

对蜂蜜中主要抗褐变因子的探讨

崔洪昌

(北京蔬菜研究中心, 北京 100081)

摘 要 选用 AG50W-X8 阳离子交换树脂, 并以批处理的方式, 成功地将蜂蜜中的肽类物质与其它组分得到了分离。抗褐变实验结果清楚地表明, 蜂蜜中的肽类成分完全没有抑制褐变的活性。这与以前的报道截然不同。通过进一步的研究发现, 较低的 pH 值可能是蜂蜜抗褐变的主要因素, 高浓度的还原糖也具有一定的抑制褐变作用。

关键词 蜂蜜 褐变抑制作用 氢离子浓度 肽 还原糖 果品蔬菜加工

褐变是酚类化合物被氧化成有色多酚产物的结果。虽然也存在着自然氧化现象, 但在多酚氧化酶(PPO) 催化作用下的酶促褐变是褐变的主要原因^[5, 6, 7, 12]。由于酚类化合物和多酚氧化酶在植物体内都大量存在, 所以在蔬菜和果品加工中褐变是一个很普遍的问题^[3, 5]。它不仅破坏了产品原有的颜色, 还经常会产生一些异味, 因而严重影响了产品的质量。到目前为止, 控制褐变最有效的办法是添加一定浓度的亚硫酸盐。这一措施已经在实际生产中得到了广泛的应用。然而, 最近的研究结果表明: 亚硫酸盐对人体健康有害^[2], 其使用受到限制。为寻找有效的天然抗褐变物, 前人作了大量的工作。通常采取以下措施可以达到减缓或抑制褐变的目的: ①去除酶促反应的底物^[4]; ②添加底物保护剂和维生素 C 及其衍生物和含巯基化合物等还原剂, 以及酚酸等底物类似物都被证明是褐变抑制剂^[1, 4]; ③降低多酚氧化酶活性, 这可以通过加热、降低 pH 值、改变盐的浓度等实现。同时, 有报道认为半胱氨酸等络合剂能结合 PPO 酶的 Cu^{2+} 离子, 从而使酶失活。另外, 有人还分别从蘑菇和马铃薯中分离到多肽成份, 并认为它们能够特异性地抑制 PPO 酶活性^[11, 14]。最近, Oszmianski 等人发现蜂蜜具有很好的抑制 PPO 酶和褐变的效果, 并推测其中一些分子量大约 600 的小肽为主要活性成分^[8]。但是, 对这一组分的理化性质并不清楚, 其抗褐变的效果也有待证实。为进一步了解蜂蜜抗褐变的机制, 分离提纯这些小肽很有必要, 但技术难度很大。本文即报道分离纯化这些组分的方法, 并对蜂蜜中抑制褐变的主要因素进行了研究。

1 材料和方法

本实验中所用的蜂蜜为苜蓿花粉蜜, 购于当地生产者(Geneva, New York)。儿茶酸和蘑

酪氨酸酶均购于 Sigma 公司。

1.1 抗褐变指数测试方法

首先在比色皿中加入 0.8ml 试样或对照溶液(pH 6.5, 0.01M 磷酸缓冲液)和 0.58mg/ml 的儿茶酸溶液 2ml, 然后再加入 0.1mg/ml 的酪氨酸酶溶液 0.2ml, 立刻混匀并开始计时。待 1min 后用紫外及可见光分光光度计(Model 552 Spectrometer, PE Co.)在 420nm 测有色氧化产物的吸光值。反应一律在室温下进行。底物及酶溶液均用 pH6.5, 0.01M 的磷酸缓冲液配制。按下式计算抗褐变指数:

$$\text{抗褐变指数} = \frac{\text{对照的吸光值} - \text{试样的吸光值}}{\text{对照的吸光值}} \times 100\%$$

1.2 其他检测方法

根据需要, 样品中的糖浓度用折光计或 Clinitest 2126 片状试剂(Ames Co.)测定; 茚三酮试验根据 Moore 和 Stein 的方法进行^[10]。

1.3 柱层析法

蜂蜜首先用 pH6.5, 0.01M 的磷酸缓冲液配成 40% W/V 的溶液, 以减小样品的粘度。然后取 20ml, 上样于 Bio-gel P2(Bio-Rad Co.)分子筛层析柱(柱长 30cm, 直径 2.5cm), 再用磷酸缓冲液进行洗脱, 流速为 0.5ml/min。分离后的馏分在波长 280nm 处监测; 同时用分部收集器收集, 每管 5.5ml。

2 结果与讨论

2.1 小分子肽的分离及其抗褐变作用

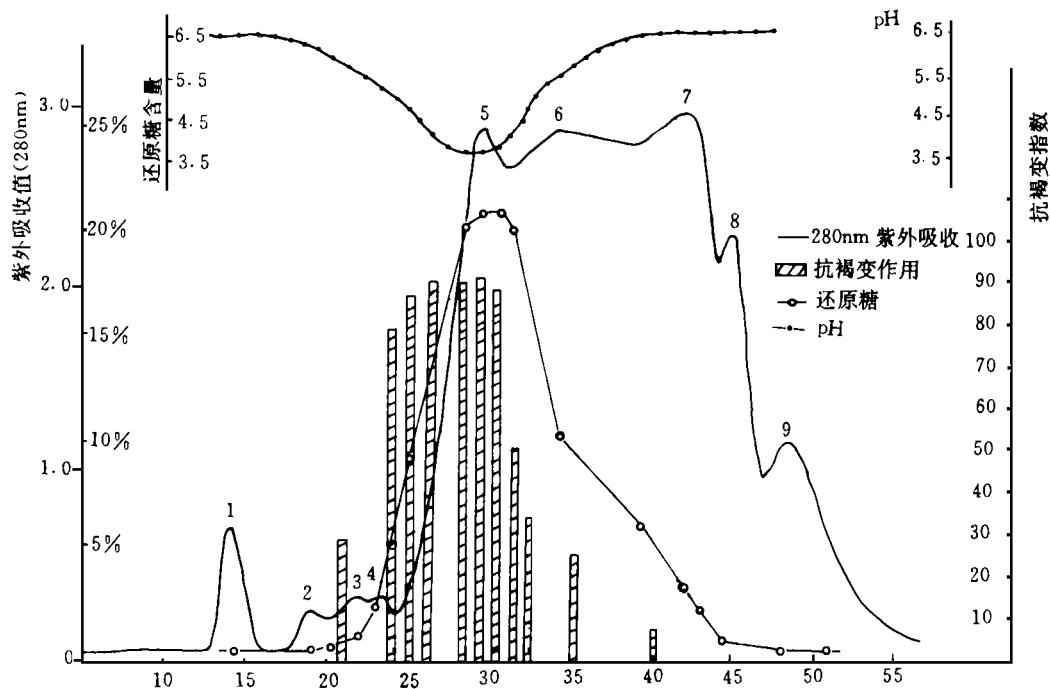
将 30ml 浓度为 25% 的蜂蜜加入装有 20g H⁺形态的 AG50 W-X8 阳离子交换树脂的烧杯中充分搅拌。平衡 2h 后, 倾去溶液, 再继续加入蒸馏水洗涤树脂, 每次 30ml, 并检测其折光值。如此重复多次, 直到折光值几乎为零。最后一次加水后, 用 NaOH 溶液将 pH 值调到 8.0。分别收集各步的洗脱液。同时以在等量树脂中加入 30ml 蒸馏水, 并按同样步骤进行处理的作为对照。

蜂蜜溶液经上述方法处理后, 共得到 6 个组分, 但只有最后一份样品洗脱液在茚三酮试验中呈现强烈的正反应(溶液变为深紫色), 而其它样品及对照溶液却没有紫色出现。对这一部分溶液进行还原糖测定, 发现其糖含量为零。这说明蜂蜜中的小分子肽和氨基酸组分与糖分得到了完全分离, 并被富集在第 6 次洗脱液中。但是, 抗褐变试验结果却清楚地表明: 这些茚三酮试验阳性的物质并没有任何抑制 PPO 酶活性, 而第 1~4 号样品洗脱溶液都表现出不同程度的抗褐变作用(都有一定的折光值)。这与以前的报道^[8]截然不同。作者认为, 蜂蜜中的主要抗褐变因子可能为其它一些组成成分, 而不是小分子肽。

2.2 蜂蜜中主要抗褐变因素的探讨

为弄清蜂蜜中抗褐变成分的性质, 并了解本文对小分子肽抗褐变作用观察结果与以前报道不同的原因, 作者参照文献 [8] 的方法, 用 Bio-Gel P2 分子筛柱层析法对蜂蜜溶液进行了分离(见方法部分)。在其 280nm 的紫外吸收图(见附图)上, 可以看到蜂蜜被分成 9 个组分峰。检测各馏分的抗褐变指数, 发现只有第 24~35 管馏分表现出明显的抑制 PPO 酶活性, 其抗褐化

作用的强弱与第 5 号峰的紫外吸收值有一定的相关; 而茚三酮试验结果表明: 这一紫外吸收峰为肽类及游离氨基酸的组分峰。这似乎表明蜂蜜中的肽类物质可能为其主要抗褐变因子。但是, 通过进一步的试验发现, 第 5 号峰并非仅由与茚三酮反应阳性的成分组成, 而是与还原糖的混合峰; 而且这些具有抗褐变作用的馏分的 pH 值也不同程度地低于 6.5, 其抗褐变指数的变化与 pH 值以及糖浓度的变化趋势相一致。



附图 蜂蜜溶液经 Bio-Gel P2 分子筛柱层析分离后馏分的组成

已有很多实验结果证明, 在诸多褐变抑制因子中, pH 具有最重要的作用^[1,3]。较低的 pH 值不但可以直接降低多酚氧化酶的活性, 从而有效地抑制褐化反应^[4], 其它一些抗褐变物质, 如芳香羧酸类及卤盐, 其抗褐变作用很大程度上也取决于溶液的 pH 值^[1]。Sayavedra-soto 通过对亚硫酸盐的抗褐变机理的研究也发现: 这一最有效的抗褐变物质同样需要 H^+ 的存在^[3]。当溶液的 pH 值低于 4.0 时, 很低浓度的亚硫酸盐即可完全抑制褐化; 而 pH 值高于 7.0 时, 它的作用几乎完全失去。对于 pH 的这种重要作用, Janovitz-Klapp 曾特别加以强调。因此, 根据以上实验结果可以推断: 蜂蜜较低的 pH 可能是影响其抗褐变作用的重要因素。将色谱分离后的馏分溶液 pH 调至 6.5 后, 其抗褐变作用大大减弱, 具有最强抑制作用的第 29 管馏分的抗褐变指数从 91% 降到了 25%, 进而证实了上述推测。另外, 根据 Janovitz-Klapp, H^+ 是一种非竞争性的 PPO 酶抑制剂^[1], 这与 Oszmianski 描述的蜂蜜的抗褐变的机制一致, 也说明了 pH 对蜂蜜抗褐变能力的主导作用。以前关于蜂蜜中小分子肽抑制 PPO 酶活性及褐化作用的报道只是根据茚三酮反应的强度及 280nm 的吸光值与抗褐变指数具有一定相关性的现象而作出的结论, 却没有考虑到其它组成成分和因素, 特别是 pH 的影响, 因而是片面的。当

然, 尽管本文证明这些肽类化合物和氨基酸本身没有抗褐变作用, 但作为两性物质它们却是很好的缓冲剂, 所以可能对于维持蜂蜜的酸度, 加强抗褐变能力具有一定的协同作用。这也许是蜂蜜经磷酸缓冲液稀释并洗脱后仍具有较低 pH 的原因。

葡萄糖和果糖作为蜂蜜中的主要组成成分^[9], 可能对抗褐变作用有影响。根据蜂蜜的糖分组成, 我们配制了不同浓度的还原糖溶液, 发现其抗褐变指数与相等糖浓度的馏分在其 pH 调至 6.5 后的基本相当。由于糖溶液只表现较弱的 PPO 酶抑制能力, 因此其抗褐变机制可能与蔗糖相同^[8], 主要通过较大的粘度, 隔断多酚氧化酶及其底物与氧气的接触而实现。

总之, 由上述实验结果和分析可以说明: pH 是蜂蜜抑制褐变的主要因素, 还原糖也有一定的效果, 其它组成成分则几乎没有什么作用。

参 考 文 献

- 1 Janovitz-Klapp et al. Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem*, 1990, 38: 926–931
- 2 Taylor SL, Bush RK. Sulfite as food ingredient. *Food Technol*, 1986, 42: 47–52
- 3 Sayavedra LA, Montgomery MW. Inhibition of polyphenolase by sulfite. *J Food Sci*, 1986, 51(6): 1531–1536
- 4 Zemel ZP et al. Low pH inactivation of apple juice. *J Food Sci*, 1990, 55(2): 562–563
- 5 Vámos-Vigyazo L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr*, 1981, 15: 49–127
- 6 Mayer AM, Harel E. Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*, 1979, 18: 193–215
- 7 Mayer AM. Polyphenol oxidase in plants. Recent progress. *Phytochemistry*, 1987, 26: 11–20
- 8 Oszmianski J, Lee CY. Inhibition of polyphenol oxidase activity and browning by Honey. *J Agric Food Chem*, 1990, 37: 1892–1895
- 9 Sancho MT et al. Provincial classification of Basque country (northern Spain) honeys by their chemical composition. *J Apic Res*, 1991, 30(3–4): 168–172
- 10 Moore S, Stein WH. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J Biol Chem*, 1948, 176: 367–388
- 11 Madhosingh C. Mushroom inhibitors of dopa oxidation. *Can J Microbiol*, 1975, 21: 2108–2111
- 12 Joslyn MA, Ponting JP. Enzyme-catalyzed oxidative browning of fruit products.
- 13 Kahn V. Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on o-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana. *J Food Sci*, 1985, 50: 111–114
- 14 Nilova VP et al. A protein inhibitor of tyrosinase from potato tubers. *Dokl Akad Nauk Biochem (USSR)*. 1973, 21: 170–273

Investigation of Major Browning-inhibiting Factors in Honey

Cui Hongchang

(Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100081)

Abstract Peptides in honey was successfully separated from other components, using cation exchange resin AG50W-X8 in a batch mode. However, contrary to previous reports these substances showed no browning-inhibiting activities in our experiment. Further results indicated that the low pH might be the major factor for browning inhibition, and that reducing sugars were another important inhibitor.

Key words: Honey; Browning-inhibition; Hydrogen-ion concentration; Peptides; Reducing sugars; Fruit and vegetable processing