

百合中多酚氧化酶的部分性质

杨颖, 王璋, 许时婴

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214036)

摘要:通过丙酮酚法从百合中提取出多酚氧化酶(PPO)的粗酶液, 以儿茶酚为底物时它有两个最适 pH, 分别为 4.0、7.0, 在 pH5.0~6.5 之间酶活力可以在 4℃保持至少 10h。PPO 的最适温度为 40℃, 从 40℃开始酶出现热失活, 热失活速度符合一级反应动力学。PPO 除对 L-酪氨酸没有活力外, 对儿茶酚、儿茶素、没食子酸均有活力, 其中对儿茶素具有最好的底物特异性。亚硫酸钠对 PPO 的抑制作用最强, 高浓度的抗坏血酸、半胱氨酸、硫脲也有很好的抑制作用, 氯化钠、氯化钙、柠檬酸的抑制作用较差。

关键词:百合, 多酚氧化酶, 酶学性质

Abstract: Crude polyphenol oxidase (PPO) was extracted from lily by the preparation of acetone powder. The enzyme activity showed two pH optima, at pH 4.0 and 7.0 with catechol as substrate, and it was stable in the pH range from 5.0 to 6.5 at 4℃ for 10h. The optimum temperature was 40℃, and the enzyme began to inactivate at 40℃. Heat inactivation of PPO followed first order kinetics. Lily PPO had activity toward catechol, catechin, and gallic acid, and activity toward L-tyrosine was not observed. The most effective inhibitor was sodium sulphite, however, ascorbic acid, L-cysteine, and thiourea were also effective inhibitors at high concentration. But NaCl, CaCl₂, and citric acid were poor inhibitors of the enzyme.

Key words: lily; polyphenol oxidase; enzymology property

中图分类号: TS201.25 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2005)09-0099-04

多酚氧化酶(PPO)广泛存在于蔬菜、水果中, 是一种含铜的酶, 在 O₂ 的参与下可以催化一元酚羟基化, 生成相应的邻-二羟基化合物, 也可以催化邻-二酚氧化, 生成邻-醌, 醌再进一步聚合或与蛋白质等作用导致褐色素的生成。在果蔬的采收、加工、储藏中由于 PPO 的作用导致了果蔬色泽以及风味的变化, 极大的影响了果蔬原料及产品的感官和营养质量, 造成了很大的经济损失, 因此人们对 PPO 性质的研究产生了极大的兴趣。

收稿日期: 2005-01-31

作者简介: 杨颖(1980-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 生物技术在食品中的应用。

百合既是高级营养品, 又是天然的保健良药, 还是一种以内养外的美容珍品。在运输、储藏、加工过程中百合极易发生酶促褐变, 造成大量原料的浪费, 并严重影响了产品质量。因此, 需要对百合中 PPO 的性质进行一定的了解以有助于百合的加工和储藏。目前人们已经研究了许多植物中 PPO 的性质, 但有关百合中 PPO 性质的报道很少。本实验对百合中 PPO 的部分性质进行了研究, 并讨论了一些常见抑制剂对百合中 PPO 的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

百合 购于无锡青山市场, 储藏于-20℃冰柜中。

1.2 PPO 的提取

将 50g-20℃的百合和 400mL-20℃的丙酮打浆 1min, 迅速抽滤, 用冷风机吹滤饼至无丙酮味, 然后将滤饼溶于 150mL pH6.5 的 0.1mol/L 的磷酸缓冲液中, 冰浴搅拌 30min, 匀浆液在 4℃左右, 10000×g (GL-20B 冷冻离心机)离心 30min, 酶保留在上清液中。

1.3 PPO 活力的测定

利用 722 型分光光度计, 以儿茶酚为底物测定 PPO 的活力。在比色杯中分别加入 0.2mol/L 醋酸缓冲液(pH4.0)0.9mL 和 20mmol/L 儿茶酚(溶于 pH4.0 的醋酸缓冲液中)2.0mL, 然后加入 0.1mL 粗酶液并鼓泡混匀, 立即在 410nm 测定吸光值的变化, 加酶的同时开始计时, 每 10s 读一次数据。空白含磷酸缓冲液 1.0mL 和儿茶酚 2.0mL。以消光值为纵坐标, 反应时间为横坐标, 作出消光-时间曲线, 从曲线最初的直线部分的斜率计算酶的活力, 以每分钟增加吸光值 0.001 的酶量为一个酶活力单位(U)。每个酶样测量三次, 取平均值。

1.4 pH 对酶活力和稳定性的影响

本实验共用两种缓冲液: 0.2mol/L 醋酸缓冲液(pH3.6~5.6)、0.2mol/L 磷酸缓冲液(pH6.0~8.0)。将儿茶酚等底物溶于不同缓冲液中配成不同 pH 的底物溶液(儿茶素为 10mmol/L、L-酪氨酸为 5mmol/L、

儿茶酚、DL-3,4-二羟基苯丙氨酸(DL-DOPA)、没食子酸的浓度为 20mmol/L,按 1.3 中酶活力的测定方法测定 PPO 的最适 pH。为测定 pH 对 PPO 稳定性的影响,先将 0.1mL 的酶液置于 1.0mL 的不同 pH 的缓冲液中,2、10h 后以 pH4.0 的底物溶液测定残存酶的活力。

1.5 温度对 PPO 活力和稳定性的影响

为测定 PPO 的最适温度,先将缓冲液和底物分别在不同的温度(10~90℃)下保温 5min,然后加入酶液测量。为测定 PPO 的热稳定性,先将 0.2mL 酶液置于毛细玻璃试管(内径 2.0mm,壁厚 0.5mm,管长 10.0cm)中,在不同的温度下保温不同时间,迅速在冰浴冷却,静置,取上清液测量残存酶的活力。测量不同温度下酶催化反应的最大速度 V_{max} ,以 $\lg(V_{max})$ 为纵坐标, $1/T$ 为横坐标作图,根据斜率由 Arrhenius 方程计算出活化能(E_a)^[1]。百合 PPO 热变性的各热力学参数的测定按 Galani 和 Aparenten 的报道^[2]。方法如下: $k=(K_B T/h)\exp(-\Delta G/RT)$,其中 $K_B=1.3806 \times 10^{-23}(\text{J}\cdot\text{K}^{-1})$ 为 Boltzman 常数, $h=6.6261 \times 10^{-34}(\text{J}\cdot\text{s})$ 为 Planck 常数, R 为通用气体常数 $8.3145\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ 。 $\Delta H=E_a-RT$ $\Delta S=(\Delta H-\Delta G)/T$

1.6 底物特异性

以儿茶酚、没食子酸、儿茶素、L-酪氨酸为底物,在各自的最适波长和最适 pH 下测定不同浓度底物下的酶活力。以 $1/\text{酶活力}$ 为纵坐标与 $1/\text{底物}$ 为横坐标作图,根据 Lineweaver-Burk 的方法得出 K_m 、 V_{max} 。根据所得的值求出底物特异性(V_{max}/K_m)。

1.7 各种抑制剂对酶活力的影响

在 0.1mL 酶液加入之前,反应体系包括 2.0mL 儿茶酚溶液(溶于 pH4.0 的醋酸缓冲液中)、0.4mL pH4.0 的 0.2mol/L 的醋酸缓冲液、0.5mL 不同浓度的抑制剂。酶加入的同时开始计时测量。

2 结果与讨论

2.1 pH 对 PPO 活力和稳定性的影响

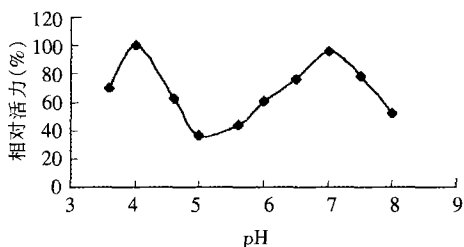


图1 以儿茶酚为底物,pH对百合PPO活力的影响

图1表示百合中的PPO有两个最适pH,分别为4.0、7.0,在pH7.0的酶活略小于在pH4.0的酶活。不同的底物会对PPO的最适pH产生影响。本实验还对PPO对于儿茶素、没食子酸、DL-DOPA的最适pH进行测量,结果表明百合中PPO对被测底物都有两

个最适pH,除儿茶素的两个最适pH分别为4.6和7.0,且在pH7.0的活力大于在pH4.6的活力外,其余几个底物的最适pH都是4.0和7.0,在pH4.0的活力大于在pH7.0的活力。产生两个最适pH的原因可能是存在多种同功酶或异构酶,具体原因有待于进一步纯化鉴定。

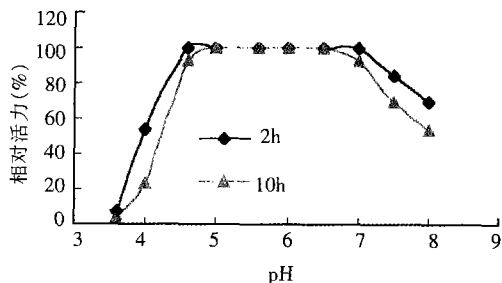


图2 以儿茶酚为底物,百合PPO的pH稳定性

图2表示PPO在pH5.0~6.5的缓冲液中比较稳定,当pH小于4.6时酶活随时间迅速下降,当pH大于7.0时酶活随时间缓慢下降。在pH4.6到pH7.0的缓冲液里,经过2h后酶活没有变化,经过10h仍能保持90%以上的初始活力。在pH3.6的缓冲液中PPO的溶解性比较低,形成许多白色的沉淀,由此估计百合PPO的等电点在pH3.6附近。薄荷中PPO在pH6.0到7.0之间且在30℃保持30min酶活力可以保留95%以上^[3]。梨中的PPO在pH3.5以下不稳定^[4]。这些结果表明PPO在酸性条件下极不稳定,在中性附近比较稳定。因此,对果蔬酸处理一定的时间可以抑制酶促褐变,若要保存酶液则需要在中性缓冲液中。

2.2 温度对 PPO 活力和稳定性的影响

图3表明,百合中PPO的最适温度为40℃,当温度低于40℃时,百合中的PPO即使在10℃,酶活力也相当于40℃时的近70%;而当温度高于40℃时,由于酶热变性,酶活力迅速下降。在10~30℃,以 $\log V_m$ 对 $1/T(K)$ 作图,由直线的斜率可得百合PPO催化底物转化成产物的活化能为 $11206.06\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。

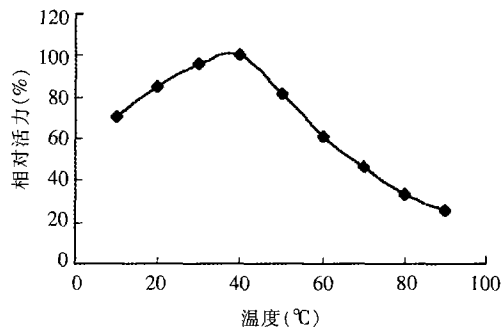


图3 以儿茶酚为底物,温度对百合PPO活力的影响

图4表明,百合中PPO在20℃和30℃保温30min酶活力没有损失,当温度为40℃时,百合中PPO开始发生变性,酶活开始下降,随温度的升高,酶变性速度加快,酶活下降的速度也随之增大,且在

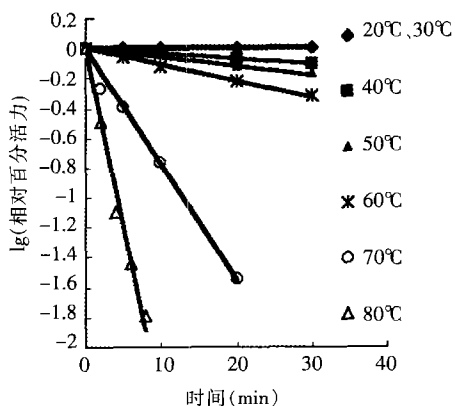


图4 以儿茶酚为底物,在不同温度下百合 PPO 的热失活
40~80℃百合中 PPO 的热失活符合一级反应动力学。当温度高于 60℃时, 酶失活的速度显著增大, 在 60、70、80℃酶活力损失 50%所需要的时间分别为 27.2、4.5、1.3min, 在 100℃仅需要 15s 酶的活力就完全丧失。

表 1 列出了百合 PPO 热失活的一些动力学参数, 其中 k 由图 4 中直线的斜率得出, 以 $\log k$ 对 $1/T$ (K) 作图可得百合 PPO 热变性的活化能 E_a 。经计算, 百合 PPO 热变性的活化能 E_a 为 100789 Jmol^{-1} , 在 40~80℃, 焓变 ΔH 的平均值为 $98029.44 \text{ Jmol}^{-1}$, 熵变 ΔS 的平均值为 $143.00 \text{ Jmol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ 。百合中的 PPO 的 ΔH 与土豆 PPO^[6] 的 ΔH 相似, 说明百合 PPO 热失活形成过渡状态时非共价键的断裂数目与土豆中的 PPO 接近。但是百合中的 PPO 热变性的 ΔG 要比土豆 PPO 的 ΔG 小很多, 原因是百合中 PPO 的 ΔS 要大于土豆中 PPO 的 ΔS , 因此, 百合 PPO 热变性过程中伴随着

过渡状态酶与溶剂的混乱度变化大, 使得 ΔG 变小。

2.3 底物特异性

PPO 对于不同的底物会显示出不同的活力, 由表 2 可知, PPO 对不同的底物有不同的最适 pH、 K_m 、 V_{max} , 其中 K_m 是酶对于不同底物的特征性常数, 可以表示酶与底物的亲和力。 V_{max} 则表示当酶的浓度不变时, 酶被底物饱和, 反应速度达到最大的状态。每一种酶的最适底物取决于两个因素: 强的底物结合能力, 即低 K_m , 和高的催化效率, 即高 V_{max} (对于特定的酶的浓度)。因此, 最适底物的标准是 V_{max}/K_m ^[6]。在几个被测底物中, PPO 对没食子酸的亲和力虽然最高, 但催化效率却最低。PPO 对儿茶酚有最高的催化效率, 但亲和力却最低。PPO 对儿茶素的亲和力和催化效率虽然介于两者之间, 但却有着最高的 V_{max}/K_m , 因此, 儿茶素是百合 PPO 的最适底物。实验中没有检测出 PPO 对 L-酪氨酸的催化活力, 因此, 百合中的 PPO 对二元酚有催化能力, 对一元酚没有催化能力。

2.4 各种抑制剂对酶活力的影响

表 3 表明各种抑制剂对 PPO 作用的大小, 在所测量的这些抑制剂中亚硫酸钠具有最强的抑制效果。亚硫酸钠是一种还原剂, 能不可逆地与醌生成无色的加成产物, 同时降低了酶作用于一元酚和二羟基酚的活力^[7]。硫脲、半胱氨酸、抗坏血酸在测量过程中有一个滞后期, 它们在低浓度时抑制效果较差, 但高浓度时具有显著的抑制效果。硫脲主要是与铜离子

表 1 百合中 PPO 热失活的动力学参数

温度(℃)	$k \times 10^4 (\text{s}^{-1})$	$\Delta H (\text{Jmol}^{-1})$	$\Delta G (\text{Jmol}^{-1})$	$\Delta S (\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1})$
40	1.31	98195.72	52115.41	147.22
50	2.26	98112.58	52400.36	141.52
60	4.18	98029.44	52404.48	137.01
70	29.79	97946.30	48461.95	144.27
80	90.85	97863.16	46686.57	144.98

表 2 百合中 PPO 对各种底物的不同参数

底物	最适 pH	$V_{max} (\text{U/mL min})$	$K_m (\text{mmol/L})$	V_{max}/K_m
儿茶酚	4.0	1428.57	3.43	416.49
儿茶素	7.0	769.23	2.15	666.67
没食子酸	4.0	496.19	2.05	232.29

注: 表格中的最适 pH 为百合中 PPO 对不同底物的两个最适 pH 中活力较大的一个。

表 3 抑制剂对百合 PPO 活力的影响

抑制剂	硫脲	半胱氨酸	抗坏血酸	苯甲酸	亚硫酸钠	氯化钠	氯化钙	柠檬酸
浓度	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
(mmol/L)	1.0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
	0.00	3.45	0.00	13.79	0.00	34.48	20.69	65.52
百分残	3.10	6.90	3.45	55.17	0.00	68.97	58.62	75.86
存活力	62.07	58.62	55.17	75.86	0.00	86.21	82.76	82.76

注: 表格中的浓度为反应体系的最终浓度。

(下转第 104 页)

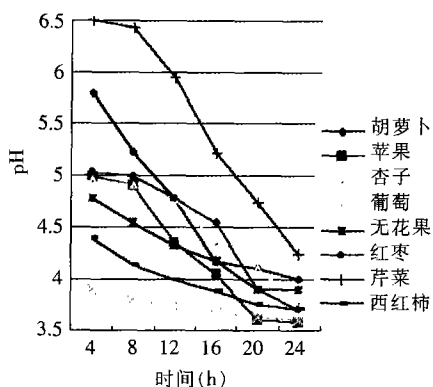


图6 果蔬汁乳酸发酵产酸曲线

萝卜和芹菜中的碳水化合物也可被 S_1 利用, 使其酸度升高, 最终 pH 均在 4 以上, 品尝酸味略淡。因 S_1 利用蔗糖产乳酸, 可通过添加蔗糖达到预定的酸度, 其他果蔬乳酸饮料也可如此来控制合适的糖酸比。

3 结论

3.1 从酸菜汁中分离筛选一株乳酸菌 S_1 , 经初步鉴定为嗜酸乳杆菌。

3.2 S_1 能在较宽的温度范围和 pH 范围生长, 适应性强。

3.3 S_1 在多种果蔬汁中都能生长产酸, 在 24h 内降酸明显, 风味纯正, 无异杂味, 且对胡萝卜的熟萝卜味、红枣的涩味等不良气味有显著的去除作用, 说明所筛菌株 S_1 对各种果蔬原料的适应性强, 是一株优良的乳酸饮料发酵菌种。

参考文献:

- [1] Yali Friedman. Lactic Acid Bacteria Food Preservatives[J]. System Appl Microbiol, 1996, 33(1): 468~474.
- [2] 顾瑞霞, 谢继志. 乳酸菌与人体健康[M]. 北京: 科学出版社, 1995. 1~5.
- [3] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. 85~86.
- [4] 沈萍, 范秀荣, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. 26~116.
- [5] R E 布坎南, N E 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [6] 天津轻工业学院. 工业发酵分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 197~220.
- [7] 夏晓明, 彭振山主编. 饮料[M]. 化学工业出版社, 2001. 85~186.

(上接第 101 页)

子作用而影响酶的活性。半胱氨酸的作用机理是酚氧化生成的醌不与其他醌类、氨基酸和蛋白质聚合生成有色物质, 而直接与半胱氨酸结合形成了一种新的无色产物。抗坏血酸既可以作为醌的还原剂, 又可以作为酶分子中铜离子的螯合剂, 甚至可以被 PPO 直接氧化, 从而具有一定的防止褐变的效果^[7]。实验中抗坏血酸表现出来的滞后期主要是将醌还原, 当抗坏血酸被消耗尽后, PPO 的活力才表现出来。据报道, 抗坏血酸可以使 PPO 不可逆失活^[8], 因此高浓度的抗坏血酸有很好的抑制效果。而氯化钠、氯化钙、柠檬酸的抑制效果随浓度的增加而增大, 但明显小于上述几种抑制剂。氯化钠、氯化钙的作用主要是将介质中的氧气排除出去, 柠檬酸主要是降低缓冲液的 pH, 由于本实验中反应体系的离子强度比较大, 缓冲能力比较强, 因此在本实验中柠檬酸的抑制效果不是很明显。综上所述, 在百合食品的加工中利用合适浓度的半胱氨酸、抗坏血酸来抑制 PPO 的活性不失为一个好方法。

参考文献:

- [1] Segel I H. Biochemical calculations[M]. New York: John Wiley Sons, 1976. 273.

- [2] Galani D, Apenten R K O. The comparative heat stability of bovine β -lactoglobulin in buffer and complex media[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1997, 74: 89~98.
- [3] Demet Kavrayan, Tulin Aydemir. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*) [J]. Food Chemistry, 2001, 74: 147~154.
- [4] Rivas N J, Whitaker J R. Purification and some properties of two polyphenol oxidase from Bartlett pears [J]. Plant Physiology, 1973, 52: 501~507.
- [5] Kiattisak Duangmal, Richard K, Owusu Apenten. A comparative study of polyphenol oxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano)[J]. Food Chemistry, 1999, 64: 351~359.
- [6] Palmer T. Kinetics of single-substrate enzyme catalysed reactions. In Understanding Enzymes, 4th[M]. Prentice Hall/Ellis Horwood: Hertfordshire, 1995. 107~127.
- [7] 王璋. 食品酶学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1991. 268.
- [8] Golan A, Goldhirsh A, Whitaker J R. Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1984, 32: 1003~1009.