

初始pH值对果糖-赖氨酸模型美拉德产物抑制香蕉酶促褐变相关性质的影响

郑杰琼^{1,2}, 李芬芳², 袁德保^{2,*}, 王必尊², 金志强², 丁武¹, 寇丽萍¹, 何应对²

(1.西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100; 2.中国热带农业科学院海口实验站, 海南 海口 570102)

摘要: 研究初始pH值对果糖-赖氨酸模型体系美拉德反应产物(MRPs)抑制香蕉酶促褐变相关性质的影响。通过调节初始pH值(2~11), 于110℃条件下反应1h得到MRPs, 对产物DPPH自由基清除能力、还原力、螯合Cu²⁺能力、抑制多酚氧化酶酶活能力进行考察。结果表明: 碱性条件促使美拉德反应加剧, 酸性条件MRPs能更有效抑制香蕉多酚氧化酶活力及清除DPPH自由基; pH9时的MRPs具有最好的还原力, 而pH2时的MRPs具有最差的还原力; pH2~4和pH11条件下的MRPs具有较好的螯合Cu²⁺能力。总之, pH值对MRPs抑制香蕉酶促褐变有极大影响, 不同初始pH值条件下的MRPs抑制香蕉酶促褐变的相关性质呈现较大差别, 同时可以推测出具有抑制香蕉多酚氧化酶活力的组分可能是美拉德反应的初期产物。

关键词: 美拉德反应产物(MRPs); 初始pH值; 香蕉; 多酚氧化酶; 酶促褐变

Effect of Initial pH in a Fructose-Lysine Model System on the Properties of Maillard Reaction Products Related to the Inhibitory Effect on Banana Enzymatic Browning

ZHENG Jie-qiong^{1,2}, LI Fen-fang², YUAN De-bao^{2,*}, WANG Bi-zun², JIN Zhi-qiang², DING Wu¹, KOU Li-ping¹, HE Ying-dui²
(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. Haikou Experimental Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 570102, China)

Abstract: This study focused on the effect of initial pH in a fructose-lysine model system on the properties of Maillard reaction products (MRPs) related to the inhibitory effect on banana enzymatic browning. MRPs were prepared through the reaction of 0.5 mol/L fructose and 0.5 mol/L lysine at a pH ranging from 2 to 11, 110 °C for 1 h. Then, their antioxidant activity (including DPPH free radical scavenging ability and reducing power), chelating copper activity and the inhibitory effect on polyphenoloxidase banana were evaluated. The results showed that the Maillard reaction between fructose and lysine could be accelerated at alkaline conditions, however, MRPs prepared from acidic conditions (especially at pH 2 or 3), were more effective in inhibiting banana polyphenoloxidase and scavenging DPPH free radicals. The reducing power of MRPs prepared at pH 9 was highest, while those prepared at pH 2 had the lowest reducing power. Chelating copper activity of MRPs prepared at pH 2—4 or pH 11 was predominant. Generally, initial pH showed a significant effect on the efficacy of MRPs for inhibiting banana enzymatic browning, and the properties related to the inhibitory effect of MRPs prepared at different initial pHs were much different from each other, such as DPPH radical scavenging ability, reducing power, chelating copper activity and the inhibitory effect on banana polyphenoloxidase. It could also be deduced that early stage MRPs may play key roles in inhibiting banana polyphenoloxidase.

Key words: Maillard reaction products (MRPs); initial pH; banana; polyphenoloxidase; enzymatic browning

中图分类号: TS255.36

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0024-04

据FAO统计, 2010年我国香蕉产量达到984.9万t, 占世界的14.16%。酶促褐变是香蕉贮藏保鲜及深加工中亟待解决的难题^[1]。酶促褐变是指香蕉皮或者香蕉果肉中的

酚类物质在多酚氧化酶(PPO)的作用下, 被氧化变成醌并形成黑色素的现象。抑制香蕉的酶促褐变对维系其采后贮藏中的商品价值、经济价值及改善其加工性能具有重

收稿日期: 2012-02-03

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31101328); 海南省自然科学基金项目(311063); 中国热带农业科学院院本级中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1630052012005); 农业部现代农业产业技术体系建设专项(CARS-32); 海南省热带园艺产品采后生理与保鲜重点实验室开放基金项目(klhptthp201004)

作者简介: 郑杰琼(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为农产品贮藏与加工。E-mail: 562447970@qq.com

*通信作者: 袁德保(1982—), 男, 助理研究员, 博士, 研究方向为农产品贮藏与加工。E-mail: yuandebao@163.com

要的意义。过去食品工业常采用亚硫酸盐等硫制剂来抑制褐变,其具有高效且低廉的特点。但因存在潜在的安全性问题,FDA已禁止在新鲜果蔬中使用^[2]。目前,允许在食品体系尤其是果蔬中使用的一些抑制剂有VC、柠檬酸等,它们对酶促褐变的抑制效果远不如亚硫酸盐等硫制剂,因此满足不了食品工业的要求。

近年来,有研究^[3-7]表明美拉德反应产物(MRPs)能够抑制苹果、马铃薯、甘薯等的酶促褐变。MRPs的酶促褐变抑制能力与它的抗氧化活性有关,而它的抗氧化活性主要取决于两个方面:清除活性氧的能力和螯合金属离子的能力^[8]。MRPs是羰基化合物和氨基化合物反应所得的一类非酶促褐变产物,其结构复杂,种类繁多,其抗氧化性除了与一系列中间产物——含硫、含氮的杂环化合物以及一些还原酮类有关外,还与反应终产物类黑精有关^[9]。影响MRPs结构和组成的因素很多,在这些影响因素中反应体系的初始pH值对MRPs的影响较大^[10]。因此,本实验研究反应初始pH值对MRPs抑制香蕉多酚氧化酶能力、抗氧化活性及螯合Cu²⁺能力的影响,以期MRPs作为香蕉加工中的褐变抑制剂提供理论依据和实用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

香蕉(巴西蕉)购自海口大润发超市,表皮呈鲜黄色,九成熟,无机械损伤。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH) 美国Sigma公司;邻苯二酚紫、吡啶、赖氨酸、果糖、NaOH、偏重亚硫酸钠、邻苯二酚、三氯乙酸、铁氰化钾、无水乙醇、VC、EDTA均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

4836 PARR 5500压力反应釜 美国Parr公司;Alpha-4冷冻干燥机 德国Matrin Christ公司;CR-22G冷冻高速离心机 日本Hitachi公司;UV-2300紫外分光光度计 上海天美科学仪器有限公司;CR-400色彩色差计 日本Konica Minolta公司。

1.3 方法

1.3.1 美拉德反应产物的制备

配制浓度均为1mol/L的果糖与赖氨酸溶液,两种溶液等体积混合,用浓磷酸或4mol/L的NaOH溶液调节混合液pH值分别为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11。然后将混合液置于压力反应釜中,在温度为110℃条件下反应1h。反应结束后,立即将反应产物置于冰水中冷却,冷却后的产物冻成干粉贮藏备用。

1.3.2 DPPH自由基清除率的测定

DPPH自由基清除率的测定参照Maillarda等^[11]的方

法,取质量浓度为0.1g/100mL的MRPs样液2mL,分别加入 1×10^{-4} mol/L的DPPH自由基无水乙醇溶液2mL,混匀,于常温条件下反应30min,测反应液在517nm波长处的吸光度(A_1),空白组(A_0)以等体积蒸馏水代替样品溶液,对照组(A_2)以等体积无水乙醇代替DPPH自由基溶液,并以等体积蒸馏水和无水乙醇混合液空白调零。每个样液做3次平行实验。清除率按式(1)计算。

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

1.3.3 还原力的测定

参照Kanokwan等^[12]的测定方法,取1mL 2g/100mL的MRPs样液加入0.2mol/L pH6.6的磷酸缓冲溶液和1g/100mL的铁氰化钾溶液1mL,混合液于50℃条件下水浴20min后急速冷却,再加入10g/100mL的三氯乙酸溶液1mL,然后于4000r/min离心5min,取其上清液1mL,加入蒸馏水2mL、0.1g/100mL的FeCl₃溶液1mL,放置10min后于700nm波长处测吸光度(A_{700nm}),以0.01g/100mL的VC溶液代替MRPs样液作为对照组,吸光度越大还原力越强。

1.3.4 Cu²⁺螯合能力的测定

在Saiga等^[13]的方法上稍加修改,邻苯二酚紫与Cu²⁺螯合生成蓝色螯合物,在有其他螯合Cu²⁺的物质存在时,邻苯二酚紫会与Cu²⁺分离而使溶液颜色变浅。取0.1g/100mL的MRPs样液1mL,测定混合液600nm波长处吸光度(A_1),同时以0.025g/100mL EDTA溶液代替MRPs样液作对照,再以1mL蒸馏水代替MRPs样液,测得吸光度(A),Cu²⁺螯合率按式(2)计算。

$$\text{螯合率}/\% = \frac{A - A_1}{A} \times 100 \quad (2)$$

1.3.5 抑制PPO酶活力的测定

新鲜的香蕉果肉与pH 6.6的磷酸缓冲溶液以1:4的料液比打浆,打好的浆液均质3min,4℃、10000r/min离心20min,上清液即为粗酶液。

PPO活力测定参照Galeazzi等^[14]方法,取0.1g/100mL的MRPs样液1mL,加入pH 6.6的磷酸缓冲液1.8mL和0.2mol/L的邻苯二酚溶液1mL,摇匀,混合液于30℃水浴5min,加入制备好的酶液0.2mL,摇匀。酶液刚加入即开始计时,每隔1min测定一次420nm波长处的吸光度,共6次,每个样液重复3次,空白组以蒸馏水代替MRPs样液,对照组以同质量浓度的Na₂S₂O₅溶液代替MRPs样液。酶活力以吸光度每分钟增加0.001为一个活性单位(U)。加入样品后的酶活力为 A_1 ,不加MRPs样液为空白,酶活力为 A_0 ,酶活残存率按式(3)计算。

$$\text{酶活残存率}/\% = \frac{A_1}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

1.3.6 数据分析

每个实验重复3次,结果采用LSD法进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 初始pH值对MRPs清除DPPH自由基的影响

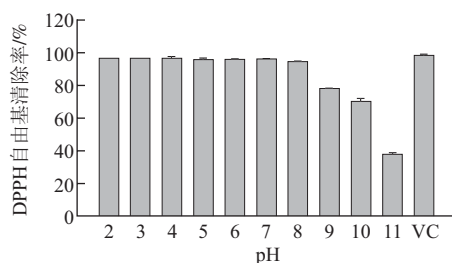


图1 不同初始pH值条件下MRPs清除DPPH自由基的能力

Fig.1 DPPH free radical scavenging effects of MRPs prepared at different initial pH values

MRPs抑制酶促褐变的能力与其抗氧化性有关。而MRPs的抗氧化能力取决于其对活性氧的清除能力。一般通过测定MRPs的DPPH自由基清除率和还原力来评价其抗氧化性。由图1可知,不同初始pH值的MRPs清除DPPH自由基的能力低于0.01g/100mL的VC(接近98%)。酸性条件下的MRPs清除DPPH自由基的能力强于碱性条件下的MRPs。pH2~8时,MRPs的DPPH自由基清除率皆大于90%;当反应pH>8时,随着pH值的增大,DPPH自由基的清除能力急剧下降,由pH8时的95%下降到pH11时的37%。研究发现^[15],弱碱(pH7~9)条件下组氨酸与木糖的美拉德反应产物表现出较低的抗氧化能力,而弱酸(pH5~7)条件下,精氨酸与木糖的反应产物的抗氧化能力最佳,本实验则得出果糖-赖氨酸体系在酸性条件下皆呈现较强的DPPH自由基清除能力。不难发现,除反应初始pH值外,MRPs的抗氧化能力与底物种类也密切相关。

2.2 初始pH值对MRPs还原能力的影响

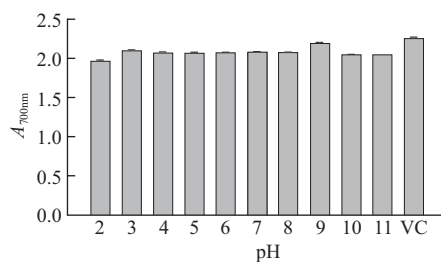


图2 不同初始pH值条件下MRPs的还原力

Fig.2 Reducing powers of MRPs prepared at different initial pH values

由图2可知,果糖-赖氨酸在不同反应初始pH值条件下的MRPs还原能力不同,且皆远小于0.01g/100mL的VC(吸光度为2.256)。pH9时,吸光度最大,接近2.20,说明初始pH值为9时的MRPs还原力最强;pH2时,MRPs的还原力最小;pH4~8时,MRPs还原能力无明显差异($P<0.05$)。

由图1、2可知,虽然DPPH自由基清除率和还原能力

都可以作为衡量MRPs抗氧化能力的指标,但两者随反应pH值的变化并不一致。原因在于MRPs的自由基清除能力来源于一些杂环化合物,如蛋白黑素、呋喃等,而还原力的大小则取决于MRPs中还原酮类物质的含量^[16]。

2.3 初始pH值对MRPs螯合Cu²⁺能力的影响

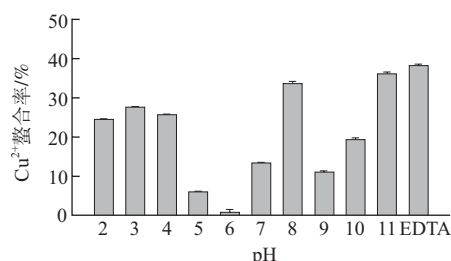


图3 不同初始pH值得到的MRPs的Cu²⁺螯合率

Fig.3 Cu²⁺ chelating capacities of MRPs prepared at different initial pH values

多酚氧化酶是一类含铜的氧化还原酶,多酚氧化酶的酶活性常因Cu²⁺被螯合而失活。因此,Cu²⁺螯合能力是考察MRPs对多酚氧化酶酶促褐变抑制能力的重要指标。EDTA作为食品添加剂,在食品体系中的最高添加量约为0.025g/100mL^[17],而该质量浓度的EDTA螯合Cu²⁺的螯合率约为40%,如图3所示。不同初始pH值下的MRPs的螯合Cu²⁺的能力均小于0.025g/100mL的EDTA。偏酸或偏碱条件下的果糖-赖氨酸MRPs都具有一定的螯合能力,反应初始pH 11时,MRPs螯合率达38%;而反应初始pH8时的螯合Cu²⁺能力也较高,仅次于pH11时,达36%。Wijewickreme等^[18]研究得出,果糖-赖氨酸模型产物在反应pH6.14(127℃, 119min)、pH8.51(157℃, 107min)、pH8.57(159℃, 43min)条件下有较佳的Cu²⁺螯合能力,并指出MRPs螯合Cu²⁺的关键是美拉德反应初期生成Amadori重排产物以及最终阶段形成的类黑精等。本实验条件下(110℃, 1h)初始pH2~4时,美拉德反应缓慢,初期产物生成较多,而初始pH值为碱性时(特别是pH11时),美拉德反应剧烈,有助于类黑精形成。

2.4 初始pH值对MRPs抑制香蕉PPO酶活力的影响

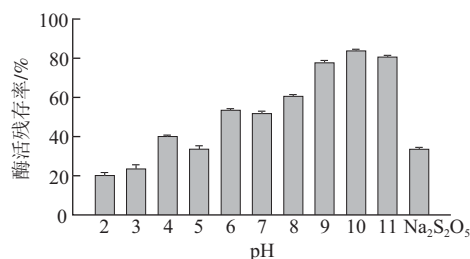


图4 不同初始pH值条件下MRPs抑制香蕉PPO酶活力的能力

Fig.4 Inhibitory activities of MRPs prepared at different initial pH values on banana PPO

由图4可知,不同反应pH值对MRPs抑制香蕉PPO酶活力的影响显著($P<0.05$)。当pH值为2~5时,其对PPO

的抑制能力和同质量浓度的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 相当。其中 $\text{pH}2\sim3$ 时,对PPO的抑制能力要强于同质量浓度的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 。随着反应初始 pH 值的增加,酶活残存率逐渐增大。当反应 $\text{pH}2$ 时,酶活残存率接近20%,而反应 $\text{pH}9\sim11$ 时,酶活残存率接近80%。Billaud等^[19]研究葡萄糖和L-半胱氨酸MRPs对苹果PPO的抑制作用中得出:初始反应 $\text{pH}<6$ 时,MRPs对苹果PPO的抑制明显,尤其是在 pH 值为2~4时,表现出较强的酶活抑制力^[19]。本实验得出的结论与其基本一致。

对比图3和图4可以看出,MRPs对PPO酶活力的抑制与其螯合 Cu^{2+} 的能力之间存在着一定关系,但是不存在绝对的依赖关系,如初始 pH 值为碱性条件时(特别是 $\text{pH}8$ 或11时),MRPs具有较强的螯合 Cu^{2+} 的能力,然而该 pH 值条件下MRPs抑制PPO酶活力的能力较差。酸性条件下的MRPs能够较好地抑制香蕉PPO引起的酶促褐变,说明具有抑制能力的成分可能来源于美拉德反应的一些初期产物,且螯合 Cu^{2+} 能力只是其抑制PPO酶活力的机制之一,其他可能作用机制还需进一步研究。

3 结 论

初始反应 pH 值不同时得到系列MRPs,其抑制香蕉酶促褐变能力相关的性质,如DPPH自由基清除能力、还原力、螯合 Cu^{2+} 能力和抑制PPO酶活性等呈现较大差别。初始 pH 值为酸性条件时,反应产物呈现较优的香蕉酶促褐变抑制能力和抗氧化能力,该产物中的活性成分可能是美拉德反应的部分初期产物。上述研究结果将为香蕉加工中的酶促褐变的控制起到指导作用。后续研究将会考察其他因素对产物抑制香蕉酶促褐变的影响,此外,MRPs抑制PPO酶活力的机制还有待研究。

参考文献:

- [1] CANO P, MARIN M A, FUSTER C. Effects of some thermal treatments on polyphenoloxidase and peroxidase activities of banana[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1990, 51(2): 223-231.
- [2] ALZAMORA STELLA M, TAPIA MARIA S, LOPEZ-MALO A. Minimally processed fruits and vegetables fundamental aspects and applications[M]. Maryland: Aspan Publication, 2000.
- [3] BILLAUD C, ROUX E, BRUN-MÉRIMÉE S, et al. Inhibitory effect of unheated and heated *D*-glucose, *D*-fructose and *D*-cysteine solutions and Maillard reaction product model systems on polyphenoloxidase from apple. I. Enzymatic browning and enzyme activity inhibition using spectrophotometric and polarographic methods[J]. Food Chemistry, 2003, 81(1): 35-50.
- [4] ROUX E, BILLAUD C, MARASCHIN C, et al. Inhibitory effect of unheated and heated *D*-glucose, *D*-fructose and *L*-cysteine solutions and Maillard reaction product model systems on polyphenoloxidase from apple. II. Kinetic study and mechanism of inhibition[J]. Food Chemistry, 2003, 81(1): 51-60.
- [5] BILLAUD C, BRUN-MÉRIMÉE S, LOUARME L, et al. Effect of glutathione and Maillard reaction products prepared from glucose or fructose with glutathione on polyphenoloxidase from apple: enzymatic browning and enzyme activity inhibition[J]. Food Chemistry, 2004, 84(2): 223-241.
- [6] LEE M K, PARK I. Inhibition of potato polyphenol oxidase by Maillard reaction products[J]. Food Chemistry, 2005, 91(1): 57-61.
- [7] WU J J, CHENG K W, LI E T S, et al. Antibrowning activity of MRPs in enzyme and fresh-cut apple slice models[J]. Food Chemistry, 2008, 109(2): 379-385.
- [8] 严昊, 付惠, 谢冰. 美拉德反应及其产物抗氧化活性研究进展[J]. 宜宾学院学报, 2007(12): 82-83.
- [9] 鲁伟, 黄筱茜, 柯李晶, 等. 美拉德反应产物的抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(7): 61-64.
- [10] 吴惠玲, 王志强, 韩春, 等. 影响美拉德反应的几种因素的研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(5): 441-444.
- [11] MAILLARD M N, BILLAUD C, CHOWA Y N, et al. Free radical scavenging, inhibition of polyphenoloxidase activity and copper chelating properties of model Maillard systems[J]. LWT-Food Science and Technology, 2007, 40(8): 1434-1444.
- [12] KANOKWAN M, SOOTAWAT B, MUNEHICO T. Effect of reactant concentrations on the Maillard reaction in a fructose-glycine model system and the inhibition of black tiger shrimp polyphenoloxidase[J]. Food Chemistry, 2006, 98(1): 1-8.
- [13] SAIGA A, TANABE S, NISHIMURA T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(12): 3661-3667.
- [14] GALEAZZI M A M, SGARBIERI V, COSTANTINIDES S M. Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenoloxidase from dwarf variety of banana (*Musa carentishii*) [J]. Journal of Food Science, 1981, 46(1): 150-155.
- [15] 李永富. 美拉德反应产物的抗氧化功能[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(32): 13936-13937.
- [16] 王惠英, 孙涛, 周冬香, 等. 美拉德反应产物抗氧化性能研究进展[J]. 食品科技, 2007(8): 12-14.
- [17] 卫生部食品卫生监督检验所. GB 2760—2011食品安全国家标准食品添加剂使用标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 1996.
- [18] WIJEWICKREME A N, KITTS D D, DURANCE T D. Reaction conditions influence the elementary composition and metal chelating affinity of nondialysable model Maillard reaction products[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(12): 4577-4583.
- [19] BILLAUD C, MARASCHIN C, NICOLAS J, et al. Inhibition of polyphenoloxidase from apple by Maillard reaction products prepared from glucose or fructose with *L*-cysteine under various conditions of pH and temperature[J]. LWT-Food Science and Technology, 2004, 37(1): 69-78.