

一种多酚氧化酶提取新方法与几种常规方法的比较研究

毕云枫, 姜仁凤, 刘薇薇, 李彦阳, 沈明浩* (吉林农业大学食品质量与安全实验室, 吉林长春 130118)

摘要 [目的] 对一种新的多酚氧化酶的提取方法与几种常用提取方法的综合效果进行比较。[方法] 以苹果梨为研究对象, 对匀浆法、匀浆吸附法、匀浆后丙酮抽提法、丙酮粉法、丙酮抽提后吸附法这 5 种多酚氧化酶提取方法所得酶液进行了多酚类化合物残余、总酶活及酶的稳定性比较。同时, 还对几种氨基酸对酪氨酸酶的抑制情况进行了检测。[结果] 试验得出, 以改进的丙酮抽提后吸附法所得酶液多酚残余少, 总活力保持良好, 为几种方法中最佳的提取方法。谷胱甘肽、谷氨酰胺、半胱氨酸、谷氨酸对酪氨酸酶的活力均有抑制作用, 其 IC_{50} 值分别为 (0.48 ± 0.028) 、 (0.59 ± 0.032) 、 (0.37 ± 0.016) 和 (1.87 ± 0.087) mmol/L。[结论] 研究可为多酚氧化酶的相关研究提供参考。

关键词 多酚氧化酶; 提取方法; 总活力; 稳定性

中图分类号 S188+.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)22-09418-03

Study on A New Method for Extracting Polyphenol Oxidase Compared with Conventional Methods

BI Yun-feng et al (Food Quality and Safety Laboratory, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract [Objective] A new method for extracting polyphenol oxidase was compared with several conventional methods. [Method] Using homogenization method, homogenization adsorption method, homogenization post-acetone extraction method, acetone powder method, acetone extraction post-adsorption method to have extraction of polyphenol oxidase from *Pyrus bretschneideri* Rehder. And the results of absorbency, total activity and stability were compared. [Results] The results showed that acetone extraction post-adsorption method was the best in the five methods. The enzyme solution obtained by acetone extraction post-adsorption method was the remain of polyphenolic compounds were little and maintaining good the total activity of polyphenol oxidase. Glutathione, glutamine, cysteine and glutamate on each polyphenol oxidase activity were the inhibitory effects. The IC_{50} of 4 kinds of amino acids were (0.48 ± 0.028) , (0.59 ± 0.032) , (0.37 ± 0.016) and (1.87 ± 0.087) mmol/L, respectively. [Conclusion] The study can provide reference for relevant research of polyphenol oxidase.

Key words Polyphenol oxidase; Extraction method; Total activity; Stability

在水果、蔬菜的采摘、运输、储藏、加工处理等过程中均会发生褐变, 使其颜色、味道、质量、营养价值改变^[1-3], 造成了很大的经济损失。引起果蔬褐变的主要原因是多酚氧化酶的作用。多酚氧化酶 (EC 1.10.3.1 和 EC 1.11.1.1, PPO) 是一种铜依赖酶, 催化单酚类羟基化为二元酚, 再催化二元酚为相应的醌类^[4]。醌类是较强的亲电子分子, 可以聚合为黑色或棕色的色素^[5]。PPO 在大多数果蔬中存在。果蔬在剥皮、切片、擦伤, 或是病变组织接触氧气后非常容易发生褐变。使用电子和荧光显微镜观测到果蔬被切开, 细胞结构被破坏导致 PPO 酶和它的酚类底物的释放^[6]。许多水果和蔬菜的质量受该生物学反应影响, 产生异味、变色、营养价值降低。因此, 对这些果蔬的褐变进行抑制, 保持果蔬的色泽、质量、提高储藏时间成为人们关注的重点。不管是对果蔬中 PPO 进行性质、抑制剂的研究, 还是对生理功能、基因克隆等方面的研究, 都需要将多酚氧化酶从物体中分离纯化出来。PPO 的常用提取方法有许多种, 包括匀浆法、匀浆吸附法、匀浆后丙酮抽提法及丙酮粉法。但这些方法多酚类残余比较多, 残留的酚类会与底物竞争性的与酶结合, 影响多酚氧化酶活测定的准确性。笔者在这些方法的基础上, 创建了一种新的多酚氧化酶的提取方法——丙酮抽提后吸附法。以苹果梨为目标, 对新方法与几种常用方法的多酚类化合物残余、总酶活及酶的稳定性进行了比较, 还对几种氨基酸对

酪氨酸酶的抑制情况进行了检测, 希望对 PPO 的相关研究有所帮助。

1 材料与方法

1.1 材料 苹果梨, 购自延吉市水果批发市场。丙酮, 国产分析纯; PVPP (聚乙烯吡咯烷酮)、邻苯二酚, 美国 SIGMA 公司; 谷胱甘肽、谷氨酰胺、半胱氨酸、谷氨酸, 日本 TCI 公司。所用紫外分光光度计为岛津 UV-1800, 日本岛津公司。

1.2 方法

1.2.1 多酚氧化酶的提取。

1.2.1.1 匀浆法。 30 g 样品加 4 ℃ 预冷的磷酸缓冲液 (pH 7.3) 40 ml, 匀浆、搅拌、静置, 反复几次, 4 ℃ 下 15 000 r/min 离心 15 min, 取上清液于 4 ℃ 冰箱保存备用^[7-8]。

1.2.1.2 匀浆吸附法。 30 g 样品加 4 ℃ 预冷的含 2% 的 PVPP 的磷酸缓冲液 (pH 7.3) 40 ml, 匀浆, 搅拌 0.5 h, 静置, 反复几次, 4 ℃ 下 15 000 r/min 离心 15 min。取上清液于 4 ℃ 冰箱保存备用^[9]。

1.2.1.3 匀浆后丙酮抽提法。 30 g 水果用匀浆法提取的粗酶液缓慢加入 2.5 倍体积的冷冻丙酮 (-20 ℃), 4 ℃ 下 15 000 r/min 离心 15 min, 将沉淀物溶于 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.3) 40 ml 中, 再次离心, 取上清液于 4 ℃ 冰箱保存备用^[10]。

1.2.1.4 丙酮粉法。 30 g 样品加入 40 ml 冷冻的丙酮 (-20 ℃) 匀浆。所得的匀浆用布氏漏斗垫滤纸抽滤, 滤饼再用冷冻丙酮多次提取、抽滤至无色, 得到粗酶粉末, 将粉末放入通风橱中通风处理, 除去丙酮之后, 干粉以 1:8 (W:V) 的比例溶于 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.3), 搅拌 10 min, 在 4 ℃ 下 15 000 r/min 离心 15 min, 取上清液于 4 ℃ 冰

基金项目 吉林省科技厅项目 (20090553); 吉林省教育厅项目 (吉教科合字 [2011] 第 35 号)。

作者简介 毕云枫 (1976-), 男, 吉林白城人, 讲师, 博士, 从事酶学及酶分子生物学研究, E-mail: Yunfeng5609@sohu.com。* 通讯作者。

收稿日期 2013-06-24

箱保存备用^[11-12]。

1.2.1.5 丙酮抽提后吸附法。30 g 样品按匀浆后丙酮抽提法所得的沉淀物在 4 ℃ 下再加入含 2% 的 PVPP 的磷酸缓冲液 (pH 7.3) 40 ml, 搅拌 0.5 h, 静置, 反复几次, 在 4 ℃ 下 15 000 r/min 离心 15 min, 取上清液于 4 ℃ 冰箱保存备用。

各提取方法均平行做 3 次, 所得酶液用 PEG2000 浓缩至 20 ml 于 4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 酶的紫外吸光度测定。将各提取方法得到的酶用磷酸缓冲液 (pH 7.3) 定容至相同的体积后在波长 420 nm 处测定吸光度。

1.2.3 酶的总活力测定。酶活力测定以邻苯二酚为底物, 用紫外分光光度计测定波长 420 nm 下的酶促反应液的吸光度变化, 酶活力单位定义为单位时间 (min), 单位体积 (ml) 的酶反应液引起的 0.01 OD 的吸光度变化。计算各提取方法所得酶液的总活力。

1.2.4 酶的稳定性测定。各提取方法所得酶液浓缩后立即测定活力, 然后放置室温每隔 1 d 测定残余活力。

1.2.5 抑制剂对酶活力的影响。0、0.1、0.5、1.0、2.0、5.0 mmol/L 的谷胱甘肽、谷氨酰胺、半胱氨酸、谷氨酸加入丙酮抽提后吸附法所得酶液混合 2 min 后, 加入底物邻苯二酚开始反应。每个浓度做 3 个平行样品。

2 结果与分析

2.1 酶的紫外吸光度百分比 酶液的吸光度反映了提取酶液的纯度和酶液中多酚类物质的剩余程度^[13]。几种提取方法所得的粗酶液的紫外吸光度比值见图 1, 以匀浆法吸光度最高, 以其为 100%, 则匀浆吸附法为 70.23%, 而匀浆后丙酮吸附法、丙酮粉法、丙酮抽提后吸附法的吸光度分别为匀浆法的 35.13%、10.17%、11.22%。各提取物中的吸光物质为苹果梨中所含的多酚类物质以及在提取过程中 PPO 催化这些多酚类的氧化产物。由此可见, 匀浆法最为简单, 但其中所残余的多酚类及其催化产物最多。PVPP 虽然是很好的多酚类吸附剂, 但仍然不能吸附完全; 丙酮由于不能溶解 PPO 但能很好地溶解多酚类及其产物, 所以能很好地去除酚类成分。所以匀浆后丙酮抽提法多酚类残余比较少, 只有匀浆法的 35.13%。丙酮粉法经丙酮多次提取, 吸光度比较低, 多酚类残余最少。而丙酮抽提后吸附法吸光度只比丙酮粉法高 1%, 其残余的酚类也非常少。

2.2 各酶液的总活力百分比 图 2 为各种提取方法的总酶活力百分比, 其中以匀浆法 (100%) 的总活力最高, 匀浆吸附法为 98.61%, 匀浆后丙酮抽提法为 94.46%, 丙酮粉法为 51.58%, 丙酮抽提后吸附法为 89.47%。其中以丙酮粉法得到的酶的总活力降低最多, 接近一半。而其他 3 种方法提得的酶的总活力降低的很少, 丙酮抽提后吸附法仅仅降低了近 10%, 活力保持的很好。有报道证明, 丙酮粉法所提酶的酶学性质发生改变, 并且活力降低^[14]。而匀浆后吸附法因在匀浆后丙酮抽提过程中, 缓冲液很好地对酶的结构进行了保护, 所以活力损失较小。

2.3 酶的残余活力百分比 图 3 为各种提取方法所得酶液

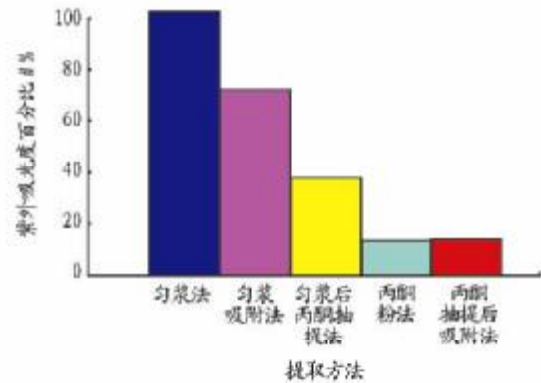


图 1 几种提取方法所得粗酶的紫外吸光度百分比

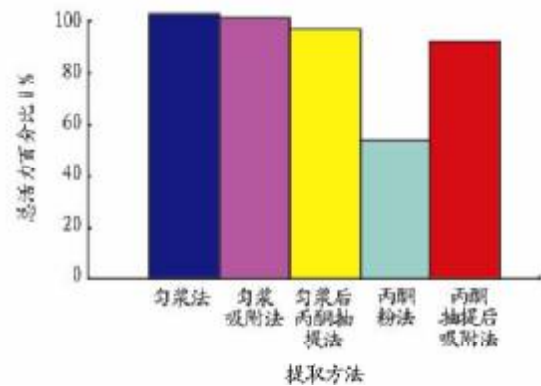


图 2 几种提取方法所得粗酶的总活力百分比

在室温的稳定性变化, 从中可见匀浆法和匀浆吸附法所得酶液最不稳定, 尤其是在前 6 d, 活力下降比较快, 第 6 天时的残余活力只有初提时的 23.5% 和 25.1%, 6 d 后活力下降速度变缓, 8 d 时只有 10% 左右; 其他方法所得酶液在前 6 d 变化比较缓慢, 6 d 时仍能保持 70% 左右, 然后快速下降, 但仍然比前 2 种方法残余活力高。由此可见, 采用匀浆后丙酮抽提法、丙酮粉法和丙酮粉后吸附法所提取的酶的稳定性都较匀浆法和匀浆吸附法好。

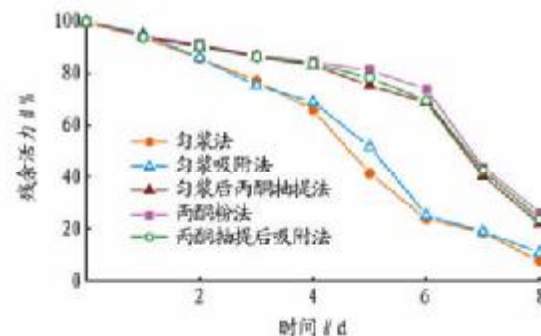


图 3 PPO 室温保存残余活力变化

2.4 4 种氨基酸对多酚氧化酶活力的影响 谷胱甘肽、谷氨酰胺、半胱氨酸、谷氨酸均对苹果梨的 PPO 有抑制作用 (表 1), 其中半胱氨酸的抑制能力最强, 其 IC_{50} 值为 (0.37 ± 0.016) mmol/L; 谷胱甘肽和谷氨酰胺的对苹果梨的 PPO 也有较强的抑制作用, 其 IC_{50} 值分别为 (0.48 ± 0.028) 和 (0.59 ± 0.032) mmol/L。谷氨酸对苹果梨的 PPO 抑制能力最弱, IC_{50} 值只有 (1.87 ± 0.087) mmol/L。

表1 4种氨基酸对酪氨酸酶活力的影响

化合物	底物	IC ₅₀ //mmol/L
谷胱甘肽	邻苯二酚	0.48 ± 0.028
谷氨酰胺	邻苯二酚	0.59 ± 0.032
半胱氨酸	邻苯二酚	0.37 ± 0.016
谷氨酸	邻苯二酚	1.87 ± 0.087

3 结论

试验结果可以看出,几种提取方法中匀浆法简单但多酚类残留多,影响酶活,并且不稳定;匀浆吸附法中也有大量的酚类残余;匀浆后丙酮抽提法所得总酶活力比较高,但多酚类残留仍达到35%;丙酮粉法所得酶溶解性不好,活力低。而笔者改进的丙酮抽提后吸附法结合了匀浆法与丙酮粉法的优点,所得的酶液多酚类残留少,总活力高,酶的稳定性也高,所用试剂价格经济,是几种方法中最佳的提取方法。谷胱甘肽、谷氨酰胺、半胱氨酸、谷氨酸均对苹果梨的PPO有抑制作用,其中半胱氨酸的抑制能力最强,其次为谷胱甘肽和谷氨酰胺,谷氨酸对苹果梨的PPO抑制能力最弱。

参考文献

- [1] LÓPEZ-RUBIRA V, CONESA A, ALLENDE A, et al. Shelf life and overall quality of minimally processed pomegranate arils modified atmosphere packaged and treated with UV-C [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2005, 37: 174 - 185.
- [2] MAGHOUMI M, GÓMEZ P A, ARTÉS-HERNÁNDEZ F, et al. Hot water, UV-C and superatmospheric oxygen packaging as hurdle techniques for

maintaining overall quality of fresh-cut pomegranate arils [J]. *J Sci Food Agric*, 2013, 93(5): 1162 - 1168.

- [3] 邓清云, 刘海杰, 张芊. 酸性电解水对鲜切马铃薯酶促褐变抑制效果研究 [J]. *食品科技*, 2012(10): 35 - 38.
- [4] KAVRAYAN D, AYDEMIR T. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from pepper mint [J]. *Food Chemistry*, 2001, 74: 147 - 154.
- [5] DEGL'INNOCENTI E, GUIDI L, PARDOSSI A, et al. Biochemical study of leaf browning in minimally processed leaves of lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *acephala*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(26): 9980 - 9984.
- [6] MISHRA B B, GAUTAM S, SHARMA A. Browning of fresh-cut eggplant: Impact of cutting and storage [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2012, 67: 44 - 51.
- [7] 李君兰, 李怡华, 赵秋玲, 等. 鸡腿蘑多酚氧化酶特性研究 [J]. *食品科学*, 2007, 28(1): 187 - 191.
- [8] MI-JEONG K, CHOON Y K, INSHIK P. Polyphenoloxidases in Jerusalem artichoke [J]. *Food Chemistry*, 2005, 89: 181 - 184.
- [9] 张立华, 孙晓飞, 张艳侠, 等. 石榴多酚氧化酶的某些特性及其抑制剂的研究 [J]. *食品科学*, 2007, 28(5): 216 - 219.
- [10] 程建军. 苹果梨中多酚氧化酶酶反应动力学和反应进程的研究 [J]. *食品科学*, 2002, 23(8): 69 - 71.
- [11] 郝慧英, 赵光鳌, 徐岩, 等. 苹果中多酚氧化酶的性质 [J]. *无锡轻工大学学报*, 2003, 22(1): 7 - 11.
- [12] SEGOVIA-BRAVO K A, JARÉN-GALAN M, GARCÍA-GARCÍA P, et al. Characterization of polyphenol oxidase from the manzanilla cultivar (*Olea europaea pomiformis*) and prevention of browning reactions in bruised olive fruits [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 6515 - 6520.
- [13] KOBREHEL K, LAIGNELET B, FEILLET P. Study of some factors of macaroni browning [J]. *Cereal Chem*, 1974, 51: 675 - 683.
- [14] ROCHA A M, GALEAZZI M A, CANO P, et al. Characterisation of 'starking' apple polyphenoloxidase [J]. *J Sci Food Agric*, 1998, 77: 527 - 534.

(上接第9403页)

果。其他领域推荐使用运用最为广泛对比分析法来进行环境规划实施评估,而环境经济模拟、预测分析方法可以作为辅助评估方法使用,使得环境规划实施的评估更全面、准确。但是从总体上看,现阶段环境规划实施的评估方法仍处于初级阶段,各方法仍存在缺点和不足之处,还没有形成一套科学合理的评估方法体系。这不仅影响环境保护工作的进展,也不利于社会、经济、环境的协调可持续发展。因此,建立完善的环境规划评估方法体系,完善各种评估方法的程序与机制,并全面进行评估方法的研究,是目前该领域研究的重点,也是环境规划发展的必然趋势。

参考文献

- [1] 国家环境保护局计划司《环境规划指南》编写组. 环境规划指南 [M]. 北京:清华大学出版社,1994.
- [2] 宋国君, 徐莎. 论环境规划实施的一般模式 [J]. *环境污染与防治*, 2007(5): 382 - 386.
- [3] 马俊英. 我区环境规划编制与实施现状调查分析 [J]. *新疆环境保护*, 2008, 30(3): 38 - 41.
- [4] 倪嘉. 规划实施评估的方法探讨——以上海临港新城泥城社区规划实施评估实践为例 [C] // 中国城市规划学会. 规划创新——2010 中国城市规划年会论文集. 重庆:重庆出版社,2010.
- [5] 吴舜泽, 周劲松, 李云生, 等. 国家环境保护“十一五”规划中期评估技术方法 [M]. 北京:中国环境科学出版社,2011.
- [6] ELLIS M, GUNTON T, RUTHERFORD M. A methodology for evaluating

environmental planning systems: A case study of Canada [J]. *J Environ Manage*, 2010, 91(6): 1268 - 1277.

- [7] 平宗莉, 闫整. 国外规划实施评价理论与方法及其在国内应用的研究进展 [J]. *山东国土资源*, 2010(2): 33 - 35.
- [8] BRODY S D, HIGHFIELD W E. Does Planning Work?: Testing the Implementation of Local Environmental Planning in Florida [J]. *Journal of the American Planning Association*, 2005, 71(2): 159 - 175.
- [9] 於方, 董战峰, 过孝民, 等. 中国环境保护规划评估制度建设的主要问题研究 [J]. *环境污染与防治*, 2009(10): 91 - 94.
- [10] 国家环境保护总局规划与财务司. 国家环境保护“十五”计划读本 [M]. 北京:中国环境科学出版社,2002.
- [11] 邹首民, 王金南, 洪亚雄. 国家“十一五”环境保护规划研究报告 [M]. 北京:中国环境科学出版社,2006.
- [12] 吕娜. 浅议环境费用效益分析法 [J]. *现代商业*, 2009(20): 107.
- [13] 徐瑜青, 王燕祥, 李超. 环境成本计算方法研究——以火力发电厂为例 [J]. *会计研究*, 2002(3): 49 - 53.
- [14] 张晓东, 朱德海. 中国区域经济与环境协调度预测分析 [J]. *资源科学*, 2003(2): 2 - 6.
- [15] 李学伟, 关忠良, 陈景艳. 经济数据分析预测学 [M]. 北京:中国铁道出版社,1998.
- [16] 吴丹. GM(1,1)模型建立与预测方法 [J/OL] <http://wenku.baidu.com/view/6c5b2d08ba1aa8114431d997.html>.
- [17] 邓聚龙. 灰色系统基本方法 [M]. 武汉:华中理工大学出版社,1987: 1 - 27, 104 - 105.
- [18] 唐剑武, 叶文虎. 环境承载力的本质及其定量化初步研究 [J]. *中国环境科学*, 1998, 18(3): 227 - 230.
- [19] 陈伟琪, 侯小凤, 刘岩. 论环境费用效益分析方法 [J]. *中国经济问题*, 2000(3): 51 - 56.