

鲜切茭白酚类物质测定及 POD 特性研究

罗海波^{1,2}, 包永华³, 何雄¹, 宋慧波¹, 郁志芳^{2,*}

(1.浙江医药高等专科学校生物与食品系, 浙江宁波 315100;

2.南京农业大学食品科技学院, 江苏南京 210095;

3.浙江经贸职业技术学院应用工程系, 浙江杭州 310018)

摘要:采用紫外光谱扫描及高效液相色谱法对茭白酚提取物进行初步定性分析,同时研究了鲜切茭白的 POD 特性。结果表明,茭白中的主要酚类物质是咖啡酸和没食子酸,分别占茭白酚提取物总量的 25.57% 和 29.54%,两种酚均可作为鲜切茭白 POD 的底物,咖啡酸同时也是木质素合成的前体物质,表明茭白不仅具有很强的褐变潜力,而且具备了快速木质化的物质基础。鲜切茭白 POD 活力很高,其最适 pH 为 6.0, pH5.0~7.0 范围内较稳定;最适温度为 40.0℃, 60℃ 以上稳定性较差;H₂O₂ 浓度在 12.25mmol/L 以下时,POD 活力随 H₂O₂ 浓度增加直线上升,浓度进一步增加 POD 活力上升不大,超过 14.71mmol/L 对 POD 活力有抑制作用。鲜切茭白 POD 对焦性没食子酸、咖啡酸、愈创木酚、表儿茶酚、儿茶酚、没食子酸、酪氨酸、肉桂酸及 H₂O₂ 的 K_m 分别为 1.75、5、12、16、41.5、76.2、∞、∞、4.91mmol/L,且与愈创木酚结合时表现出最大酶活力。

关键词:鲜切茭白,酚,过氧化物酶,特性

Determination of phenol extracted and the characteristics of peroxidase from fresh-cut *Zizania latifolia*

LUO Hai-bo^{1,2}, BAO Yong-hua³, HE Xiong¹, SONG Hui-bo¹, YU Zhi-fang^{2,*}

(1.Department of Biology and Food, Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China;

2.College of Food Science & Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

3.Department of Applied Engineering, Zhejiang Economic and Trade Polytechnic, Hangzhou 310018, China)

Abstract: The phenols of *Zizania latifolia* were determined by combination of effect of acid and base, scanning spectrum and high performance liquid chromatography (HPLC), and the characteristics of POD in fresh-cut *Z. latifolia* were investigated. The results showed that the main phenols of fresh-cut *Z. latifolia* were gallic acid and caffeic acid, which accounted for 25.57% and 29.54%, respectively, of the total content of *Z. latifolia* phenol extracts. Both phenols could be used as substrate for the fresh-cut *Z. latifolia* POD, while caffeic acid also was the precursor substance of lignin synthesis, indicating that fresh-cut *Z. latifolia* not only had very strong browning potential, but also had the material base of rapid lignification. The POD activity in fresh-cut *Z. latifolia* was very high. POD had greatest activity at pH6.0 and temperature 40.0℃, and lost activity quickly when pH below 5.0 or temperature above 60℃. The POD activity increased fast when H₂O₂ was below 12.25 mmol/L, and increased a little afterwards, reached the maximum at the H₂O₂ level of 14.71 mmol/L, then decreased. The K_m for pyrogallol, caffeic acid, guaiacol, epicatechin, catechol, gallic acid, tyrosine, cinnamic acid and H₂O₂ were 1.75, 5, 12, 16, 41.5, 76.2, ∞, ∞ and 4.91mmol/L, respectively. The POD showed the highest activity when combined with guaiacol.

Key words: fresh-cut *Zizania latifolia*; phenol; peroxidase; characteristics

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)15-0127-06

茭白是我国特色水生蔬菜之一,常以切片或切丝的方式食用,极其适合鲜切菜生产。然而,茭白在鲜切加工和贮藏过程中极易产生褐变和木质化等品质劣变现象,商品价值快速下降。酚类物质作为组织褐变的底物及木质素合成的前体物质,其种类、含量和存在状态是影响褐变及木质化发生的重要因

素。过氧化物酶(Peroxidase, POD; EC1.11.1.7)广泛存在于植物组织中,其生理功能是在植物抗逆防御系统中、生长发育中、遗传育种及木质素合成等过程中发挥重要作用^[1]。POD 是一组催化以 H₂O₂ 为受氢体氧化酚类、胺类化合物、某些杂环化合物和一些无机离子等供氢体的氧化还原酶类,因能催化二元酚氧化生成褐色的醌类物质而被认为与果蔬组织褐变密切相关,特别在组织受机械损伤后更迅速^[2-3]。研究表明,POD 在 H₂O₂ 存在条件下能迅速氧化多酚类物质,可与 PPO 协同作用引起鲜切果蔬产品发生褐变^[4-5]。此外,POD 是在木质素合成最后一步起关

收稿日期:2011-12-26 * 通讯联系人

作者简介:罗海波(1979-),男,博士,讲师,研究方向:果蔬采后生物学与处理技术。

表1 酚类标样与茭白酚提取物紫外吸收峰值

Table 1 Ultraviolet absorption peak value of standard sample and *Z.latifolia* phenols

样品	茭白 提取物	L-苯 丙氨酸	愈创 木酚	儿茶酚	间苯 二酚	表儿 茶酚	没食 子酸	焦性没 食子酸	咖啡酸	绿原酸	肉桂酸	酪氨酸	羟酪胺
紫外吸收峰值 (nm)	218、 260	209	229、 277	226、 280	224、 275	223、 278	222、 271	226、 268	217、288、 320	219、247、 303、330	214、 270	211、245、 296	224、 282

键作用的酶,它通过催化各种木质醇单体发生聚合反应,参与并调节木质素在细胞壁的聚合过程,因而与果蔬组织木质化相关^[6]。目前有关茭白 POD 的研究报道极少,其特性及与鲜切加工中组织褐变和木质化的关系尚不明确。本实验主要通过对茭白中酚类物质进行定性分析,同时研究鲜切茭白 POD 的特性,以期阐明鲜切茭白褐变及木质化发生的生化基础,为控制鲜切茭白品质劣变提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

茭白 9月上旬成熟江苏地产露天茭白,新鲜茭白去除茭壳、嫩尖和底部纤维化粗老部分,按4~5mm厚度切片,冰水清洗自然晾干,按每样品重300g左右用塑料保鲜袋(400×280×0.02mm)挽口包装,取1袋样品用于酚提取,剩下样品置(1±0.5)℃下贮藏15d后进行POD提取及酶特性研究;磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、硼酸钠、硼酸、醋酸钠、冰醋酸、柠檬酸、柠檬酸钠、盐酸羟胺、H₂O₂等均为分析纯;愈创木酚(SIGMA, HPLC级);咖啡酸(ACROS, HPLC级);焦性没食子酸、儿茶酚、表儿茶酚、酪氨酸(FLUKA, HPLC级);没食子酸、酪氨酸、肉桂酸(MERCK, HPLC级)。

DJ300精密电子天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司;GL-20G-II高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂;Orion86802 台面式 pH/ISE 测试仪 上海纳锆仪器有限公司;HH-6 数显恒温水浴锅 常州国华电器有限公司;XW-80A 微型旋涡混合仪 上海沪西分析仪器厂有限公司;Agilent 1120 高效液相色谱仪 安捷伦科技有限公司;WFJ UV-2802 PC 紫外-可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器公司等。

1.2 实验方法

1.2.1 茭白酚类提取液的制备 随机称取茭白样品20.0g于匀浆机中,加入40.0mL甲醇匀浆30s,-20℃冰箱中过夜,10000×g离心25min,倒出上清液备用。

1.2.2 酚类物质的紫外光谱扫描 取3.0mL茭白酚提取液置于石英比色皿中,在190~400nm的紫外区域扫描,基线扫描以甲醇作标准液,20mmol/L的标样用甲醇配制,扫描操作样品。

1.2.3 酚类物质的高效液相色谱分析 参照文献[7]所述方法稍有改动。吸取2.0mL多酚提取液,以0.45μm有机膜过滤备用。色谱条件为:色谱柱 Agilent ZORBAX SB-C₁₈(5μm,4.6×250mm);流动相用甲醇、水梯度洗脱,间隔时间30min,甲醇体积由15%上升至35%;柱温35℃;流速1.0mL/min,检测波长为280nm。

1.2.4 鲜切茭白 POD 粗酶液的提取及活力测定 随

机称取鲜切茭白样品20.0g于研钵中,按照1:3(W/V)的比例量取pH8.7、50mmol/L硼酸缓冲液60mL,冰浴研磨匀浆,于10000×g、4℃离心30min,取上清液冷藏备用。吸取pH5.4、200mmol/L的醋酸缓冲液2.0mL,加入20mmol/L愈创木酚溶液1.0mL,再加入酶液0.02mL,最后加入0.75% H₂O₂ 0.1mL,每隔30s记录吸光值A₄₆₀的变化,连续记录3~5min。以每分钟内吸光度A₄₆₀变化0.001所需的酶量为1个酶活力单位(U),结果表示为U/mg蛋白质。

1.2.5 最适 pH 及 pH 稳定性 分别配制 pH2.2~3.0、4.0~5.4、6.0~8.0、9.0,浓度为200mmol/L的柠檬酸、醋酸、磷酸、硼酸缓冲液,以愈创木酚为底物连续测定 POD 活力;分别取 POD 粗酶液2mL,用 pH 为2.2、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0和9.0的上述缓冲液定容至10mL,4℃冰箱放置24h,以愈创木酚为底物连续测定 POD 活力。

1.2.6 最适温度及热稳定性 取 pH 为5.4的反应液3.0mL在4、10、20、30、40、50、60、70、80℃等不同温度下保温10min,立即加入0.02mL粗酶液后测定 POD 活力;取粗酶液2.0mL分别置60、70、80、90、100℃的温度下保温0~5min,常温下测定 POD 残余酶活力。

1.2.7 H₂O₂ 浓度对鲜切茭白 POD 活力的影响 以0.0%、0.25%、0.50%、0.75%、1.0%、1.25%、1.5%、1.75%、2.0%浓度的H₂O₂溶液为反应底物,常温下测定鲜切茭白 POD 对H₂O₂的反应速度。

1.2.8 底物浓度对鲜切茭白 POD 活力的影响 分别配制不同浓度的愈创木酚、儿茶酚、表儿茶酚、没食子酸、焦性没食子酸、咖啡酸、酪氨酸和肉桂酸为底物,测定鲜切茭白 POD 的反应速度,计算不同酚类底物的K_m值。

1.3 数据处理

实验每个处理均重复三次,分别求其平均值和标准差,并使用统计软件 SPSS 18.0 及 Excel 进行显著性和相关性分析。

2 结果与分析

2.1 茭白中酚类化合物种类分析

为确定茭白中的主要酚类物质,实验将多种酚类标准样品进行紫外扫描和高效液相色谱分析,并与茭白酚提取物的紫外吸收光谱和高效液相色谱图进行对照,结果见表1和图1。

由表1可知,茭白酚提取物在218nm有一主吸收峰,且在260nm处也有一次吸收峰出现。从主吸收峰波长来看,咖啡酸在217nm处有主吸收峰,与茭白酚提取物十分接近,进一步证实了茭白中有咖啡酸的存在;从谱形来看,酚标样中愈创木酚、儿茶酚、表儿茶酚、没食子酸及焦性没食子酸也与茭白酚提

表2 酚类物质标准样品的保留时间
Table 2 The resort-time values of phenols standard samples

酚类样品	愈创木酚	儿茶酚	表儿茶酚	没食子酸	焦性 没食子酸	咖啡酸	绿原酸	肉桂酸	香豆酸	L-酪氨酸
保留时间 (min)	18.10 ± 0.03	6.436 ± 0.05	2.645 ± 0.02	3.220 ± 0.07	2.777 ± 0.01	2.885 ± 0.06	2.188 ± 0.02	5.751 ± 0.03	2.103 ± 0.01	2.556 ± 0.04

取物相似,推测茭白中的酚类物质可能还含有其中一种或是几种。

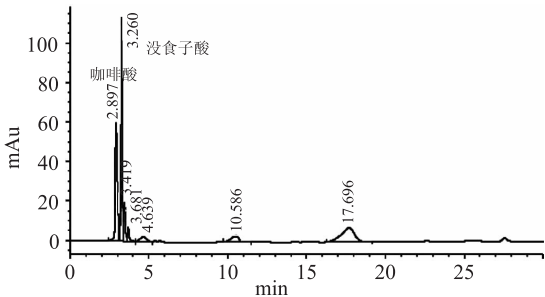


图1 鲜切茭白酚类提取物的 HPLC 图
Fig.1 HPLC spectrum of phenolic substance extracted from fresh-cut *Z. latifolia*

图1显示,茭白酚提取物的HPLC分析图谱共出现8个峰,其保留时间从小到大分别为2.897、3.260、3.419、3.681、4.639、10.586、17.686min,其中保留时间为2.897及3.260min出现的峰占总峰面积比较大,分别为25.57%和29.54%。相同条件下测定不同酚标准样品的保留时间,结果见表2。通过比较,酚标样中咖啡酸和没食子酸的保留时间(2.885、3.220min)与上面两种物质的保留时间非常接近,且没有发现其它酚标样与茭白酚提取物保留时间相对应的组合。

综合表2和图1的分析结果,茭白中的主要酚类物质是咖啡酸和没食子酸,分别占茭白酚类物质提取总量的25.57%和29.54%,同时还可能存在少量的其它酚类物质,如要进一步明确茭白中是否有其它酚的存在或酚的组成需借助质谱仪、核磁共振仪等更精确的仪器设备。

2.2 鲜切茭白 POD 最适 pH 和 pH 稳定性

pH 能改变蛋白酶氨基酸链或反应底物的电离状态,是影响蛋白酶活性表达的决定性因素之一。Ajila 等^[10]报导指出,过低和过高的 pH 会加速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。图2(a)显示,pH6.0时,鲜切茭白 POD 表现出最大的酶活力,高于或低于6.0时活力均迅速下降,且没有次适宜的 pH,周涛等^[8]在研究无锡广益茭 POD 特性时也得出相似的结论。图2(b)也显示,pH5.0~7.0 范围内鲜切茭白 POD 稳定性相对较高,超出此范围稳定性急剧下降,表明 pH 对鲜切茭白 POD 活性表达及其稳定性有重要影响。

已有研究表明,不同水生蔬菜的 POD 最适 pH 有一定差异,如菱角肉和菱角皮 POD 最适 pH 分别为5.0、6.0^[9]、芋艿5.5^[10]、慈姑5.0^[11]、莲藕5.0^[12],本

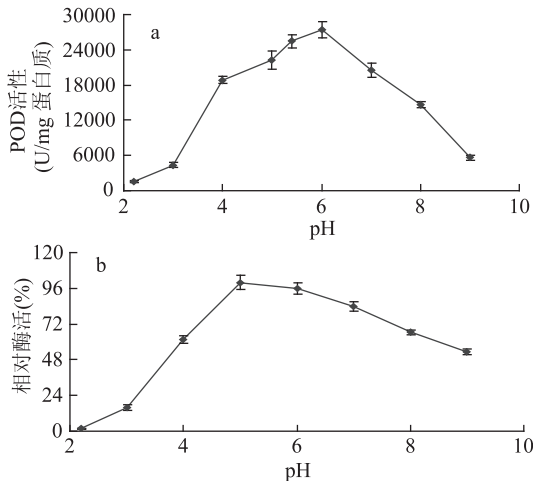


图2 鲜切茭白 POD 最适 pH 和 pH 稳定性
Fig.2 The optimum pH(a) and pH stability(b) of the fresh-cut *Z. latifolia* POD
注:a.最适 pH;b.pH 稳定性。

研究获得的鲜切茭白 POD 最适 pH 为6.0,与上述水生蔬菜 POD 最适 pH 不同,但符合植物体内酶最适 pH 多在4.5~6.5 范围内的理论。

需要特别重视的是鲜切茭白在整个贮藏过程中 pH 维持在5.0~6.5 之间,与鲜切茭白 POD 的最适作用 pH 及稳定的 pH 范围十分接近,且鲜切茭白 POD 活力很强,贮藏15d 时在最适 pH 及室温条件下其活力可达到145395U/mg 蛋白质,高于大多数已测定过的其它蔬菜,表明鲜切茭白组织具有很强的褐变和木质化潜力。

2.3 鲜切茭白 POD 最适温度和热稳定性

温度对酶活力的影响有两方面,一方面是温度升高,酶的活性也增加;另一方面,随着温度的升高,酶也逐渐变性,酶活力下降^[13]。图3(a)显示,温度对鲜切茭白 POD 活力有显著影响,其最适温度为40℃,温度低于40℃时,鲜切茭白 POD 活力呈直线上升($r = 0.9722$),相关性良好,高于40℃酶活力迅速下降,至90℃时酶活力仅为40℃时的13.2%,且远低于4℃条件下测定的 POD 活力,说明高温有利于抑制鲜切茭白 POD 活力,延缓褐变的发生。

比较菱角皮和莲藕 POD 的最适温度分别为40℃和35℃,而芋艿和慈姑 POD 的最适温度分别为60℃和50℃,鲜切茭白 POD 作用的最适温度与芋艿和慈姑的 POD 相差较大,而与菱角皮和莲藕的 POD 比较接近,这符合不同物种 POD 最适温度有一定差异的理论。

不同温度和处理时间对鲜切茭白 POD 活力的影响见图3(b)。鲜切茭白 POD 活力在实验温度下保温1min 均显著下降,60℃下保温1min 酶活力下降了

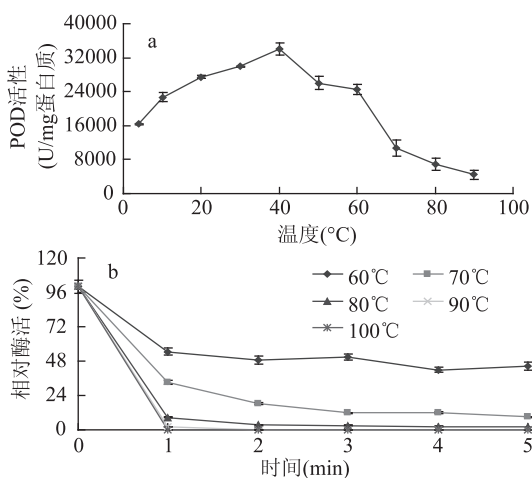


图3 鲜切茭白 POD 最适温度和热稳定性

Fig.3 The optimum temperature (a) and thermal stability (b) of the fresh-cut *Z. latifolia* POD

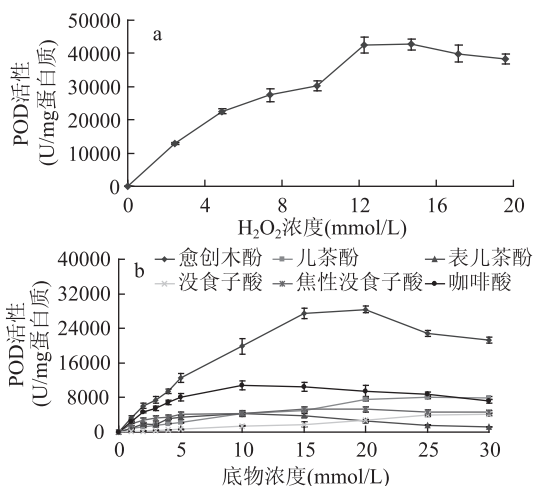
注:a.最适温度;b.热稳定性。

45.6%,以后随保温时间的延长而变化不大;在70℃处理时,1min 酶活力下降了70%;80℃处理时,1min 酶活力下降了91.3%,已基本失活;90℃处理2min 酶几乎完全失活。由此可见,鲜切茭白的 POD 热稳定性较差,随处理温度的升高、时间的延长,酶蛋白变性速度加快,活力降低。

2.4 H₂O₂ 和不同酚类底物对鲜切茭白 POD 活力的影响

图4(a)显示,H₂O₂ 浓度在12.25mmol/L 以下,酶活力随 H₂O₂ 浓度直线增加($r = 0.9786$);H₂O₂ 浓度从12.25mmol/L 增加到14.71mmol/L 时,POD 活力继续上升,但增加量较小;H₂O₂ 浓度超过14.71mmol/L 时,酶活力反而下降,根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法求出鲜切茭白 POD 对 H₂O₂ 的 K_m 值为4.91mmol/L。已有研究表明 POD 的底物主要是 H₂O₂,但过高浓度 H₂O₂ 可抑制 POD 活力,本研究也发现 H₂O₂ 浓度高于14.71mmol/L 时对茭白 POD 活力有抑制作用。H₂O₂ 对 POD 酶活抑制的程度取决于酶和 H₂O₂ 浓度两个方面,用过氧化氢酶消除过多的 H₂O₂ 又能使 POD 活力恢复^[13]。

不同酚类物质底物和浓度对鲜切茭白 POD 活力的影响比较复杂,实验结果见图4(b)。以愈创木酚为底物时鲜切茭白 POD 活力比其它酚类底物大,浓度为20mmol/L 时 POD 活力达最大值,当超过20mmol/L 时,POD 活力受到抑制而有所下降;以咖啡酸、焦性没食子酸和表儿茶酚为反应底物时,鲜切茭白 POD 活力变化趋势与愈创木酚相似,即随底物浓度的增大,POD 活力呈现先上升后下降的趋势,且底物浓度分别为10、5、5mmol/L 时达最大值;在实验浓度下,随着儿茶酚和没食子酸底物浓度的增加,酶

图4 H₂O₂ 和不同酚类底物浓度

对鲜切茭白 POD 活力的影响

Fig.4 Effect of H₂O₂ (a) and various phenolic substrates (b)

concentration on the POD activity of fresh-cut *Z. latifolia*

注:a.H₂O₂;b.不同酚类底物。

活力也随之增加,没有发现底物抑制现象;同样以酪氨酸和肉桂酸作为底物测定鲜切茭白 POD 的活力,结果显示鲜切茭白 POD 不能催化酪氨酸和肉桂酸发生氧化反应。以上结果表明鲜切茭白 POD 活力不仅受酚类底物种类的影响,还与底物的浓度有关,鲜切茭白贮藏过程中 POD 活力的增加可能是茭白组织中酚类物质及其含量随贮藏时间复杂改变而表现出的结果。

图4(b)还显示,鲜切茭白 POD 对不同酚类底物的亲和性存在极大差别,其大小可以通过酶的特征常数 K_m 值来体现, K_m 值反映了酶促反应发生的难易程度, K_m 值越小,酶与底物的亲和性越大^[14]。根据米氏方程,采用双倒数作图法,分别求出鲜切茭白 POD 与不同酚类物质的 K_m 值,结果见表3。

由表3可知,鲜切茭白 POD 对酪氨酸、肉桂酸的 K_m 值为无穷大,对没食子酸和儿茶酚的 K_m 值较大,对愈创木酚、表儿茶酚和咖啡酸的 K_m 较小,对焦性没食子酸的 K_m 值最小,表明其和焦性没食子酸的亲和性最强,与没食子酸、儿茶酚的亲和性很弱,而基本上不能催化酪氨酸、肉桂酸发生反应。鲜切茭白 POD 与不同底物的亲和力大小顺序为:焦性没食子酸>咖啡酸>愈创木酚>表儿茶酚>儿茶酚>没食子酸>酪氨酸、肉桂酸。

3 讨论

酚类物质是植物体内次生代谢形成的一系列物质,其生理功能主要是调节植物内源激素和酶的活性,影响植物新陈代谢以及抵御真菌病害等。果蔬中酚类物质主要分布在细胞中的液泡中(约占

表3 鲜切茭白 POD 对不同酚类底物的 K_m 值Table 3 Michael's constant of POD from fresh-cut *Z. latifolia* with various phenolic substrates

底物	愈创木酚	儿茶酚	表儿茶酚	没食子酸	焦性没食子酸	咖啡酸	酪氨酸	肉桂酸
K_m (mmol/L)	12	41.5	16	76.2	1.75	5	∞	∞

97%) , 正常情况下由于膜系统的存在使酚类物质与引起褐变的酶类分隔开, 酚类物质不易发生氧化而使组织褐变。一旦膜系统被破坏, 酚类物质在 PPO、POD 等酶的催化作用下快速氧化, 导致果蔬组织褐变^[15]。研究表明, 酚类物质代谢直接影响到果蔬的外观、鲜食和贮运品质^[16]。木质素、酚类色素合成, 使细胞发育, 贮藏期间组织褐变等都与之密切相关^[17]。

酚类物质虽然在果蔬组织中广泛存在, 然而不同果蔬酚类物质种类差异较大。苹果、梨、山药、甘薯及枸杞中主要酚类物质为绿原酸^[18-21], 荔枝果皮中主要为(-)-表儿茶素^[22], 香蕉果皮中主要为多巴胺^[23], 莲藕中主要为儿茶酚^[12], 栗阳白芹中主要为儿茶酚、绿原酸和酪氨酸^[24]。本实验中, 茭白中主要酚类物质为咖啡酸和没食子酸。

果蔬组织中酚类物质的存在是其酶促褐变发生的根本原因。为进一步明确以上酚类物质与茭白褐变的关系, 研究了以不同浓度咖啡酸和没食子酸为底物时鲜切茭白 POD 活力的大小及与底物亲和性差异。结果表明, 当以咖啡酸和没食子酸为底物时, 鲜切茭白 POD 的 K_m 值分别为 5mmol/L 和 76.2mmol/L, 由此推测咖啡酸是导致鲜切茭白褐变的主要酚类物质。此外, 有报道指出咖啡酸是木质素合成的前体物质, 可以直接在相关木质素合成酶的催化作用下转化为木质素^[25]。本实验研究发现咖啡酸在茭白酚提取物中的比例高达 25.57%, 这可能与鲜切茭白贮藏过程中快速木质化有关。

不同植物材料来源的 POD 其最适 pH 大多在 4.5~6.5 之间^[26], 红椒和香菇 POD 最适 pH 为 4.5^[2,27], 红甜菜根为 5.0^[28], 甜土豆为 5.5^[29], 芦荟为 6.0^[30]。本实验中, 鲜切茭白 POD 最适 pH 为 6.0, 与上面结论相符。然而, 不同来源的 POD 对 pH 稳定性差异较大。睡茄^[31] POD 在 pH3.0~9.0 范围内稳定; 荔枝果皮^[32] POD 在 pH4.0~8.0 范围内稳定, 低于 pH3.0 不能检测到酶活; 棕榈树叶^[26] POD 在 pH5.0~10.0 范围内稳定; 掌叶牵牛^[33] POD 在 pH5.0~11.0 范围内稳定。本实验中, 鲜切茭白 POD 在 pH5.0~7.0 范围内稳定, 在 pH2.2 以下几乎完全失活。

鲜切茭白 POD 最适温度为 40℃, 与向日葵根^[34] POD 最适温度相同 (40℃), 而与香草豆^[35] POD (16℃)、橄榄^[1] POD (34.7℃) 以及红甜菜根^[28] POD (50℃) 的最适温度都有差异。已有研究表明, POD 是果蔬中最耐热的酶类。红甜菜根^[28] POD 在 70℃ 下处理 20min 酶活力仍保存 70%; 棕榈树叶片^[26] POD 在 80℃ 中保温 60min 保留绝大部分酶活, 具有较好的热稳定性; 大豆^[36] POD 热稳定性相当高, 75℃ 处理 60min 后残余酶活为 71%, 甚至 90℃ 下处理 60min 也未完全失活。本实验中, 鲜切茭白 POD 热稳定性较差, 处理温度大于 60℃ 时酶迅速失活, 这与香草豆^[35] POD 及橄榄^[1] POD 的热不稳定性相似。

H_2O_2 和酚类物质是果蔬 POD 发挥催化氧化作用导致酶促褐变和木质化的重要底物, 不同来源的

POD 对 H_2O_2 的亲合力不一样。Deepa^[26] 发现棕榈树叶 POD 对 H_2O_2 的 K_m 为 1.3mmol/L; 其它报道中, 红甜菜根^[28] 和橄榄^[1] POD 对 H_2O_2 的 K_m 分别为 0.113、98.61mmol/L; 枇杷^[37] POD 对 H_2O_2 的 K_m 为 12.04mmol/L。本实验中, 鲜切茭白 POD 对 H_2O_2 的 K_m 为 4.91mmol/L。

正常情况下, 植物组织细胞中的 H_2O_2 含量很低, 因此很难将果蔬酶促褐变直接归功于 POD 的催化氧化作用^[15]。然而本实验中, 2.45 μ mol/mL 的 H_2O_2 即可使鲜切茭白 POD 催化愈创木酚发生强烈的褐变反应, POD 活力高达 12842U/mg 蛋白质。同时实验测得鲜切茭白冷藏过程中 H_2O_2 含量最高可达 11.2 μ mol/g FW, 完全满足鲜切茭白 POD 发挥催化作用对 H_2O_2 含量的要求, 表明鲜切茭白 POD 与其组织褐变有密切联系。

4 结论

茭白中的主要酚类物质是咖啡酸和没食子酸, 分别占茭白酚类物质提取总量的 25.57% 和 29.54%。两种酚均可作为鲜切茭白 POD 的底物, 咖啡酸同时也是木质素合成的前体物质, 表明鲜切茭白不仅具有很强的褐变潜力, 而且具备快速木质化的物质基础。

鲜切茭白 POD 的活力极高, 其最适 pH 为 6.0, pH5.0~7.0 范围内较稳定; 最适温度为 40℃, 60℃ 以上稳定性较差; H_2O_2 浓度在 12.25mmol/L 以下时, POD 活力随 H_2O_2 浓度增加直线上升 ($r = 0.9786$), 浓度进一步增加 POD 活力上升不大, 超过 14.71mmol/L 对 POD 活力有抑制作用。

鲜切茭白 POD 对焦性没食子酸、咖啡酸、愈创木酚、表儿茶酚、儿茶酚、没食子酸、酪氨酸、肉桂酸及 H_2O_2 的 K_m 分别为 1.75、5、12、16、41.5、76.2、 ∞ 、 ∞ 、4.91mmol/L, 推测 POD 可能是导致鲜切茭白褐变的关键酶。

参考文献

- [1] Saraiva J A, Nunes Cláudia S, Coimbra M A. Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase - Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase [J]. Food Chemistry, 2007, 101(4): 1571-1579.
- [2] Serrano-Martínez A, Fortea M I, del Amor F M, et al. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum* L.) peroxidase [J]. Food Chemistry, 2008, 107(1): 193-199.
- [3] Hadzi - Taskovic S V, Vuletic M. The characterization of peroxidases in mitochondria of maize roots [J]. Plant Science, 2003, 164(6): 999-1007.
- [4] 程双, 胡文忠, 马跃, 等. 鲜切果蔬酶促褐变发生机理的研究 [J]. 食品工业科技, 2010, 31(1): 74-80.
- [5] 魏云潇, 叶兴乾. 果蔬采后成熟衰老酶与保护酶类系统的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2009, 30(12): 427-431.
- [6] Díaz J, Bernal A, Pomar F, et al. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to

- lignification[J]. Plant Science, 2001, 161(1): 179-188.
- [7] Zhao L, Lee H K. Determination of phenols in water using liquid phase microextraction with back extraction combined with high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2001, 931(1-2): 95-105.
- [8] 周涛, 许时婴, 王璋, 等. 茭白中过氧化物酶的部分纯化及其性质的初步研究[J]. 食品工业科技, 2005, 26(7): 81-83.
- [9] 李妍. 菱角采后品质、生理生化和酶促褐变特性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [10] 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.
- [11] 杜传来. 鲜切慈姑贮藏中褐变的相关生理生化变化及酶促褐变机理的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [12] 阙瑞琦, 张丽丽, 郭小路, 等. 莲藕过氧化物酶的分离纯化及性质研究[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2007, 19(12): 63-67.
- [13] 郁志芳, 陆兆新, 李妍, 等. 鲜切芦蒿过氧化物酶特性的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 29-33.
- [14] 王臻, 廖祥儒, 张建国, 等. 女贞果实过氧化物酶的纯化及热稳定性研究[J]. 河北农业大学学报, 2007, 30(5): 23-28.
- [15] Toivonen P M A, Brummell D A. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables[J]. Postharvest Biology and Technology, 2008, 48(1): 1-14.
- [16] Boudet A - M. Evolution and current status of research in phenolic compounds[J]. Phytochemistry, 2007, 68(22-24): 2722-2735.
- [17] Saltveit M E, Choi Y - J. Aromatic - and di - carboxylates inhibit wound-induced phenolic accumulation in excised lettuce (*Lactuca sativa* L.) leaf tissue [J]. Postharvest Biology and Technology, 2007, 46(3): 222-229.
- [18] 宋烨, 翟衡, 刘金豹, 等. 苹果加工品种果实中的酚类物质与褐变研究[J]. 中国农业科学, 2007, 40(11): 2563-2568.
- [19] 吴耕西, 周宏伟, 汪建民. 鸭梨酶促褐变的生化机制及底物鉴定[J]. 园艺学报, 1992, 19(3): 198-202.
- [20] 郁志芳, 夏志华, 陆兆新. 鲜切甘薯酶促褐变机理的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(5): 54-59.
- [21] 侯田莹. 贮藏温度和包装方式以及低氧气调对采后枸杞头品质及生理特性影响的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- [22] Sun J, Jiang Y, Wei X, et al. Identification of (-) - epicatechin as the direct substrate for polyphenol oxidase isolated from litchi pericarp [J]. Food Research International, 2006, 39(8): 864-870.
- [23] 蒋跃明, 陈绵达, 林植芳, 等. 香蕉低温酶促褐变[J]. 植物生理学报, 1991, 17(2): 157-163.
- [24] 李延清. 溧阳白芹贮藏期间品质和生理变化及褐变特性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
- [25] Humphreys J M, Chapple C. Rewriting the lignin roadmap [J]. Plant Biology, 2002, 5(3): 224-229.
- [26] Deepa S S, Arumughan C. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf [J]. Phytochemistry, 2002, 61: 503-511.
- [27] Boer C G, Obici L, de Souza C G M, et al. Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinula edodes* [J]. Process Biochemistry, 2006, 41(5): 1203-1207.
- [28] Rudrappa T, Lakshmanan V, Kaunain R, et al. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.) [J]. Food Chemistry, 2007, 105(3): 1312-1320.
- [29] Rempel A, Albers M, Naseri J I, et al. Purification, cloning and characterization of a novel peroxidase isozyme from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics, 2007, 1774(11): 1422-1430.
- [30] Esteban - Carrasco A, Zapata J M, López - Serrano M, et al. Purification of two peroxidase isoenzymes of *Aloe barbadensis* which oxidize p - coumaric acid [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2002, 40(2): 127-132.
- [31] Johri S, Jamwal U, Rasool S, et al. Purification and characterization of peroxidases from *Withania somnifera* (AGB 002) and their ability to oxidize IAA [J]. Plant Science, 2005, 169(6): 1014-1021.
- [32] 庞学群, 段学武, 张昭其, 等. 荔枝果皮过氧化物酶的纯化及部分酶学性质研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2004, 12(5): 449-454.
- [33] Srinivas N D, Rashmi K R, Raghavarao K S M S. Extraction and purification of a plant peroxidase by aqueous two - phase extraction coupled with gel filtration [J]. Process Biochemistry, 1999, 35(1-2): 43-48.
- [34] Jouili H, Bouazizi H, Rossignol M, et al. Partial purification and characterization of a copper - induced anionic peroxidase of sunflower roots [J]. Plant Physiology Biochemistry, 2008, 6(8-9): 760-767.
- [35] Márquez O, Waliszewski K N, Oliart R M, et al. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean [J]. LWT - Food Science and Technology, 2008, 41(8): 1372-1379.
- [36] Wright H, Nicell J A. Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols [J]. Bioresource Technology, 1999, 70(1): 69-79.
- [37] 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.