

金帅苹果多酚氧化酶提取 及 部分酶学特性研究

付聿成, 王妮娅, 杜金华*

(山东农业大学食品科学与工程学院, 山东泰安 271018)

摘要:实验确定了从金帅苹果中提取多酚氧化酶(PPO)的最佳条件,研究了该酶的某些特性。确定 pH7.4 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(含 2%的 PVPP 和 0.25% Triton X100)料液比 1.6mL/g 为最优提取参数。金帅苹果 PPO 酶促反应产物在 412nm 下有最大吸收峰;以邻苯二酚为底物的酶促反应的米氏常数为 $K_m=2.6667 \times 10^{-3} \text{mol/L}$, PPO 动力学方程为 $V = \frac{3333.33[S]}{0.027+[S]}$;该 PPO 的最适 pH 为 5.0,在 pH5.0~6.8 范围内有较高的稳定性;最适温度为 40℃。

关键词:苹果,金帅,多酚氧化酶,提取,特性

Abstract:Experiments were performed to optimize the extraction conditions for polyphenoloxidase (PPO) in "Golden Delicious" apple fruit. Some enzymatic characteristics of PPO were also studied. The most efficient extraction was obtained by using the 1.6mL/g (sodium phosphate buffer/apple fruit) sodium phosphate buffer (0.05mol/L, pH7.4) plus 2% PVPP and 0.25% Triton X100. The absorptive wavelength of enzymatic reactive product was 412nm. When catechol as the substrate, the kinetic equation of PPO was $V = \frac{3333.33[S]}{0.027+[S]}$ and its K_m was $2.6667 \times 10^{-3} \text{mol/L}$. The optimal pH value of PPO was 5.0 and the optimal reaction temperature of PPO was 40℃. Within pH value range from 5.0 to 6.8, the PPO exhibited a higher stability.

Key words:apple; Golden Delicious; polyphenoloxidase (PPO); extraction; characteristics

中图分类号: TS201.2*5 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2006)02-0059-04

苹果属于蔷薇科苹果属,是世界四大水果之一。2004年我国苹果总产量 2000 多万 t, 接近世界总产量的 50%。苹果深加工是苹果产业增产创收的重要途径。金帅、国光等以其果实质优、偏酸为苹果加工企业的首选,金帅更是种植面积广、品质良好的鲜

食、加工兼用品种。对于苹果产品而言,生产、流通过程中的防褐问题是加工工艺的关键之一。PPO 是导致苹果(产品)褐变的主要因素,研究金帅苹果 PPO 特性对于确定、改进苹果加工工艺,有效的控制酶促褐变、研究褐变机理是必需的。本文经实验确定了金帅苹果 PPO 最佳提取条件,并研究了部分酶学特性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

金帅苹果 泰安市果品批发市场购得优质金帅苹果供实验用,破碎榨汁后参照果汁通用试验方法^[1]测定理化指标如下:滴定酸为 0.256g/100mL (以苹果酸计),pH 为 3.98,可溶性固形物含量为 12.8°Brix (折光法),磷酸氢二钠,柠檬酸,PVPP(聚乙烯吡咯烷酮),Triton X100,邻苯二酚。

HAICHU 果蔬破碎机,80-2 型离心沉淀机, TGL-16G-A 冷冻离心机,GB204 型全自动分析天平,UV-2100 型分光光度计,UV-2450 型紫外分光光度计,超级恒温水浴,冰箱。

1.2 PPO 提取及酶活测定

1.2.1 PPO 提取 将已预冷的苹果样品破碎,加入已预冷的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(含适量的 PVPP 和 Triton X100),在果蔬破碎机中以 1min 为间隔打浆 3min,然后 4000r/min 离心 10min,取上清液 0℃提取 30min 后再在 4℃离心 30min (13200r/min),得到上清液即为 PPO 粗酶液。

1.2.2 酶活的测定 使用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制邻苯二酚为反应底物,将 0.2mL 粗酶液加入到 2.8mL 底物溶液中,在最大吸收波长下比色,酶液加入后开始计时,每 30s 记录一次吸收值。在测定条件下,吸收值变化 0.001 个单位定义为一个酶活。活性曲线的直线部分作为时间函数来衡量酶活。酶活

收稿日期: 2005-04-12 * 通讯联系人

作者简介:付聿成(1981-),男,在读硕士。

与粗酶液中的蛋白质含量相比即得酶比活力。

1.3 蛋白质测定

考马斯亮蓝法。以牛血清白蛋白做测定的标准蛋白质。

1.4 提取参数的确定

1.4.1 PVPP 使用量 使用 pH 为 6.6 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液作为提取液 (料液比为 2.0mL/g 0.25% Triton X100), 分别使用 1%、2%、3%、4% 的 PVPP, 提取物于 0℃ 放置 24h 后在 420nm 下测定吸光度, 并观察澄清情况, 选出最适 PVPP 量。

1.4.2 料液比 使用 pH 为 6.6 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液为提取液, 添加 2% PVPP 和 0.25% Triton X100, 以不同料液比 (1.0、1.3、1.6、1.9、2.2、2.5 mL/g) 提取 PPO 后, 室温下测定酶活 (420nm), 优选最佳料液比。

1.4.3 pH 对提取的影响 以 0.4 为间隔分别配制 pH 为 5.0~7.8 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 使用上述提取条件进行苹果 PPO 提取, 室温下测定酶活 (420nm)。

1.5 PPO 部分酶学性质

1.5.1 酶反应产物吸收曲线扫描 2.8mL 邻苯二酚溶液与 0.2mL 粗酶液在室温下反应 30min 后, 使用 UV-2450 型紫外分光光度计在 300~700nm 下进行吸收曲线扫描。

1.5.2 pH 对 PPO 活性及稳定性影响 2.8mL 不同 pH 的 0.05mol/L 邻苯二酚溶液 (以 0.6 为间隔, 分别使用 pH2.6~8.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制) 与 0.2mL 粗酶液在室温下反应, 412nm 下测定 PPO 活力。分别吸取 0.2mL 粗酶液, 加在 0.4mL 不同 pH 的缓冲液中于室温下放置 30min, 然后将此 PPO 粗酶液与 2.4mL 0.05mol/L 的邻苯二酚溶液 (pH5.0) 于室温下反应, 测定 PPO 的残留活力。以 pH5.0 下酶活力为对照, 计算相对酶活。

1.5.3 温度对 PPO 活性及稳定性的影响 预先将 2.8mL 0.05mol/L 的邻苯二酚溶液 (pH5.0) 在 20、25、30、35、40、45、50、55℃ 下保温, 然后加入 0.2mL 粗酶液, 412nm 下测定其活力。将粗酶液在 40、50、60、70、80℃ 下保温 30min 后立即在冰浴中冷却 5min。0.2mL 粗酶液与 2.8mL 0.05mol/L 邻苯二酚溶液 (pH5.0) 在最适温度下测定 PPO 残留活力。以 40℃ 下酶活性为对照, 计算 PPO 经热处理后的相对酶活性。

1.5.4 底物浓度对 PPO 活性的影响 使用 pH5.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液分别配制 0.01、0.03、0.05、0.07、0.09、0.11mol/L 邻苯二酚溶液, 40℃ 下研究底物浓度对 PPO 活性的影响。

以上实验结果均取 3 次平行实验的平均值。

2 结果与讨论

2.1 提取参数的确定

2.1.1 PVPP 使用量的确定 提取液中分别使用 1%、2%、3%、4% 的 PVPP, 粗酶液在 0℃ 下放置 24h 后在 420nm 下测定吸光度 (如表 1) 并观察澄清情况。

表 1 PVPP 使用量对 PPO 提取的影响

PVPP 使用量 (%)	1	2	3	4
粗酶液吸光度	0.470	0.421	0.442	0.418

即使是同一种水果的不同品种、同一水果不同部位所含的酚类物质的种类和数量也不同。因此在 PPO 提取过程中没有一种相同的方法来有效地去除酚类化合物, 避免褐变的发生。Rocha 等^[3]研究表明, 提取红星苹果 PPO 时, 不溶性 PVPP 提取效率比可溶性 PVP 高。由表 1 可以看出, 使用 2% 的 PVPP 即可有效地防止由于底物的自动氧化引起的褐变, 并且在 0℃ 下放置 24h 后粗酶液仍能保持澄清。因此, 后续实验中 PVPP 的使用量为 2%。

2.1.2 料液比 以不同料液比提取 PPO 后, 室温下测定酶活, 结果如图 1。

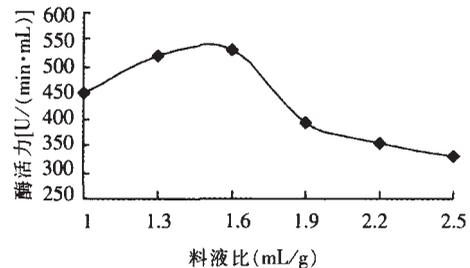


图 1 料液比对 PPO 提取的影响

金帅苹果 PPO 最适的提取比例为 1.6。减少提取液使用量酶活降低是由于 PPO 不能完全溶解出来; 提取比例高于 1.6 也不能引起酶活升高, 可能是由于 PPO 浓度降低所致。Rocha 等^[2]还认为, 较高的料液比会增加均质和酶溶解难度, 他们提取红乔纳金苹果 PPO 时最佳料液比为 1.7。

2.1.3 提取 pH 不同 pH 提取液提得的 PPO 活力 (室温下) 如图 2 所示。由于酚类底物在高 pH 下易发生自动氧化引起非酶褐变^[5], 因此提取液的 pH 只试验到 7.8。不同 pH 提取得到的粗酶液的活力曲线有两个峰值 5.4 和 7.4, pH5.4 处的酶活力要比 pH7.4

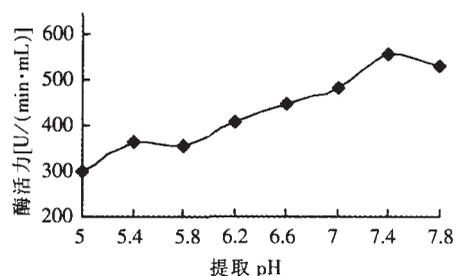


图 2 提取液 pH 对 PPO 提取的影响

处的酶活力低的多。因此,确定金帅苹果 PPO 提取的最佳 pH 为 7.4。Shannon 等^[6]从 cv.Rome Beauty, Winesap 和 Cortland 苹果中提取 PPO 的 pH 也有两个峰值 5.2 和 7.3,最适提取 pH 为 5.2。杨萌^[7]提取高灌蓝越橘 PPO 的最适 pH 也在 7.4。Rocha 等^[2]试验红乔纳金苹果 PPO 提取时的最佳 pH 为 7.5。刘振宇等^[8]在提取羊栖菜 PPO 时缓冲液的 pH 为 7.2。

2.1.4 最佳提取条件的确定 由上,确定金帅苹果 PPO 最优提取参数 pH7.4 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(含 2% 的 PVPP 和 0.25% TritonX100),按 1.6mL/g 比例进行提取。

2.2 酶促反应产物吸收曲线扫描

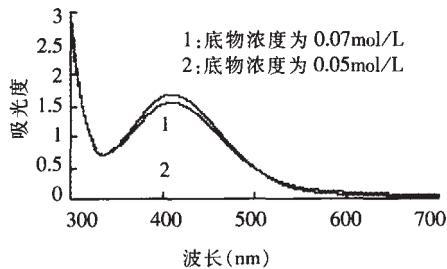


图3 反应产物吸收曲线

曲线 1、2 的底物浓度分别为 0.07mol/L 和 0.05mol/L。反应产物在 300~700nm 下的吸光度如图 3 所示,可见在 412nm 下有最大吸收峰。因此,在后续实验中采用 412nm 为工作波长。

2.3 pH 对 PPO 活性及稳定性的影响

室温下测定不同 pH 下 PPO 活力,并测得粗酶液的蛋白质含量,计算酶比活力如图 4。

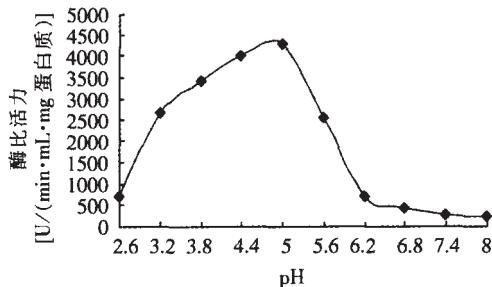


图4 pH 对金帅苹果 PPO 酶比活力的影响

图 4 所示,PPO 活性随 pH 变化较为敏感,在 pH5.0 处有最大酶活。pH2.6~5.0 时酶活上升较迅速,pH5.0~6.2 时酶活急剧下降,pH6.2~8.0 时酶活很低,变化不大。Mayer 等^[9]报道苹果 PPO 有两个最适 pH:从叶绿体中提取的最适 pH 在 5.1,从线粒体提取的最适 pH 在 7.3,他们还发现 TritonX100 更利于 PPO 从叶绿体中分离。本实验 PPO 从整个果实中提取,从最适 pH 来看大部分 PPO 来源于叶绿体,混有少量线粒体中的酶。以往大多数研究显示,整个苹果的 PPO 在 pH4.5~5.5 有最大活力,并且 PPO 的耐酸性较强。

金帅苹果 PPO 的 pH 稳定曲线如图 5 所示,该酶在 pH6.2 时最稳定,室温下在此 pH 放置 30min 后仍有 82.96% 的酶活。在 pH5.0~6.8 之间该酶较稳定,在此 pH 范围室温下放置 30min 后仍保存有 71.72% 以上的酶活。酸性条件下,pH2.2~3.2 之间酶活下降迅速、稳定性很差,pH2.2 时只有 1.08% 的酶活力。因为 PPO 是一种含铜的蛋白质^[10],当 pH 较低时,一方面酶中的铜被解离出来,使酶失活;另一方面 pH 较低,蛋白质变性也使酶失活。碱性条件下(pH7.4~8.0)该酶稳定性较差,碱性环境中铜与酶蛋白结合生成不溶性 $\text{Cu}(\text{OH})_2$,也会使酶失活。因此,加工过程中通过调整 pH 来钝化酶活,减少褐变发生。

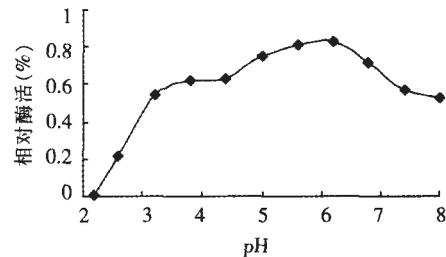


图5 金帅苹果 PPO 的 pH 稳定曲线

2.4 温度对 PPO 活性及稳定性的影响

pH5.0 下测定不同温度下 PPO 活力,并测得粗酶液的蛋白质含量,计算酶比活力如图 6。

温度对酶促反应的影响通常包括两个方面:一方面是当温度升高时反应速度加快;另一方面,随着温度升高而使酶蛋白逐渐变性,反应速度随之下降。因此,酶促反应存在一个最适温度,最适温度是上述两个方面平衡的结果。本实验中在 20~40℃ 时随着温度的升高 PPO 酶比活力逐渐增大,温度对 PPO 酶促

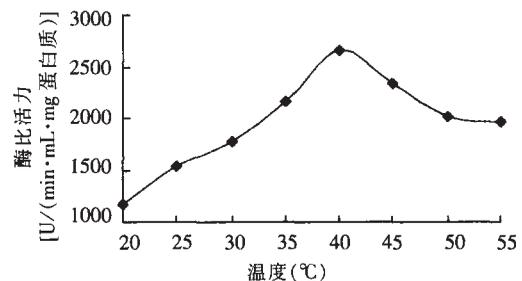


图6 温度对金帅苹果 PPO 酶比活力的影响

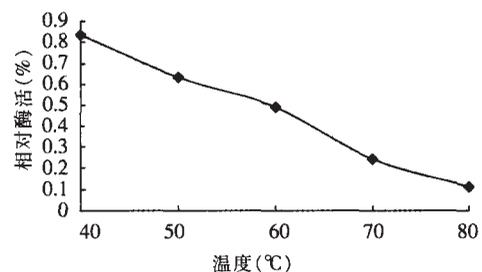


图7 金帅苹果 PPO 的热稳定曲线

反应的加快起主导作用,40℃为金帅苹果 PPO 的最适温度。40~55℃范围内,随温度的上升,高温对酶蛋白的破坏作用占主导作用,PPO 活力呈下降趋势。从整个曲线来看,35~45℃范围内酶活力较高,褐变发生迅速。

图 7 为金帅苹果 PPO 的热稳定曲线:随着温度的升高,热对酶的破坏作用加大。在 40℃保温 30min 后残余酶活为 83.52%,到 80℃保温 30min 后残余酶活只有 11.08%。因此果蔬加工中经常通过迅速加热物料来钝化酶活,减轻褐变。

2.5 底物浓度对金帅苹果 PPO 活性的影响

以邻苯二酚为底物,根据中间复合物学说,催化反应可表示为: $E+S \rightleftharpoons ES \rightarrow P+E$, 米氏方程 $V = \frac{V_m[S]}{K_m+[S]}$, 即 $\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$ 。根据实验数据用

LineweaverBurk 作图法,以 $\frac{1}{V}$ 为纵坐标,以 $\frac{1}{[S]}$ 为横坐标,求得 $\frac{1}{V}$ 与 $\frac{1}{[S]}$ 的直线回归方程为 $\frac{1}{V} = 8.0000 \times 10^{-6} \cdot$

$\frac{1}{[S]} + 0.0003$, 相关系数为 $R=0.9976$ 。因而得出, $V_m = 3333.33 \text{ u}$, $K_m = 2.6667 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 。以邻苯二酚为底物的 PPO 动力学方程为: $V = \frac{3333.33[S]}{0.027+[S]}$ 。

3 结论

3.1 金帅苹果 PPO 最优提取参数 pH7.4 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(含 2% 的 PVPP 和 0.25% TritonX100)按 1.6mL/g 比例进行提取。

3.2 金帅苹果 PPO 酶促反应产物在 412nm 下有最大吸收峰,以邻苯二酚为底物的酶促反应的米氏常数为 $K_m = 2.6667 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$, PPO 动力学方程为: $V = \frac{3333.33[S]}{0.027+[S]}$, 该 PPO 的最适 pH 为 5.0, 在 pH5.0~6.8

(上接第 58 页)

结果经统计学软件 SPSS11.0 进行分析得出,影响 hs-3 菌株发酵产胞外多糖的显著性因素为接种量和初始葡萄糖浓度,适宜的发酵工艺条件为接种量为 4.5×10^5 个/mL,初始葡萄糖浓度为 95mmol/L,发酵培养温度 39℃,初始 pH 为 5.0,并经过验证。

参考文献:

- [1] De Vuyst L et al. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria[J]. *Int Dairy J*, 2001(11):687~707.
- [2] Toba T, Uemura, Mukai T, Fuji T, Itoh T, Adachi S. A new fermented milk using capsular polysaccharide-producing *Lactobacillus* isolated from kefir grains[J]. *J Dairy Res*, 1991, 58:497.
- [3] Patricia Russ-Madiedo, Jeroen Hugenholtz, Pietermetia Zoon. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria[J]. *International Dairy Journal*,

范围内有较高的稳定性,最适温度为 40℃。

参考文献:

- [1] 中国标准出版社第一编辑室编. 中国食品工业标准汇编(上)[M]. 北京:中国标准出版社, 2001.339~346.
- [2] A M C N Rocha et al. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from 'Jonagored' apple[J]. *Food Control* Mar, 2001, 12(2):85~90.
- [3] A M C N Rocha et al. Characterisation of 'starking' apple polyphenoloxidase [J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 1998, 77(4):527~534.
- [4] Galeazzi M A M, Sgarbieri V C J. Substrate specificity and inhibition of polyphenoloxidase from a dwarf variety of banana (*Musa Cavendishii*, L)[J]. *Journal of Food Science*, 1981, 46:1404~1406.
- [5] Vamos-Vigyazo L, Gajzago I. Substrate specificity of the enzymic browning of apples[J]. *Acta Alimentaria*, 1978(7):79~90.
- [6] Shannon C T, Pratt D E. Apple polyphenoloxidase activity in relation to various phenolic compounds[J]. *Journal of Food Science*, 1967, 32:479~483.
- [7] 杨萌, B Rovel, M Metche. 高灌蓝越橘多酚氧化酶的提取和纯化[J]. *无锡轻工大学学报*, 1998(3):54~57.
- [8] 刘振宇, 吴祖建, 林奇英. 羊栖菜多酚氧化酶特性[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2004, 33(1):56~59.
- [9] Mayer A M, Harel E. Polyphenoloxidases in fruits - changes during ripening. In Rhodes, Friend, Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables [M]. New York: Academic Press, 1981.160~171.
- [10] 2002(12):163~171.
- [4] Kitazawa H, Yamaguchi T, Itoh T. B-cell mitogenic activity of slime products produced from slime-forming encapsulated *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* [J]. *Journal of Dairy Science*, 1992, 75:2946~2951.
- [5] Forsen R, Heiska E, Arvilommi H. Immunobiological effects of *Streptococcus cremoritis* from cultured milk "viiili" application of human lymphocyte culture techniques [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1987(5):41~47.
- [6] Kitazawa H, Yamaguchi T, Miura M, Saito T, Itoh H. B-cell mitogen produced by slime-forming encapsulated *Lactococcus lactis* ssp *Cremoris* isolated from ropy sour milk, viili[J]. *J Dairy Sci*, 1993, 76:1514~1519.
- [7] Nakajina H, Hirota T, Toba T, Itoh T, Adachi S. Structure of the extracellular polysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subsp[J]. *Cremotis SBT0495 Carbohydr Res*, 1992, 224:245~253.
- [8] 骆承庠, 等. 乳与乳制品工艺学[M]. 北京:农业出版社, 1999.