

毛酸浆多酚氧化酶的酶学特性研究

高新新, 位珍, 常晨, 刘俊坤, 王萍*

(东北林业大学 林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:以毛酸浆中多酚氧化酶(PPO)为研究对象,采用分光光度法在420 nm处对其酶学特性进行研究。结果表明,毛酸浆PPO的底物邻苯二酚的最适质量分数为0.04%;最适pH为7.0;最适温度为35℃;100℃处理2 min,可使酶完全失活;PPO催化的酶促褐变反应动力学符合米氏方程,动力学参数为 $K_m=0.025$ mol/L, $V_{max}=125$ U/min;抗坏血酸、柠檬酸、L-半胱氨酸和亚硫酸钠对PPO酶活性的抑制作用均随浓度的增大而加强,抑制能力由强到弱依次为:抗坏血酸>柠檬酸>L-半胱氨酸>EDTA>亚硫酸氢钠。

关键词:毛酸浆;多酚氧化酶;酶学特性

中图分类号:Q 554 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2015)01—0102—06

Study on Enzymatic Characteristics of Polyphenol Oxidase from *Physalis pubescens* L.

GAO Xinxin, WEI Zhen, CHANG Chen, LIU Junkun, WANG Ping*

(College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: The enzymatic characteristics of polyphenol oxidase(PPO) from *Physalis pubescens* L. was studied by spectrophotometer at 420 nm. The results showed that the PPO enzyme had the highest activity at pH 7.0 and 35 °C and the enzyme activity would be inactivated completely after exposure to 100 °C for 2 min. The kinetics of enzyme-catalyzed reaction of PPO was in accord with Michaelis-Menten equation, with K_m and V_{max} values of 0.025 mol/L and 125 U/min, respectively. In the range designated, it was increasing in inhibitory effects of ascorbic acid, citric acid, NaHSO₃, L-Cysteine and EDTA against enzyme activity with the increasing concentration, and the order as follow: ascorbic acid > citric acid > L-cysteine > EDTA > NaHSO₃.

Keywords: *Physalis pubescens* L., polyphenol oxidase(PPO), enzymatic characteristics

毛酸浆, 俗称菇茑、甜姑娘、黄姑娘等, 属茄科酸浆属草本植物, 成熟时为黄色, 因此有“黄姑娘”之称。原产于南美洲, 是黑龙江的特产。果实成熟时外形圆润, 色泽金黄, 香甜可口, 既是芳香甜美的水

果, 又是营养丰富的补品^[1], 深受人们喜爱。然而, 毛酸浆在加工过程中, 容易发生酶促褐变, 影响毛酸浆加工品质及外观品质。研究表明, 果蔬酶促褐变是由果蔬内多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)与

收稿日期: 2014-04-19

基金项目: 国家级大学生创新实验项目(201310225012)。

* 通信作者: 王萍(1964—), 女, 黑龙江伊春人, 工学博士, 教授, 主要从事植物活性物质研究。E-mail: 949508700@qq.com

多酚类物质接触,催化酚类物质转变成醌,而醌又进一步聚合成黑色素所致^[2-3]。因此,多酚氧化酶活力是决定果蔬组织褐变程度的重要因素之一,对多酚氧化酶特性的研究就成了解决褐变问题的重点所在。目前,关于果蔬类多酚氧化酶已有广泛研究^[4-7]。作者对毛酸浆多酚氧化酶的活性进行研究,并考察不同抑制剂对其 PPO 的抑制效果,旨在为控制毛酸浆加工过程中酶促褐变提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 毛酸浆:市售。

1.1.2 试剂 柠檬酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、邻苯二酚、抗坏血酸、L-半胱氨酸、EDTA、亚硫酸氢钠:均为国产分析纯。

1.1.3 仪器 ALC-210.2 型电子天平:北京赛多利斯仪器系统有限公司产品;TGL-16G 型离心机:上海安亭科学仪器厂产品;201306454 型可见分光光度计:上海佑科仪器有限公司产品;DK-S12 型电热恒温水浴锅:上海森信实验仪器有限公司产品;PB-10 型 pH 计:Sartorius 产品;HC-TP11-10 型天平:上海精科天平产品。

1.2 实验方法

1.2.1 毛酸浆 PPO 的提取 称取果肉 15.0 g,加入 0.05 mol/L pH 7.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 15.0 mL,冰浴下快速研磨至匀浆,低温 13 000 r/min 离心 10 min,取上清液即为毛酸浆 PPO 粗酶液。

1.2.2 毛酸浆 PPO 活性的测定 取 pH 7.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 0.5 mL,0.02 mol/L 邻苯二酚 2.0 mL,混匀,36 °C 保温 10 min 后迅速加入 0.5 mL PPO 粗酶液,酶液加入后开始计时。以 0.5 mL 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液加 2.0 mL 邻苯二酚加去离子水对照。在 420 nm 下每隔 10 s 测一次吸光值,共 240 s,重复测 3 次,以每分钟吸光度改变 0.001 所需酶量为 1 个活力单位。酶活力计算公式为: $X_{PPO} = U/V$

式中:U 为酶活力(U);V 为粗酶液体积(mL)。

1.2.3 pH 对毛酸浆 PPO 活性的影响 配制 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 系列磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,酶反应液组成和酶活力测定条件同 1.2.2,确定 PPO 作用的最适 pH 条件。

1.2.4 温度对毛酸浆 PPO 活性的影响 取最适 pH

条件下磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液 0.5 mL 和 0.02 mol/L 邻苯二酚溶液 2.0 mL,混匀,分别在 30、35、40、45、50、55、60、65、70 °C 保温 10 min,取出后迅速加入 0.5 mL 酶液,按照 1.2.2 方法测定相对酶活力,确定 PPO 作用的最适温度。

1.2.5 毛酸浆 PPO 的热稳定性 取 PPO 粗酶液 0.5 mL 与最适 pH 条件下的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 3.5 mL,混匀,分别在 80、90、100 °C 水浴中分别处理 1、2、3、4、5 min 后,冷却至室温,按 1.2.2 方法测定 PPO 的相对酶活力。

1.2.6 底物浓度对毛酸浆 PPO 活性的影响 分别以浓度为 0.02、0.03、0.04、0.05、0.06 mol/L 的邻苯二酚作为底物,在最适 pH 条件下按照 1.2.2 方法测定 PPO 的相对酶活力,确定 PPO 作用的最适底物浓度。根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法求得米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max} 。

1.2.7 抑制剂对毛酸浆 PPO 活性的影响 用最适 pH 的磷酸盐缓冲溶液配制柠檬酸、抗坏血酸、亚硫酸氢钠、L-半胱氨酸溶液(质量浓度皆为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 g/L)、EDTA 溶液(0.005、0.01、0.015、0.02、0.025 g/L),依次加入最适 pH 条件下的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液 0.5 mL、最适浓度邻苯二酚溶液 1.0 mL、各不同浓度抑制剂 0.5 mL 和 PPO 粗酶液 0.5 mL,按照 1.2.2 方法测定 PPO 相对酶活力。以不加抑制剂所测酶活力为 100%,计算 PPO 相对酶活力。

1.2.8 预煮时间的确定 分别称取 6 份 15 g 的毛酸浆,1 份直接测定 PPO 活力,其余 5 份分别投入沸水中预煮 1、2、3、4、5 min,冷却后在最适 pH 值下按照 1.2.2 方法测定 PPO 相对酶活力。

1.2.9 数据统计与分析 每个实验重复 3 次,利用 Microsoft Excel 软件统计分析数据,计算标准偏差并制图。

2 结果与分析

2.1 毛酸浆 PPO 酶活性的测定

从图 1 可知,在反应最初 30 s 内,相对酶活力几乎成线性增长,说明初始阶段 PPO 反应很快,当反应时间达 30 s 后,相对酶活力上升缓慢并趋于平稳,反应时间超过 30 s 后,酶的活性不能由反应进程完全表征出来,因此确定反应时间 30 s 为最佳。

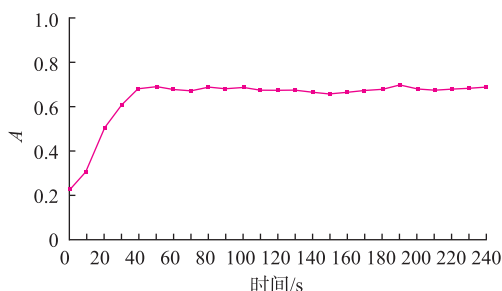


图1 毛酸浆 PPO 反应进程曲线

Fig. 1 Enzymatic reaction curve of PPO from *Physalis pubescens* L.

2.2 pH 值对毛酸浆 PPO 相对酶活的影响

从图 2 可知,毛酸浆 PPO 活性对 pH 的变化较为敏感,当 $\text{pH} < 7.0$ 时,随 pH 升高多酚氧化酶的活性逐渐增大,在 $\text{pH} = 7.0$ 时毛酸浆 PPO 表现出最大活性, $\text{pH} > 7.0$ 时,酶活性随 pH 的升高又逐渐下降,当 $\text{pH} = 8$ 时,毛酸浆 PPO 相对酶活力较低仅为 30.34%。这可能是由于 PPO 是一种含铜蛋白质,在强酸条件下,酶中的铜离子解离出来使酶失活;在碱性环境中,铜离子以 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 形式沉淀出来,使酶蛋白的空间结构发生改变,从而使其活性降低。因此,在加工过程中,可以通过调节 pH 抑制 PPO 活性,减轻毛酸浆酶促褐变程度。

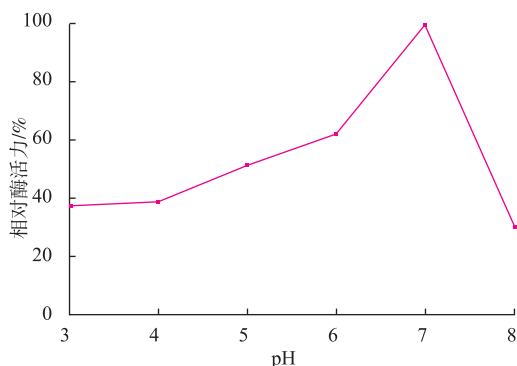


图2 pH 对毛酸浆 PPO 活性的影响

Fig. 2 Effect of pH on the activity of PPO from *Physalis pubescens* L.

2.3 温度对毛酸浆 PPO 相对酶活的影响

从图 3 可知,毛酸浆 PPO 活性受温度影响较大,随着温度的增加,毛酸浆 PPO 相对酶活先增加后降低,在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时达到最大值。当温度为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,酶活性为最高活性的 67.32%,当温度升至 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$,酶活力为最高活性的 52.83%,相对酶活较低。原因是毛酸浆 PPO 在最适温度才能被完全激活,而升高温度对酶蛋白结构的完整性和稳定性造成了破坏,

从而引起毛酸浆 PPO 酶活降低。因此,毛酸浆 PPO 的最适反应温度是 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

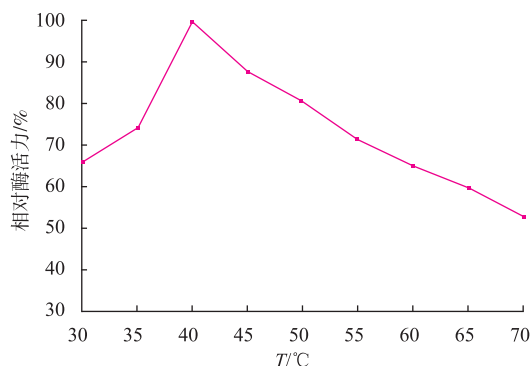


图3 温度对毛酸浆 PPO 活性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the activity of PPO from *Physalis pubescens* L.

2.4 毛酸浆 PPO 的热稳定性

高温可以使蛋白质空间结构改变而发生变性,从而使毛酸浆 PPO 活性降低,使毛酸浆相关产物褐变程度降低。

从图 4 可知,毛酸浆 PPO 经不同高温热处理时,相对酶活力均随热处理时间的延长而下降,且温度越高,热处理对 PPO 的破坏作用越大。分别在 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 3 min, PPO 相对酶活依次为 20.33%、10.67%,而在 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 3 min, PPO 残留活性为 0.67%,表明 PPO 酶活性已完全丧失。因此,在毛酸浆加工中,可采用 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 热处理 3 min 的方法来钝化毛酸浆 PPO,从而达到抑制褐变的目的。

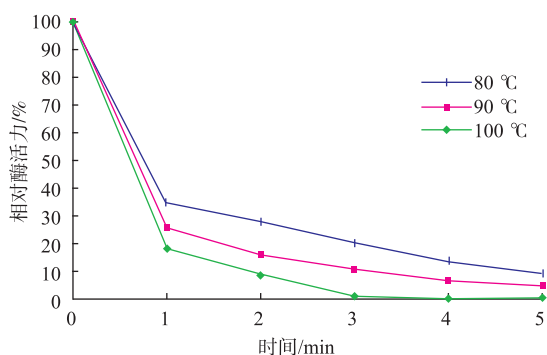


图4 热处理对毛酸浆 PPO 活性的影响

Fig. 4 Effect of heat treatment on the activity of PPO from *Physalis pubescens* L.

2.5 底物浓度对毛酸浆 PPO 活性的影响

由图 5 可知:当底物浓度为 $0.02\sim 0.04\text{ mol/L}$ 时,酶活增加幅度几乎呈线性关系。当浓度为 $0.04\sim 0.06\text{ mol/L}$ 时,酶活性的变化趋于平缓,在底物浓度

为 0.06 mol/L 时酶活达到最大值。这说明该酶促反应存在一个适宜的底物用量,当底物浓度达到这一适宜值时,再增加底物浓度对酶的活性作用不大,反而浓度太高会使酶活下降。因此底物浓度与 PPO 活性的关系遵循 Michealis-Menten 的酶促动力学。根据 Line-weaver-Burke 方程,以 $1/[S]$ 为横坐标, $1/V$ 为纵坐标作图,如图 6 所示,拟合直线相关系数达到 0.987 3,求得米氏常数 $K_m=0.025$ mol/L,最大反应速率 $V_{\max}=125$ U/min。

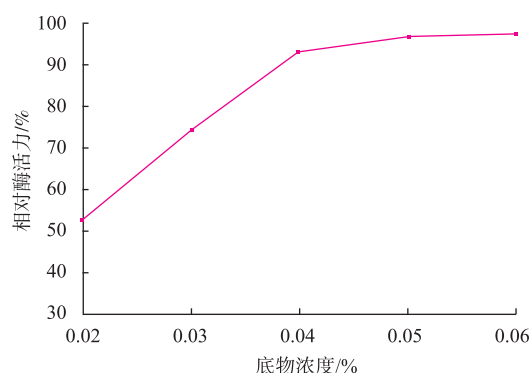


图 5 底物质量分数对 PPO 酶反应速度的影响

Fig. 5 Effect of substrate concentration on the activity of PPO from *Physalis pubescens* L.

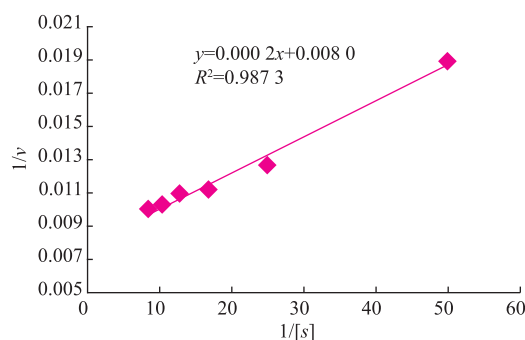


图 6 毛酸浆 PPO 的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 6 Lineweaver-Burk plot of enzyme-catalyzed reaction of PPO from *Physalis pubescens* L.

2.6 抑制剂对毛酸浆 PPO 相对酶活的影响

2.6.1 抗坏血酸对毛酸浆 PPO 活性的影响 抗坏血酸是强还原剂,主要通过 3 方面作用:将酚的氧化产物醌还原成酚;与酶分子中的 Cu^{2+} 螯合,使 PPO 失活;作为竞争性抑制剂,部分替代果蔬中的酚类物质,自身被 PPO 氧化^[8]对毛酸浆 PPO 的活性进行抑制,从而抑制褐变。

由图 7 可知,随着抗坏血酸质量浓度的增加,毛酸浆 PPO 相对酶活力明显减小,当抗坏血酸质量浓

度达到 0.04 g/L 时,毛酸浆 PPO 相对酶活力仅为 1.37%,表明抗坏血酸可对 PPO 活力产生显著的抑制作用。

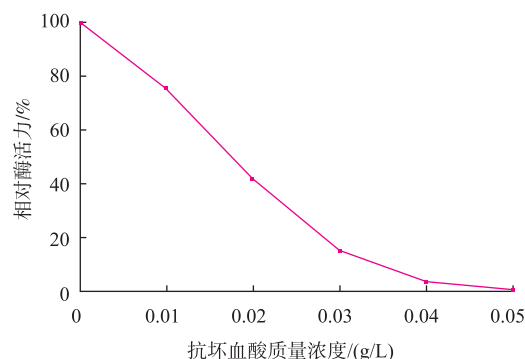


图 7 抗坏血酸质量浓度对毛酸浆 PPO 活性的影响

Fig. 7 Effect of ascorbic acid on the activity of PPO from *Physalis pubescens* L.

2.6.2 柠檬酸对毛酸浆 PPO 活性的影响 柠檬酸作为 1 种螯合剂,其 3 个羧基对毛酸浆 PPO 的铜离子有较强的螯合作用,可形成配位化合物而使毛酸浆 PPO 酶失活。另外,柠檬酸对反应体系的 pH 值有调节作用,使之远离毛酸浆 PPO 最适 pH 而降低活性。

由图 8 可知,随着柠檬酸质量浓度的增加,毛酸浆 PPO 相对酶活力逐渐减小,当柠檬酸质量浓度达 0.04 g/L 时,毛酸浆 PPO 相对酶活力为 19.33%,质量浓度达 0.05 g/L 时,毛酸浆 PPO 相对酶活力为 17.33%。

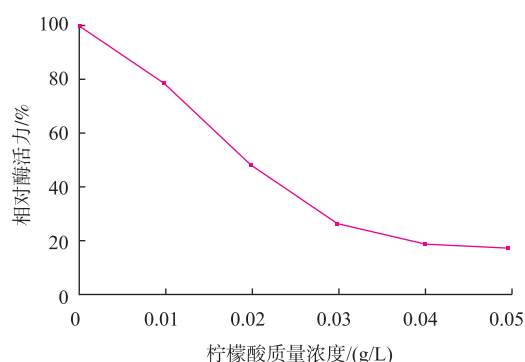


图 8 柠檬酸对毛酸浆 PPO 活性的影响

Fig. 8 Effect of citric acid on the activity of PPO from *Physalis pubescens* L.

2.6.3 L-半胱氨酸对毛酸浆 PPO 活性的影响 L-半胱氨酸是组成蛋白质的 20 种氨基酸之一,无毒、无副作用,不存在食品安全问题,是一种理想的天然抗酶促褐变物质。

由图 9 可知,随着 L-半胱氨酸质量浓度的增

大,毛酸浆 PPO 相对酶活力逐渐降低。L-半胱氨酸浓度达到 0.015 g/L 时,毛酸浆 PPO 相对酶活力为 32.67%,当 L-半胱氨酸质量浓度达到 0.025 g/L 时,毛酸浆 PPO 相对酶活力仍为 20.43%,表明 L-半胱氨酸对毛酸浆 PPO 酶活力有抑制效果,但抑制效果相对抗坏血酸和柠檬酸较差。

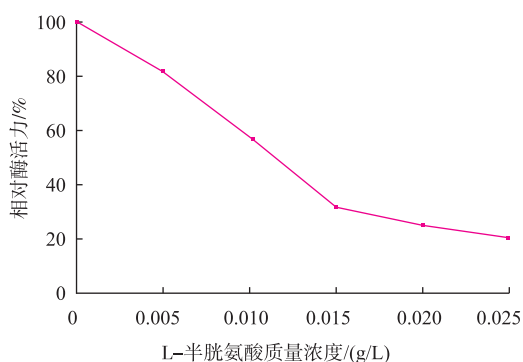


图 9 L-半胱氨酸质量浓度对毛酸浆 PPO 活性的影响

Fig. 9 Effect of L-Cysteine on the activity of PPO from *Physalis pubescens* L.

2.6.4 EDTA 对毛酸浆 PPO 活性的影响 EDTA 作为一种螯合剂,可以与毛酸浆 PPO 中铜离子形成配位化合物而使毛酸浆 PPO 酶失活。

由图 10 可知,随着 EDTA 浓度的增加,毛酸浆 PPO 活力缓慢减小,当 EDTA 质量浓度达到 0.04 g/L 时,毛酸浆 PPO 相对酶活力为 45.33%,质量浓度达到 0.05 g/L 时,毛酸浆 PPO 相对酶活力为 42.58%。说明 EDTA 质量浓度为 0.05g/L 时护色效果最佳,但相比其他抑制剂,EDTA 抑制效果不明显,与张福平^[9]等的研究结果也类似。

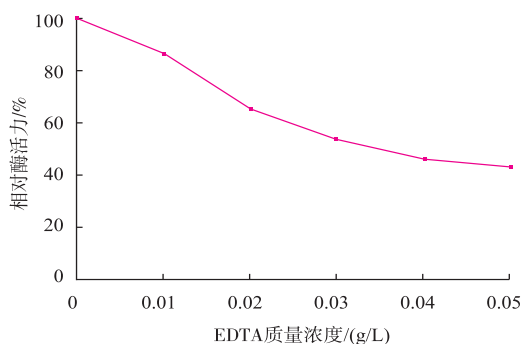


图 10 EDTA 对毛酸浆 PPO 活性的影响

Fig. 10 Effect of EDTA on the activity of PPO from *Physalis pubescens* L.

2.6.5 NaHSO₃ 对毛酸浆 PPO 活性的影响 NaHSO₃ 作为一种常用的褐变抑制剂,一方面不可逆地与醌加成生成无色产物,另一方面还有漂白和

防止微生物污染的作用。

由图 11 可知,随着 NaHSO₃ 质量浓度的增大 PPO 活力降低缓慢。当 NaHSO₃ 质量浓度达到 0.05 g/L 时,毛酸浆 PPO 相对酶活力仍为 66.67%,说明 NaHSO₃ 对毛酸浆的护色效果远不如其他几种抑制剂。并且由于 NaHSO₃ 有漂白作用,可产生不良异味,破坏营养,使组织软化,且有害健康,美国 FDA 已对其使用作出限制^[10]。

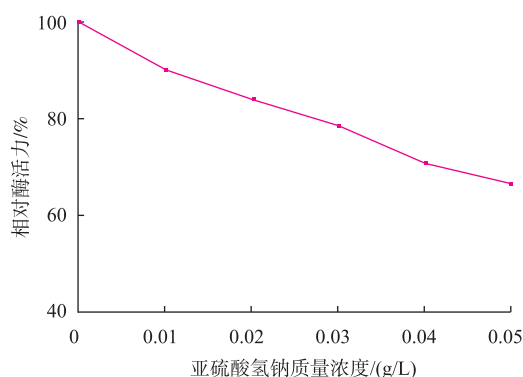


图 11 NaHSO₃ 对毛酸浆 PPO 活性的影响

Fig. 11 Effect of NaHSO₃ on the activity of PPO from *Physalis pubescens* L.

2.7 预煮对毛酸浆 PPO 相对酶活的影响

热烫预煮的主要目的是杀死微生物和破坏多酚氧化酶的活性,防止毛酸浆浊汁在加工过程中变色、变味和营养成分的损失,从而提高产品的保质期^[11-12]。

预煮时间对毛酸浆 PPO 相对酶活力的影响如图 12 所示,随着加热时间的延长,PPO 活性不断降低。100 ℃加热 1 min,毛酸浆 PPO 相对酶活力降低为 9.56%,加热 2 min,毛酸浆 PPO 相对酶活力为 0.61%,加热 3 min 毛酸浆 PPO 相对酶活力降为 0.53%。

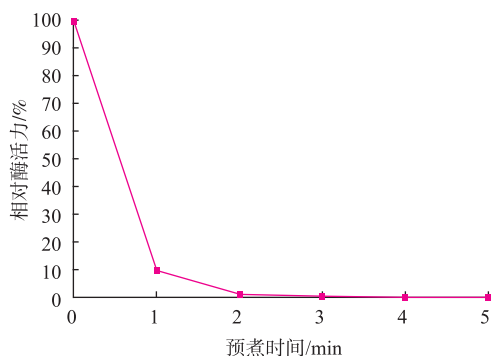


图 12 预煮时间对毛酸浆 PPO 活性的影响

Fig. 12 Effect of heat treatment on the activity of PPO from *Physalis pubescens* L.

3 结 语

毛酸浆 PPO 底物邻苯二酚的最适浓度为 0.04 mol/L,最适 pH 为 6.0,最适温度为 35 ℃,在 100 ℃ 高温条件下热处理 3 min,整果在 100 ℃ 预煮 2 min,PPO 酶活几乎完全丧失。

动力学研究表明,以邻苯二酚为底物时,底物浓度与毛酸浆 PPO 活性的关系遵循 Michealis-

Menten 的酶促动力学方程,得到米氏常数 $K_m=0.025$ mol/L,最大反应速率 $V_{max}=125$ U/min。

5 种常用的酶活抑制剂对毛酸浆 PPO 的抑制效果均随着浓度的增大而加强,抑制能力由强到弱依次为:抗坏血酸>柠檬酸>L-半胱氨酸>EDTA>亚硫酸氢钠,抗坏血酸对毛酸浆 PPO 活性的抑制效果最好,当浓度达到 0.04 mol/L 时,PPO 活性可完全得到抑制。

参考文献:

- [1] 张斯雯. 毛酸浆化学成分及其生物活性的研究[D]. 长春:吉林大学,2007.
- [2] 王璋. 食品酶学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1992.
- [3] 王曼玲,胡中立,周明全,等. 植物多酚氧化酶的研究进展[J]. 植物学通报,2005,22(2):215-222.
WANG Manling, HU Zhongli, ZHOU Mingquan, et al. Polyphenol oxidase in plants [J]. **Chinese Bulletin of Botany**, 2005, 22(2):215-222. (in Chinese)
- [4] 王红红,赵光熬. 果酒中多酚氧化酶及其性质的研究[J]. 酿酒,2000(3):84-87.
WANG Honghong, ZHAO Guangao. The study of polyphenol oxidase (PPO) in fruit wine [J]. **Liquor Making**, 2000(3):84-87. (in Chinese)
- [5] 李瑜,杨国浩,詹丽娟,等. 双孢菇中多酚氧化酶活性的影响因素[J]. 食品科学,2011,32(18):319-322.
LI Yu, YANG Guohao, ZHAN Lijuan, et al. Affecting factors of polyphenol oxidase activity in *Agaricus bisporus* [J]. **Food Science**, 2011, 32(18):319-322. (in Chinese)
- [6] 赵坚华,郑玉淑,李官浩,等. 苹果梨中多酚氧化酶抑制剂的抑制效果研究[J]. 食品科学,2010,31(2):277-279.
ZHAO Jianhua, ZHENG Yushu, LI Guanhao, et al. Single and combined inhibitory effects of inhibitors against polyphenol oxidase from pingguoli pear [J]. **Food Science**, 2010, 31(2):277-279. (in Chinese)
- [7] GAWLIK-DZIKI U, ZOTEK U, S WIECAM. Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata L.) [J]. **Food Chemistry**, 2008, 107(1):129-135.
- [8] 王银娟,许时婴,王璋. 蓝莓混汁加工中的防酶促褐变工艺[J]. 食品与生物技术学报,2006,25(3):52-57.
WANG Yinjuan, XU Shiyong, WANG Zhang. Study on anti enzymatic browning in blueberry cloudy juice processing [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25(3):52-57. (in Chinese)
- [9] 张福平,张喜春. 佛手瓜多酚氧化酶酶学特性研究[J]. 食品科学,2010,31(1):161-164.
ZHANG Fuping, ZHANG Xichun. Enzymological characterization of polyphenol oxidase from chayote fruits [J]. **Food Science**, 2010, 31(1):161-164. (in Chinese)
- [10] 刘红锦,徐为民,王静,等. 果蔬的褐变及其控制方法[J]. 食品研究与开发,2008,29(4):159-162.
LIU Hongjin, XU Weimin, WANG Jing, et al. The research progress on inhibition of fruits and vegetable enzymatic browning [J]. **Food Research and Development**, 2008, 29(4):159-162. (in Chinese)
- [11] Shang-Tzen Chang, Ting-Feng Yeh, Jyh-Horng Wu. Mechanisms for the surface colour protection of bamboo treated with chromated phosphate [J]. **Polymer Degradation and Stability**, 2001, 74:551-557.
- [12] 黄俊丽,张慙. 高温蒸汽瞬时漂烫对黑牛肝菌酶活和品质影响的研究[J]. 食品与生物技术学报,2010,29(5):653-658.
HUANG Junli, ZHANG Min. Effects of steam blanching high temperature-short time (HT-ST) on enzymes and nutrients of *Boletus aereus* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(5):653-658. (in Chinese)