

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2019.05.013

文章编号:2095-6002(2019)05-0098-05

引用格式:侯海亮,邓莉,杨崑,等.西兰花种子中黑芥子酶酶解性质及其应用研究[J].食品科学技术学报,2019,37(5):98-102.



HOU Hailiang, DENG Li, YANG Min, et al. Study on enzymatic degradation properties of myrosinase in broccoli seeds and its application[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 37(5): 98-102.

西兰花种子中黑芥子酶酶解性质及其应用研究

侯海亮^{1,2}, 邓莉^{1,2}, 杨崑¹, 刘娜¹

(1. 天津春发生物科技集团有限公司 研发中心, 天津 300399;

2. 天津市风味食品配料企业重点实验室, 天津 300399)

摘要:为探究黑芥子酶在食品方面的应用价值,以10种西兰花种子作为实验材料,采用液相色谱测定异硫氰酸烯丙酯的含量,计算在不同pH值、不同温度条件下的黑芥子酶的酶解活性。发现不同种子黑芥子酶的最适条件不同,其温度范围为50~65℃,pH值的范围为5~8。以酶活性最高的种子作为酶源,10种蔬菜作为底物,采用固相微萃取与气相色谱-质谱联用技术相结合的方法,并结合感官评价,评测西兰花种子中黑芥子酶对各种蔬菜香气恢复的程度。结果表明,西兰花种子能够很大程度地恢复十字花科蔬菜香气,并且有恢复部分其他科蔬菜香气的作用。

关键词:西兰花种子;十字花科;异硫氰酸烯丙酯;黑芥子酶;香气

中图分类号:TS255.1

文献标志码:A

黑芥子苷/黑芥子酶体系是十字花科植物中普遍存在的酶促反应体系。该体系产生的异硫氰酸酯盐,不但具有驱虫、杀虫及抑制土壤微生物的功效^[1-4],还具有防癌^[5-7]和抗菌^[8-11]等功效,拥有广阔的市场前景。大多研究者研究的是黑芥子酶的药用价值^[12-15],对黑芥子酶在食品催化方面的应用鲜有报道。本文对黑芥子酶在催化脱水蔬菜方面的应用进行了初步研究,旨在为黑芥子酶在食品方面的进一步研究和应用提供参考。

受保存时间过长或加热等多方面因素影响,生蔬菜、脱水蔬菜及熟制蔬菜等菜品会损失很多异硫氰酸酯类物质,进而失去原有的独特风味。这是因为,蔬菜的内源黑芥子酶容易在保存的过程中失活,不能进一步催化食品中黑芥子苷转化成具有特殊风味的异硫氰酸酯类物质。不同的十字花科植物拥有不同种类、不同含量的异硫氰酸盐,若应用某种异硫氰酸酯类物质对菜品进行调香,会产生明显的不和谐风味。黑芥子酶的酶活性、种类及数量对异硫氰酸酯的生成量均会产生很大的影响,黑芥子酶活性

受pH值、温度等多种因素的制约^[16]。本研究拟采用天然植物西兰花种子中的内源酶作为天然酶,催化蔬菜中黑芥子苷生成异硫氰酸酯类等特殊风味物质。该方法可以使十字花科的生蔬菜、脱水蔬菜及熟制蔬菜散发出特有的香气。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

西兰花种子、油菜籽饼粕及蔬菜皆购自农贸市场;脱水蔬菜为兴化市福味食品有限公司生产;二氯甲烷、石油醚、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸等试剂均为分析纯,购自天津市风船化学试剂有限公司;异硫氰酸烯丙酯(分析纯),购自Sigma公司。

1.2 仪器与设备

HP1200型高效液相色谱、6890N GC-5975 MSD型气相色谱-质谱仪,安捷伦科技(中国)有限公司;85-2型磁力搅拌器,天津市华仪鑫达仪器仪表有限公司;DZF-6020型恒温真空干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;PL403型电子天平、FiveEasy Plus型

pH 检测器,梅特勒-托利多(常州)精密仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 粗黑芥子酶提取物的制备

将西兰花种子用研钵磨碎、过筛,转移至烧瓶。在烧瓶中倒入一定量的石油醚,使石油醚刚好浸过种子粉。过夜脱脂,反复进行 3 次。将脱脂后的西兰花种子放入恒温真空干燥箱中,20 ℃ 下挥去石油醚,即可得到粗黑芥子酶的提取物。

1.3.2 异硫氰酸烯丙酯含量的测量

取一定量的标准品,用 pH 值为 7 的磷酸二氢钾-磷酸缓冲溶液定容至 100 mL,取样量为 10 μL,液相色谱柱采用 Agilent Eclipse XDB-C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm);流动相为 V(甲醇):V(水)=60:40;流速 1 mL/min;柱温 30 ℃;紫外检测波长 247 nm^[17]。进行检测,绘制标准曲线。

1.3.3 黑芥子酶酶活性测定

准确称取 100 mg 粗黑芥子酶提取物样品,油菜籽饼粕 1 g,加入 20 mL pH 值为 7 的磷酸氢二钾-磷酸缓冲溶液,40 ℃ 磁力搅拌酶解 2 h,再加入 2 mL 二氯甲烷萃取。将离心管 5 000 r·min⁻¹条件下离心 5 min,取 10 μL 二氯甲烷清液过滤,进样检测。采用 1.3.2 中检测异硫氰酸烯丙酯的方法测定由酶解生成的异硫氰酸烯丙酯的含量。

黑芥子酶活的定义为 40 ℃、pH 值为 7 的条件下,单位时间(h)转化催化 1 μmol β-硫代葡萄糖苷所需要的酶量,为 1 U。黑芥子酶酶比活力定义为单位质量(mg)粗酶提取物中,在单位时间(h)转化催化 1 μmol β-硫代葡萄糖苷所需要的酶量,为 1 U/mg。

1.3.4 西兰花黑芥子酶催化实验

准确称取 1 g 某种蔬菜及 0.1 g 100 目西兰花种子粉放置于西林瓶中,再加入 10 mL 水密封,作为 2 号瓶。1 号瓶为只有等量的种子粉末及蒸馏水的对照组,3 号瓶为只有等量的蔬菜及蒸馏水的对照组。同一条件下,检测挥发性物质的含量,对比参照是否有含量变化。吸附完成后打开瓶盖,评香员进行感官评价、打分。

1.3.5 挥发性风味物质的测定

1) 气相色谱条件:载气为 He,不分流,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样口处的温度为 250 ℃,程序升温模式,起始温度为 40 ℃,保持 8 min。以 5 ℃·min⁻¹的速率加热气相色谱柱,上升至 140 ℃,保持 3 min;再以 10 ℃·min⁻¹的速率加热气相色谱柱,上升至 250 ℃。

2) 质谱条件:全扫描模式,EI 离子源,电子能量

70 eV,离子源温度 230 ℃,质量扫描范围 *m/z* 为 35 ~ 500 u,无溶剂延迟。

3) 固相微萃取条件:于 50 ℃ 磁力搅拌器上吸附 40 min。

2 结果与讨论

2.1 不同因素对黑芥子酶活性的影响

2.1.1 不同品种西兰花种子对黑芥子酶活性的影响

在温度为 40 ℃,pH 值为 7 的缓冲溶液实验条件下,对不同品种的西兰花种子黑芥子酶酶活性测量,结果见表 1。由表 1 可以看出,成熟期为早中熟的西兰花种子在 40 ℃ 时酶活性最高,酶比活力为 40 U·mg⁻¹左右;中熟型与中晚熟型的酶活性其次,为 31 ~ 33 U·mg⁻¹;晚熟型西兰苔 1 号(西兰苔)酶比活力为 25 U·mg⁻¹。

表 1 10 种西兰花种子的酶活性差异
Tab. 1 Differences of myrosinase activity from 10 broccoli seeds

种子品种	成熟期类型	酶比活力/(U·mg ⁻¹)
绿辉	早中熟	43.6
炎秀	早中熟	40.2
青秀	早中熟	42.1
曼陀绿	早中熟	41.5
碧玉	中熟	31.2
碧绿依	中熟	32.6
永实	中晚熟	31.5
撒里奥	中晚熟	33.1
文兴	中晚熟	32.4
西兰苔	晚熟	25.0

2.1.2 温度对黑芥子酶活性的影响

选取 4 种不同成熟期类型的西兰花种子,在 pH 值为 7,不同温度下对黑芥子酶的酶活性进行检测,将结果绘制成图 1。由图 1 可见,不同品种间的酶活性差异较大:文兴、炎秀种子在 50 ~ 60 ℃ 时,黑芥子酶酶活性最高;西兰苔种子则在 55 ~ 65 ℃ 时黑芥子酶酶活性最高;碧玉种子则在 50 ~ 55 ℃ 时黑芥子酶酶活性最高,但整体差异不大。这 4 种西兰花种子在 50 ~ 65 ℃ 时均能体现出很好的催化效率,其中有两种西兰花种子在 55 ℃ 时催化效率最高。

2.1.3 pH 值对黑芥子酶活性的影响

选取文兴、西兰苔、炎秀及碧玉 4 种西兰花种子作为黑芥子酶的供体,采用磷酸氢二钾-磷酸的缓冲溶液,选择 pH 值为 4、5、6、7、8、9 六个值为测试点,选择 50 ℃ 作为酶解温度,对黑芥子酶的酶

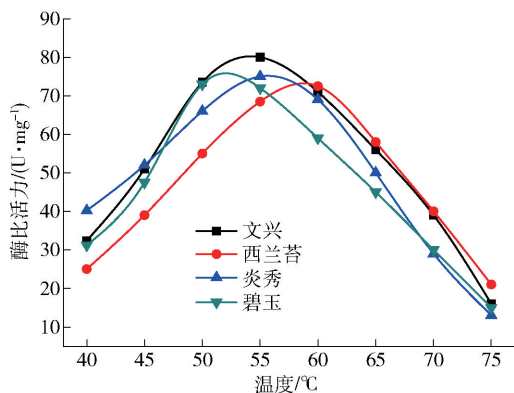


图1 温度对不同品种西兰花种子中黑芥子酶活性的影响

Fig. 1 Effects of temperature on myrosinase activity in different kinds of broccoli seeds

活性进行测量,结果见图2。由图2可知,不同pH值,酶活性差异较大。碧玉、炎秀种子中黑芥子酶最适pH值为5~7;文兴、西兰苔种子酶活性最高时的pH值为6~8。在pH值为6时,碧玉西兰花中的黑芥子酶酶活性最高,其次才是文兴西兰花,但是碧玉西兰花的酶活性较高的位置在弱酸环境,而文兴和西兰苔两种西兰花的黑芥子酶酶活性最高区域则在酸碱中性附近。

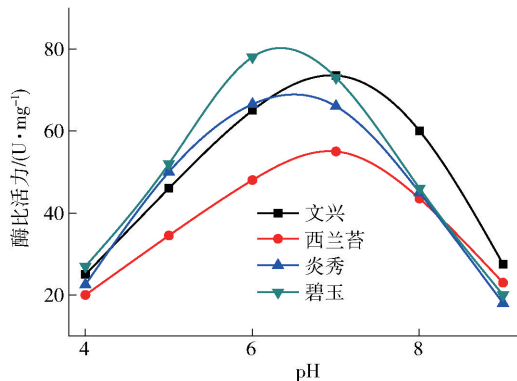


图2 pH值对不同品种西兰花种子中黑芥子酶活性的影响

Fig. 2 Effects of pH on myrosinase activity in different kinds of broccoli seeds

2.1.4 保存状态对黑芥子酶活性的影响

经过实验对比,选取酶活性最高、酸碱适应性最强的文兴西兰花种子做保存状态对黑芥子酶影响的实验。由于测量酶活性的目的是应用于可食用的菜品,所以需要考虑使用方法、食品安全及保质期长短3个方面的因素。西兰花种子需粉碎筛选后进行酶活性测试,作为对照组;脱脂前与脱脂后的种子粉末作为实验组,进行长达一年的跟踪实验,结果见图3。由图3可见,脱脂之后的酶比活力比未脱脂及种子的酶比活力要高,可能是因为单位质量的酶的数量

较多,使得酶比活力较高。随着时间的变化脱脂的种子粉末酶比活力会降低,而没有粉碎的种子及未进行脱脂的种子的酶比活力随着时间的变化不大。因为脱脂过程采用石油醚,操作比较繁琐且有残留;而未粉碎的种子不能直接食用,所以粉碎后筛选未进行脱脂的种子粉末才能作为天然无污染的外源酶,对食品进行风味改良。

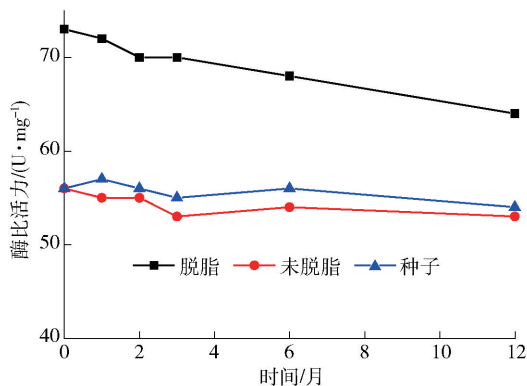


图3 不同状态下的文兴西兰花种子酶活性变化趋势

Fig. 3 Change trends of myrosinase activity in Wenxing broccoli seeds at different state

2.2 西兰花黑芥子酶催化实验结果

经过实验对比及2.1的结果分析,优选出未脱脂的文兴西兰花种子进行蔬菜的香气催化实验。以脱水甘蓝菜为例,直接按照实验1.3.4进行固相微萃取操作,然后进行GC/MS检测,结果见图4。由图4可见,反应前后4-甲硫基戊腈峰面积基本不变。以4-甲硫基戊腈为参照可以看出,反应后的异硫氰酸酯类比例明显升高,峰面积明显增大,尤其是异硫氰酸烯丙酯的含量迅速增加。按峰面积粗略估计,增大的比例约为400%,相比之下,种子粉末对照组的峰面积几乎为0。感官评价结果中,只有种子的1号瓶气味很小,可忽略不计,设定3号瓶值为6.5。以1号瓶及3号瓶的值为参考,对2号瓶的香气进行评价。

除了对脱水甘蓝菜进行了实验分析之外,对其其他的脱水蔬菜、新鲜蔬菜及熟制蔬菜也进行了同样的实验分析,测定结果见表2。由表2可知,脱水的十字花科蔬菜复水之后,再经过文兴西兰花种子的催化,其特征性的气味恢复很大,评香员一致认为浓度过高,产生了“菜臭味”。炒白菜、炒西葫芦是家常菜品,在家常菜品的基础上仍旧能够恢复原有菜品的菜香。表2中的普通蔬菜不仅包括十字花科的蔬菜,还包括部分菊科、藜科、百合科蔬菜。西兰花种子也能够恢复这些蔬菜原有的味道。

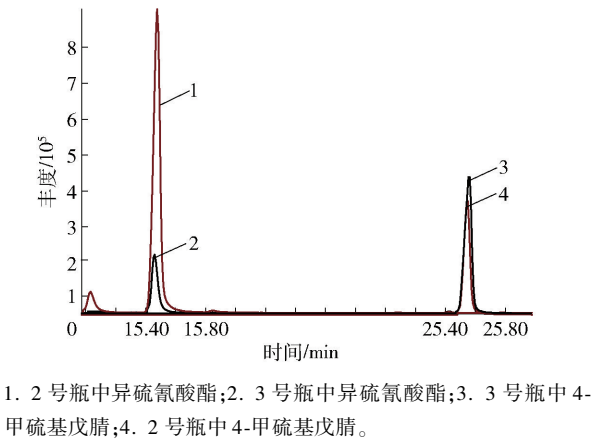


图 4 文兴西兰花种子催化脱水甘蓝菜实验
SPME-GC-MS 分析结果

Fig. 4 Results of SPME-GC-MS detection on catalytic
dehydrated cabbage by Wenxing broccoli seeds

表 2 文兴西兰花种子催化不同蔬菜的感官评价
结果及检测结果

Tab. 2 Results of sensory evaluation and GC/MS detection on different vegetables catalyzed by Wenxing broccoli seeds					
序号	蔬菜	感官评价/强度			峰面积增大 比例/%
		1	2	3	
1	脱水甘蓝菜	0	8.1	6.5	400
2	脱水白菜	0	7.8	6.5	360
3	脱水菜心	0	7.9	6.5	330
4	油麦菜	0	7.5	6.5	190
5	白菜	0	7.6	6.5	170
6	白萝卜	0	7.4	6.5	180
7	菜心	0	7.3	6.5	200
8	紫甘蓝	0	7.4	6.5	180
9	花椰菜	0	7.5	6.5	200
10	奶油生菜	0	7.4	6.5	80
11	菠菜	0	7.3	6.5	60
12	洋葱	0	7.2	6.5	50
13	炒白菜	0	7.7	6.5	150
14	炒西葫芦	0	7.8	6.5	130

3 结 论

西兰花种子作为天然植物的种子,拥有催化硫苷形成异硫氰酸酯等众多风味的天然酶。本研究探讨了不同品种西兰花种子的黑芥子酶比活力,并通过一系列实验测出了黑芥子酶催化硫苷形成异硫氰酸酯的最适温度范围为 50 ~ 65 ℃ ,pH 值为 5 ~ 8。优

选出在弱酸、中性与弱碱环境中均能体现出良好催化作用的文兴西兰花种子,并在 50 ℃ 水中,采用该种子粉碎筛分之后的种子粉末对 10 种蔬菜进行香气恢复实验。结果表明:该种子粉末不仅能刺激新鲜蔬菜散发更多的特征性气味,还能在很大程度上恢复脱水蔬菜(如脱水甘蓝菜、脱水白菜、脱水菜心)及熟制蔬菜(如炒白菜、炒西葫芦)的天然香味。除十字花科蔬菜之外,又尝试了对其他科蔬菜的催化实验。经过实验验证,文兴西兰花种子粉末不但能刺激十字花科的蔬菜产生菜香,还能刺激其他科的部分蔬菜产生天然菜香。本研究表明,通过加入外源的天然黑芥子酶使菜品恢复原有的风味,可以解决部分蔬菜的风味损失问题,开拓了黑芥子酶在新领域的应用研究,为黑芥子酶在食品方面的应用提供了一个新的参考方法。

参考文献:

[1] ALYSSA M B. Inhibition of the general soil microbial community by allyl-isothiocyanate and benzyl-isothiocyanate[J]. BIOS,2015,86(1):31-37.

[2] IRBAHIM R, OSMAN A, SAARI N, et al. Effects of anti-browning treatments on the storage quality of minimally processed shredded cabbage[J]. Journal of Food Agriculture & Environment, 2004, 2(2): 54-58.

[3] JAILWAL A W, ABU-GHANNAM N. Fermentation-assisted extraction of isothiocyanates from brassica vegetable using box-behnken experimental design[J]. Foods, 2016, 5(4): 1-10

[4] INYANG E N, BUTT T M, DOUGNTY K J, et al. The effects of isothiocyanates on the growth of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its infection of the mustard beetle[J]. Mycological Research, 1999,103(8):974-980.

[5] GUPTA P, WRIGHT S E, KIM S H, et al. Phenethyl isothiocyanate: a comprehensive review of anti-cancer mechanisms[J]. Biochim Biophys Acta,2014,1846(2): 405-424.

[6] MA Y S, LIN J J, LIN C C, et al. Benzyl isothiocyanate inhibits human brain glioblastoma multiforme GBM 8401 cell xenograft tumor in nude mice *in vivo* [J]. Environmental Toxicology,2018,33(11/12):1097-1104.

[7] OYERBY A, ZHAO C M, BONES A M, et al. Naturally occurring phenethyl isothiocyanate-induced inhibition of gastric cancer cell growth by disruption of microtubules [J]. Journal of Gastroenterology and Hepatology,2014,29(4):99-106.

[8] LUCIANO F B, MECA G, MANYES L, et al. A chemi-

- cal approach for the reduction of beauvericin in a solution model and in food systems[J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 64: 270 – 274.
- [9] KIM H Y, PHAN-A-GOD S, SHIN I S. Antibacterial activities of isothiocyanates extracted from horseradish (*Armoracia rusticana*) root against antibiotic-resistant bacteria[J]. Food Science and Biotechnology, 2015, 24(3): 1029 – 1034.
- [10] BORGES A, ABREU A C, FERREIRA C, et al. Antibacterial activity and mode of action of selected glucosinolate hydrolysis products against bacterial pathogens[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(8): 4737 – 4748.
- [11] MUSCOLINO D, GIARRATANA F, BENINATI C, et al. Effects of allyl isothiocyanate on the shelf-life of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fillets[J]. Journal of Food Sciences, 2016, 34(2): 160 – 165.
- [12] 刘青凤, 徐德宏, 崔培梧, 等. 黄芥子外敷时芥子酶活性及芥子碱硫氰酸盐含量的变化[J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(26): 20 – 22.
- LIU Q F, XU D H, CUI P W, et al. Influence of the external application of *Brassica juncea* Czerem on the sinapine thiocyanate content and myrosinase activity[J]. World Latest Medicine Information, 2015, 15(26): 20 – 22.
- [13] 丁艳, 李丽倩, 顾振新, 等. 7种十字花科种子中黑芥子酶降解油菜籽饼粕中硫苷的产物比较分析[J]. 食品科学, 2014(13): 1 – 7.
- DING Y, LI L Q, GU Z X, et al. Comparative effects of myrosinase from cruciferous seeds on the glucosinolate degradation products in rapeseed meal[J]. Food Science, 2014(13): 1 – 7.
- [14] 张燕, 李瑶. 茎瘤芥(榨菜叶)中硫苷酶基因的酶活性研究[J]. 西南农业学报, 2017, 4(6): 744 – 749.
- ZHANG Y, LI Y. Study of enzymatic activity of myrosinase gene from *Brassica juncea* (mustard leaves) [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2017, 4(6): 744 – 749.
- [15] 程立, 李思彤, 袁其朋. 黑芥子酶固定化在制备莱菔素中的应用[J]. 中国科学: 化学, 2018, 48(6): 676 – 682.
- CHENG L, LI S T, YUAN Q P. The application of myrosinase immobilized in the production of sulforaphane[J]. Science China: Chemistry, 2018, 48(6): 676 – 682.
- [16] DANIELA M, FIORINA R, IONEL J. Researches concerning the activity of myrosinase in horseradish water extracts[J]. Revista de Chimie, 2006, 57(12): 1302 – 1305.
- [17] 曹银, 汪电雷, 陶秀华, 等. 超高效液相色谱法测定大鼠血浆中异硫氰酸烯丙酯含量及药动学参数[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(4): 264 – 266.
- CAO Y, WANG D L, TAO X H, et al. Determination of plasma allyl isothiocyanate and its pharmacokinetics in rats by UPLC [J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2013, 33(4): 264 – 266.

Study on Enzymatic Degradation Properties of Myrosinase in Broccoli Seeds and its Application

HOU Hailiang^{1,2}, DENG Li^{1,2}, YANG Min¹, LIU Na¹

(1. R&D Center, Tianjin Chunfa Biotechnology Group Co Ltd, Tianjin 300399, China;

2. Tianjin Key Laboratory of Flavor Food Ingredients Enterprise, Tianjin 300399, China)

Abstract: In order to explore the application value of myrosinase in food field, the content of allyl isothiocyanate from 10 types of broccoli seeds was determined by HPLC, and the enzymatic activity of myrosinase was calculated at different pH and temperature. The optimum conditions for myrosinase from different seeds were variable, with a temperature range of 50 – 65 °C and a pH range of 5 – 8. Using the seed with the highest enzyme activity as the enzyme source and 10 vegetables were used for the substrates, the method of combined sensory evaluation with SPME-GS/MS was applied to evaluate the degree of aromas of various vegetables after hydrolysis by myrosinase in broccoli seeds. The results showed that broccoli seeds could restore the aromas of Cruciferous vegetables in a large extent and had the effect of partially restoring the aromas of some other vegetables.

Keywords: broccoli seeds; Cruciferae; allyl isothiocyanate; myrosinase; aromas

(责任编辑: 叶红波)