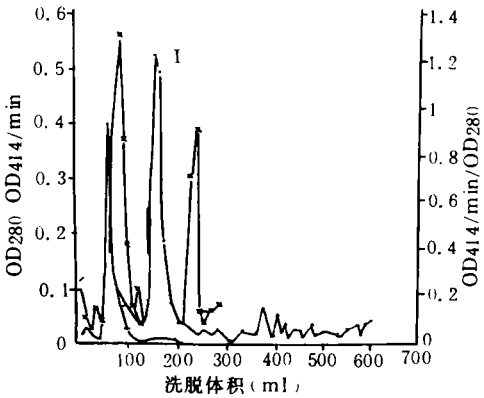



**图 8 第 5 次分离样品 PPOα 的蛋白质及其活性测定**

(每次收集量为 10ml 直至 600ml,I、II 分别为蛋白带)

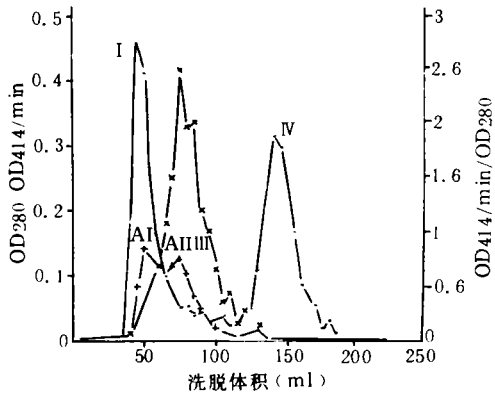



**图 9 样品 PPOα 第 6 次分离的蛋白质及其活性测定**

(每次收集量为 5ml 直至 225ml,I、II、III、IV 为蛋白带,II、III 活性相同,分子量相等,IV 无活性)

$A_I$——酶蛋白 I $A_{II,III}$——酶蛋白 II

效果最好,所纯化的酶出现 2 条主要的蛋白带。由图 9 知,当以邻-二酚为底物时,只有第一条蛋白质带具有活性,在测定活性时出现了二条峰,这进一步表明:广东芝麻香蕉中所提取的酶含有二种形式的多酚氧化酶,分别为 A Ⅰ和 A Ⅱ,虽然 A Ⅱ的 OD414/min 比较低,但它的比活力远远超过 A Ⅰ,因此可以认为 A Ⅱ是在褐变过程种起作用最大的多酚氧化酶。

### 3.3 酶的生理活性检测

**3.3.1 最适温度** 由图 10 可见,PPOα 和 PPOβ 的最适温度在 31.5℃左右,在 35℃和 40℃之间也有较高而且较宽的活性范围,由此可以认为是由于 PPO 以两种形式存在,取最适温度为 33℃.

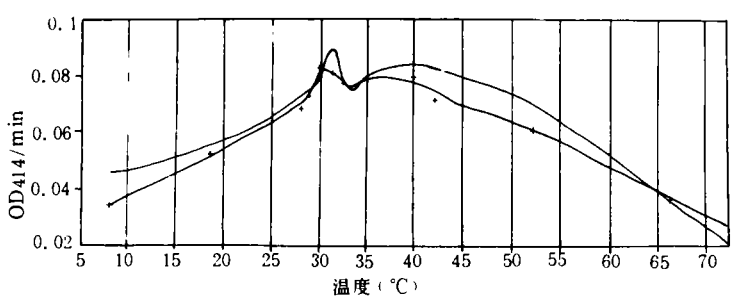



**图 10 PPO 的最适温度**

—— PPOα —●— PPOβ

PPO 在较低的温度时较稳定,反应物转变成产物的速度可用 Arrhenius 方程式来计算

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

$K = A_e E_a / RT$，其中 $E_a$ 为活性能，$K$ 为反应速度。由实验数据得 $E_a = 27.557$kJ/mol. 这是反应物转变成产物所需要的活化能，它表示分子在反应过程中超出基态所必须有的最少能量。

由图 11 可见，过氧化物酶(POD)的最适温度为 48℃，比 PPO 最适温度高得多。这表明 POD 的耐热性比 PPO 强。POD 是果蔬中最耐热的酶，因此在加工中的热处理时以它为标准。

**3.3.2** 最适 pH 由图 12 可见，经过 SEpHADESG-75 纯化的两种形式的多酚氧化酶 A Ⅰ和 A Ⅱ的最适 pH 值分别为 6.8 和 5.9. A Ⅰ在 pH6.2～6.4 之间的这一部分以及 A Ⅱ在 pH6.4～6.7 之间的那部分都是 A Ⅰ和 A Ⅱ的互相干扰所引起的。这也表明，SEPHADEXG-75 凝胶色谱虽然将 PPO 分离出来，但未能将它们的不同形式完全分离。

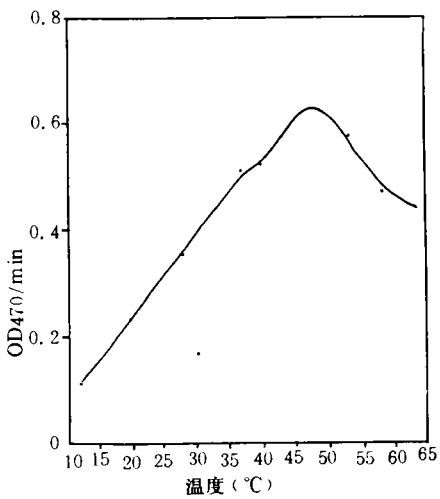



图 11 POD 的最适温度

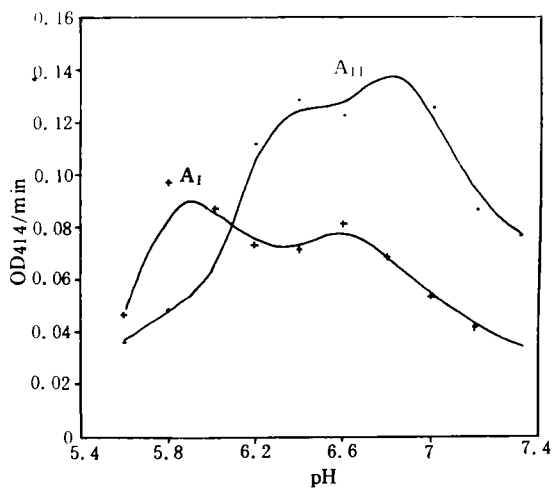



图 12 PPOA Ⅰ和 A Ⅱ活力与 pH 关系图

图 13 为聚丙烯酰胺凝胶电泳分离图，样品①②③④⑤分别为第 6 次分离的收集组分Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ及 PPOα，将它们经过透析及冷冻浓缩而得的浓缩样品。由图可见，电泳可把这两种形式的 PPO 分离得比较清楚。图 14 中可见 PPOα 和 PPOβ 在 pH6.6 时活力最高。同样由于存在着两种多酚氧化酶的形式，使它们在较宽的 pH 范围都有较高的活力。

POD 最适 pH 在 4.9 和 5.5 之间(图 15)，因此在加工时设法避开此范围，同时应远离 PPO 的最适 pH 范围 5.9～6.8. 总的来说，为了提高产品的质量，pH4.9～6.8 是加工中不可取的范围。

### 3.4 米氏(MICHAELIS)常数 $K_m$

借助于米氏方程 $V = V_{max}[s]/K_m + [s]$，测定不同底物浓度与反应速度的关系，得出的结果见图 16、17. 为了精确计算，设计了一次线性回归方程计算程序，由此程序计算出的回归方程在最好水平上($\alpha = 0.001$)都显著，因此得出 PPOAI、PPOAII、PPOα、PPOβ、PPOD 的米氏常数分别为：$K_{mI} = 21.84$mmol/L，$K_{mII} = 12.56$mmol/L，$K_{m\alpha} = 16.17$mmol/L，$K_{m\beta} = 14.30$mmol/L，$K_{mPOD} = 39.45$mmol/L. 这些结果与 GALAZZI 和 Agarlievi 等人所得到的结果比较接近。所得到的 PPOβ 和 PPOα 的动力学方程(米氏方程)如下：$V_\alpha = 0.7198[s]/$

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

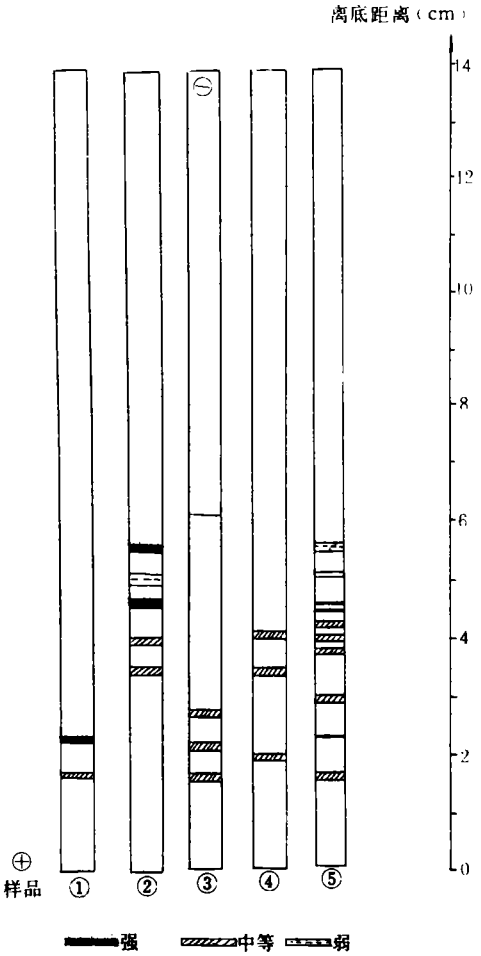



图 13 电泳图

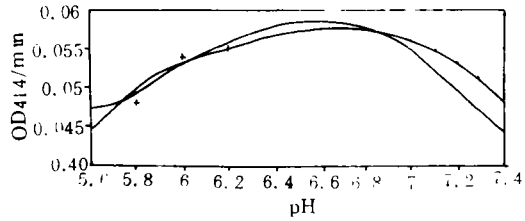



图 14 PPO 的最适 pH

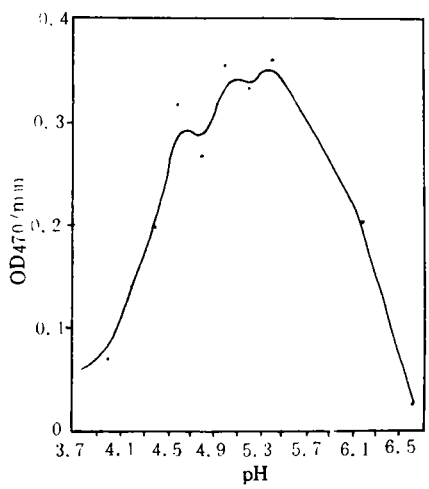
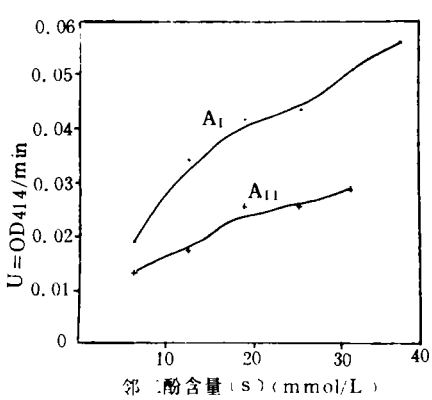



图 15 POD 的最适 pH



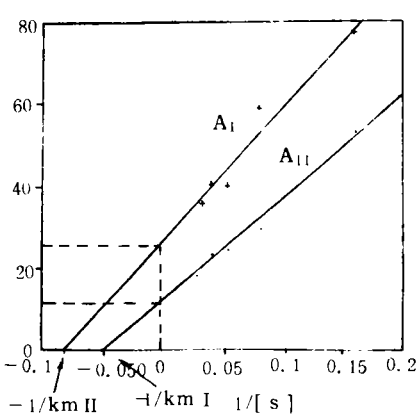




图 16 AⅠ和AⅡ米氏常数的测定

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(16.17+[s]) $V_\beta = 0.6347[s]/(14.30+[s])$. 通过米氏常数测定，解决了整个反应过程中反应底物浓度与反应速度的关系，当浓度、温度和 pH 恒定时，在底物浓度很低的范围内，反应的速度与底物浓度成正比，当底物浓度达一定限度，所有的酶全部与底物结合后，反应速度达最大值，此时再增加底物，也不能使反应速度增加。

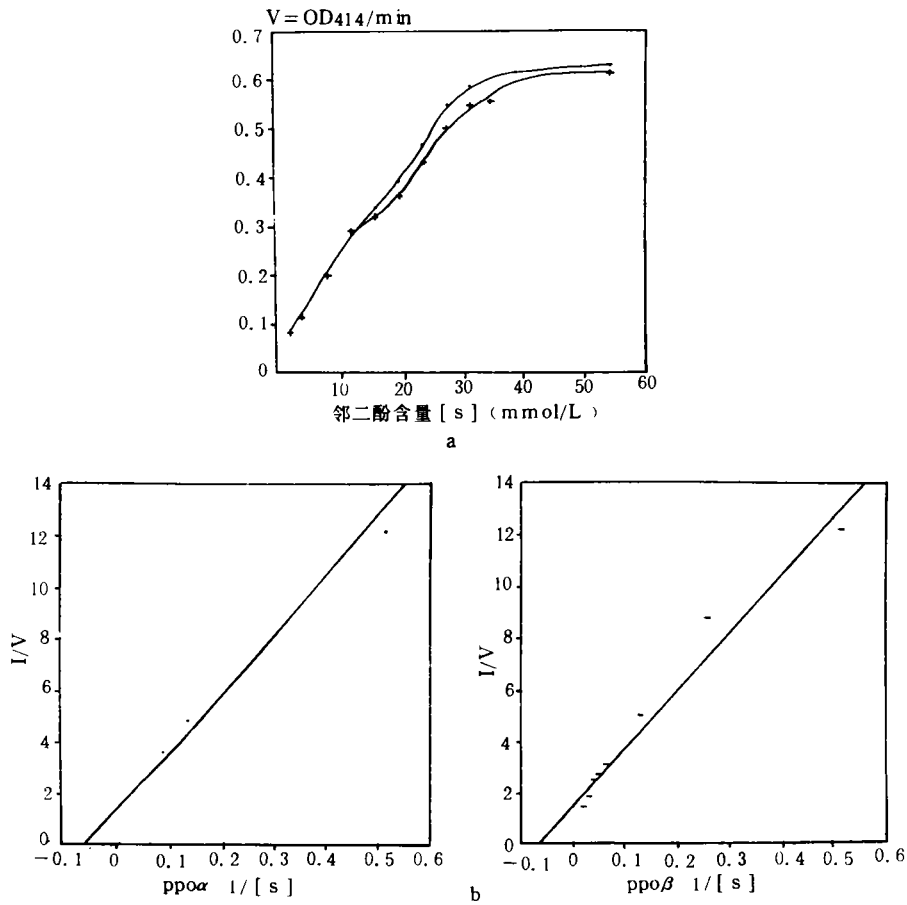



**图 17 底物浓度与反应速度之间的关系**

(a) [s]和 $V$ 关系 (b) 1/[s]和 $1/v$ 关系

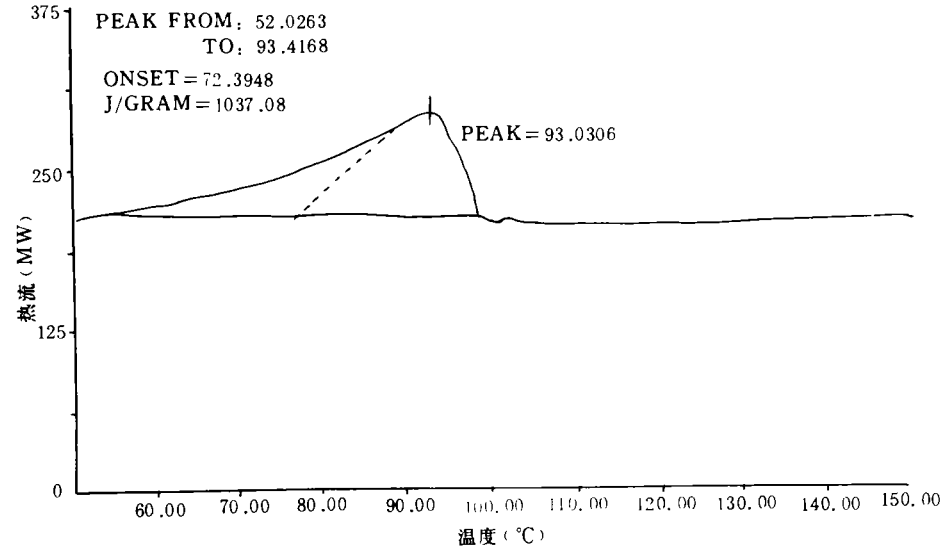
## 4 差热扫描分析(DSC)

DSC 图表明 PPOA Ⅰ和 PPOA Ⅱ的蛋白质变性温度分别在 93.03 C和 89.42 C，因此当热处理酶时，把温度控制在 93 C以上就基本能使酶失活。

## 5 结 论

1) 在酶的提取过程中采用 PVP 及 PEG 均有效，只是 PPOα 的活性较 PP(

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



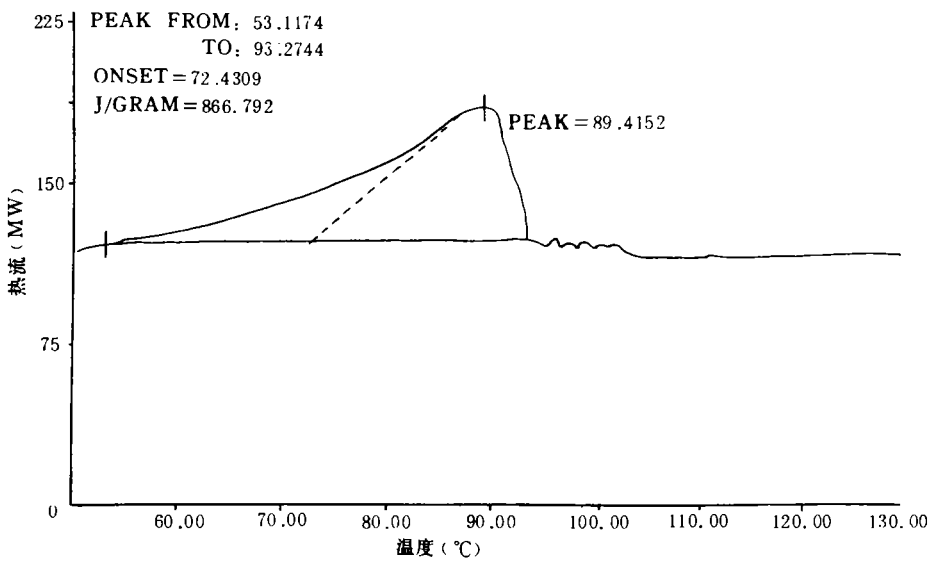




**图 18 差热扫描分析**

(a)PPOA Ⅰ 扫描速率 5℃/min 样品重量 18.6mg

(b)PPOA Ⅱ 扫描速率 5℃/min 样品重量 23.4mg

2) SEPHADEXG-75 凝胶色谱可用米氏分离香蕉中的多酚氧化酶,但分离效果不十分理想,电泳分离可清楚显现之。

3) 在广东芝麻香蕉中的多酚氧化酶存在着两种主要形式 PPOA Ⅰ 和 PPOA Ⅱ,它们的最适活性温度低于耐热性最强的过氧化物酶钝化时,温度控制在 93℃以上就够了。pH 值应尽量避开 4.9～6.8 的范围。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

**致 谢**

感谢 Dagadzi Yao David，Avedzi Aku Helene，项建琳，张旭华和安颖等的帮助和密切合作

**参 考 文 献**

1 Jayaraman m N，Uijayaragharan P K，Vaidyanathan C S. Studies on the purification of Banana Polyphenoloxidase. FoodChemistry，1987，24(3)：203～217

2 Palmer J K. BananaPolyphenoloxidase-PreparationandPreprieties. PlantPhysiol，1963，240：3938～43

3 Davis B J. DiskElectropnoresis，MethodandApplicationtoHumanSerumProteins. Annals N Y. Acad Sci，1984，124：404

4 Wright D J. ApplicationofDSCtotheStudyofFoodBehavior. Anal Proc Nov，1986，(23)：389～390

# Recherche on Guangdong Zhima Banana Browning(Ⅰ) ——Study on the Extraction，Purification and Characteristics of the PPO

Alex Koku M　Yang Fangqi　Gao Fuchen

(Dept. of Food Science and Eng.)

**Abstract** It was well know that browing in barana process was due to polypherol oxidase (PPO). In this paper the extraction. Characteristics and purifcation by sephadex G-75 of the PPO were stndied. The effect of PVP and PEG on PPO were compared during the extraction. Two type of PPO coenzymes were separated by the sephadex G-75 column and DSC of both shows that proteins were denaturated at respectioely 93.03℃ and 89.42℃，their optimun pH were respectioely pH 0.8 and 5.9. The largest absorbion of the prodnet of the reaction between PPO and catechol was at $\lambda$=414nm.

**Key-words** Banana；Polyphenol oxidase (PPO)；Browning

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net