

研究报告 Original Papers

两种宁夏枸杞鲜果中多酚氧化酶的酶学特性及其影响因素研究

朱金霞*, 孔德杰, 李苗, 郑国保*, 李薇

宁夏农林科学院农业生物技术研究中心, 银川750002

摘要: 以宁夏地区主栽宁夏枸杞红果品种(俗称“红果枸杞”) ‘宁杞1号’ (*Lycium barbarum* ‘Ningqi 1’) 和黄果枸杞品种‘宁农杞4号’ (*L. barbarum* var. *auranticarpum* ‘Ningnongqi 4’) 鲜果为试验材料, 采用紫外分光光度法, 比较研究2种枸杞鲜果中多酚氧化酶(PPO)的酶学特性及其影响因素。结果表明, 红果枸杞PPO活性在pH为6.5的条件下最高, 最适温度为36~40°C; 黄果枸杞的PPO活性在pH为7.0的条件下最高, 最适温度36°C; 短时高温处理可以显著抑制2种枸杞的PPO活性; 抑制剂抗坏血酸、L-半胱氨酸及氯化钙对2种枸杞鲜果PPO活性均有明显抑制作用, 其中L-半胱氨酸抑制效果最佳, 较低浓度(0.024 mmol·L⁻¹)就可完全抑制枸杞鲜果中PPO活性。研究结果拟为枸杞采后加工提供理论依据和技术参考。

关键词: 宁夏枸杞; 多酚氧化酶; 酶活性; 抑制剂

多酚氧化酶(polyphenoloxidase, PPO)是一类在植物、动物和微生物等生物体内分布较为广泛的金属蛋白酶(高贵贤和王稳航2017), 能够催化底物(多酚类及其衍生物等物质)生成褐色的醌类物质, 可导致新鲜果蔬发生酶促褐变(李利华2018), 严重影响果蔬产品的风味、外观品质和商品价值(马海乐等2015), 而PPO活性正是导致果蔬酶促褐变的决定因素(李利华2018), 因此, 在采后加工过程中, PPO的酶学特性分析和活性抑制一直受到广泛关注。

宁夏枸杞(*Lycium barbarum*)是我国受原产地保护的药食两用道地药材和传统的出口创汇产品, 已有500多年人工种植历史(赵建华等2012; 罗青等2015)。药理研究表明, 宁夏枸杞具有抗氧化、抗肿瘤、降血糖、降血脂、保护肝脏、保护神经、保护视力等作用(赵建华等2012), 是珍贵的中药材和滋补保健食品(兰婷等2019)。但是枸杞在鲜果保鲜和制干过程中易发生酶促褐变反应生成黑色素, 影响其外观、风味和商品性, 还可能导致营养损失(李利华2018)。因此, 为有效减少酶促褐变引起产品质量下降, 开展关于枸杞PPO的酶学特性及其影响因素的研究, 是枸杞采后加工的研究重点。目前, 国内外学者对果蔬类PPO的报道较多, 且研究发现不同果蔬间PPO的酶学特性差异较大(杨光宇等2010; 邹礼根等2014; 李利华2018), 有关宁夏枸杞中红果枸杞PPO的酶学特性研究也有报道(刘

威2014), 但对于黄果枸杞PPO的酶学特性鲜见报道。本研究以宁夏药食同源植物枸杞为试验材料, 比较了2种枸杞鲜果中PPO的酶学特性, 研究了酶活性影响因素, 以期获得不同枸杞鲜果PPO最适pH条件、温度范围等信息, 为枸杞采后加工过程中的酶促褐变调控及机理研究提供基础和参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试材料为宁夏枸杞红果品种(俗称“红果枸杞”) ‘宁杞1号’ (*Lycium barbarum* L. ‘Ningqi 1’) 和宁夏枸杞变种黄果枸杞‘宁农杞4号’ (*L. barbarum* var. *auranticarpum* K. F. Ching ‘Ningnongqi 4’), 鲜果于2018年8月1日采自宁夏农林科学院枸杞研究所(有限公司)试验基地; 采后于4°C冷藏运回实验室, 放置于-80°C超低温冰箱中贮藏备用。

1.2 实验方法

1.2.1 枸杞鲜果PPO粗酶液提取

枸杞鲜果PPO粗酶液的提取方法主要参考郝慧英等(2003)和王凯晨(2016)文献中报道的方法, 提取液为pH值为5.5的乙酸-乙酸钠缓冲液(溶液中

收稿 2019-11-08 修定 2020-01-14

资助 宁夏回族自治区自然科学基金(2018AAC03279)。

* 共同通讯作者: 朱金霞(jinxiazhu001@163.com)、郑国保(zhenggb1121@163.com)。

含1.0 mmol·L⁻¹聚乙二醇6000、0.4 g·L⁻¹聚乙烯吡咯烷酮和体积分数1.0%的TritonX-100)。具体操作步骤如下: 将5.0 g冷冻的枸杞鲜果放入研钵中, 在液氮的冰浴条件下快速研磨, 然后加入35 mL提取液, 振荡摇匀, 在4℃、12 096×g条件下离心20 min, 所得上清液即为粗酶液; 将其移入带冰袋的泡沫箱中保存, 并在12 h内完成测定。

1.2.2 枸杞鲜果PPO活性的测定

PPO活性测定方法参照Coseteng速率法(Coseteng和Lee 1987)和王凯晨(2016)报道的方法, 具体操作步骤为: 将0.1 mol·L⁻¹乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 5.5) 2.5 mL和50 mmol·L⁻¹邻苯二酚溶液0.5 mL混和后, 加入0.1 mL酶粗提液并快速搅匀, 于420 nm处测定吸光度值, 每隔10 s记录一次; 具体计算方法: 以时间为横坐标, 吸光度值为纵坐标作图得反应曲线, 取最初直线部分计算酶活, 以1 min内吸光度值变化0.01所需的量为一个酶活性单位(U·min⁻¹)。

1.2.3 枸杞鲜果PPO相对酶活性计算

PPO相对酶活性(%)的计算方法参考王凯晨(2016)报道的方法。

1.2.4 影响枸杞鲜果PPO活性的主要因子实验

(1)测试温度: 取pH值为5.5的0.1 mol·L⁻¹乙酸-乙酸钠缓冲液2.5 mL, 再吸取50 mmol·L⁻¹邻苯二酚溶液0.5 mL, 分别在22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、50、60、70℃水浴恒温条件下放置20 min后, 加入0.5 mL粗酶液并迅速搅匀, 按照第1.2.2节所述方法测定枸杞鲜果中PPO活性。

(2)测试缓冲液pH值: 配置pH值为3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0的乙酸-乙酸钠缓冲液, 在30℃水浴恒温20 min后, 测定不同pH值条件下PPO活性, 具体操作同第1.2.2节所述的方法。

(3)热处理: 粗酶液分别在70、80、90℃温度条件下水浴保温0.5、1.0、2.0、3.0、5.0 min, 测定PPO活性, 具体操作同第1.2.2节所述的方法。

(4)褐变抑制剂: 以抗坏血酸、L-半胱氨酸、柠檬酸和CaCl₂为PPO抑制剂(浓度如表1所示), 分别用pH值为5.5的乙酸-乙酸钠缓冲液配置不同浓度的溶液, 30℃水浴恒温后, 测定PPO活性, 具体操作同第1.2.2节所述的方法。

1.2.5 数据处理

实验中数据均采用Excel 2019进行处理, 采用DPS 17.10进行方差分析。

2 实验结果

2.1 测试温度对2种枸杞鲜果PPO活性的影响

2种枸杞鲜果的PPO活性在整个测试温度范围内变化趋势相似, 均呈随着温度升高先升高后降低的趋势(图1)。红果枸杞在温度低于34℃时, PPO的相对酶活性介于59.1%~84.4%之间, 有一定的上下波动幅度; 温度升至34℃时, 酶活性显著升高至98.5%; 随着温度进一步的升高, 在36~40℃时达到最高; 随后当温度进一步升高时, 相对酶活性显著下降, 在70℃时PPO几乎无活性。黄果枸杞在22~34℃之间PPO相对酶活性较低, 且变化较平稳, 介于63.3%~78.6%之间; 温度升高到36℃时, PPO相对酶活性达最高; 随着温度的进一步升高, PPO相对酶活性缓慢降低; 40℃开始显著降低; 在70℃处理20 min时, PPO失去活性。因此, 两种枸杞鲜果不同温度水浴20 min后, 其PPO均在低温条件下(22~32℃)有一定的活性, 但活性不高; 随着温度升高, 活性逐渐增高; 高于一定温度后, PPO相对酶活性逐渐降低。

表1 枸杞PPO褐变抑制剂种类及浓度

Table 1 The kinds and concentrations of the browning inhibitors for PPO activity in fresh fruit of *L. barbarum*

项目	浓度1	浓度2	浓度3	浓度4	浓度5	浓度6	浓度7	浓度8
抗坏血酸浓度/mmol·L ⁻¹	0	1.4	2.8	5.5	11	22	44	88
柠檬酸浓度/mmol·L ⁻¹	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1	1.2
CaCl ₂ 浓度/mol·L ⁻¹	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1	1.2
L-半胱氨酸浓度/mmol·L ⁻¹	0	0.000 75	0.001 5	0.003	0.006	0.012	0.024	0.036

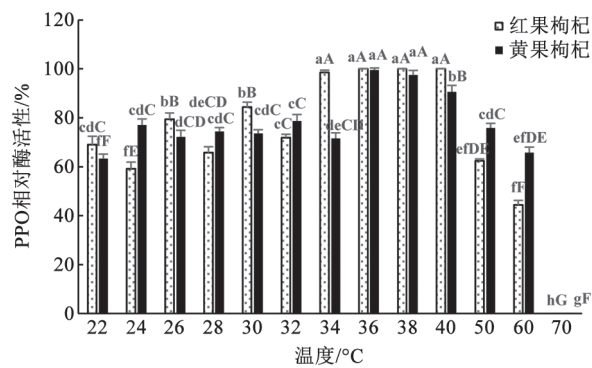


图1 不同测试温度下两种枸杞鲜果PPO活性变化
Fig.1 The changes of PPO activity in fresh fruit of the two kinds of *L. barbarum* under different temperatures
不同小写字母表示同一种枸杞不同测试温度条件下在0.05水平上有显著差异, 大写字母表示在0.01水平上有极显著差异。下图同。

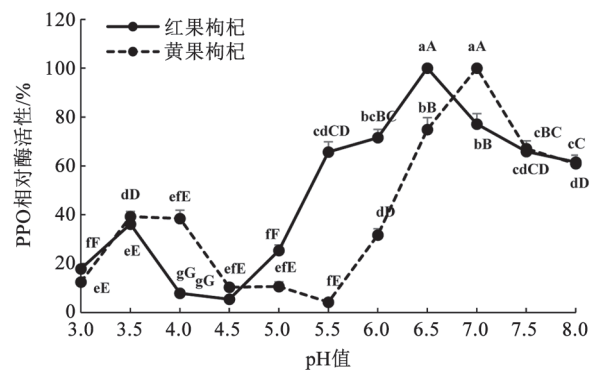


图2 缓冲溶液pH值对两种枸杞鲜果PPO活性的影响
Fig.2 The effect of pH on PPO activity in fresh fruit of the two kinds of *L. barbarum*

2.2 测试缓冲液pH值对枸杞PPO活性的影响

溶液pH值在3.0~8.0的测试范围内, 两种枸杞鲜果PPO相对酶活性均呈双峰曲线(图2)。红果枸杞和黄果枸杞鲜果PPO相对酶活性第一次高峰均出现在pH值为3.5时, 分别达36.2%和39.3%。然后随着pH值的升高, 红果枸杞和黄果枸杞鲜果的相对酶活性均呈下降趋势, 分别在pH值4.5和5.5时降至最小值, 仅分别为5.4%和4.2%。红果枸杞和黄果枸杞鲜果的PPO相对酶活性分别在pH值为6.5和7.0时出现第二次高峰且均达到最大值; 当进一步提高缓冲溶液pH值时, 两种枸杞鲜果的PPO相对酶活性均逐渐降低, 但其数值仍高于酸性环境条件下的数值。因此, pH值对枸杞鲜果中PPO活性的影响较大, 红果枸杞和黄果枸杞鲜果的PPO适宜pH值分别在弱酸性和中性, 在该条件下PPO的活性较强, 而在酸性(低于6.0)和较强碱性(高于7.5)条件下酶的活性较弱。

2.3 热处理温度和时间对枸杞鲜果PPO相对酶活性的影响

相同热处理温度下, 处理时间为0.5 min时, 红果枸杞和黄果枸杞的PPO相对酶活性极显著下降; 热处理温度为70、80和90°C时, 红果枸杞和黄果枸杞PPO相对酶活性分别为52.2%、32.8%、32.5%和23.8%、18.0%、15.6% (表2)。热处理时间长于0.5 min时, PPO相对酶活性均呈降低趋势且变化幅度有所减缓。当热处理时间为1.0 min时,

表2 热处理温度和时间对两种枸杞鲜果PPO相对酶活性的影响

品种		处理温度/°C	相对酶活性/%					
			0 min	0.5 min	1 min	2 min	3 min	5 min
红果枸杞	70	100 ^{aA}		52.2±1.2 ^{bB}	49.8±0.8 ^{bB}	35.5±0.7 ^{cC}	36.01±0.5 ^{cC}	30.7±1.4 ^{dC}
	80	100 ^{aA}		32.8±0.6 ^{bB}	32.9±0.8 ^{bB}	27.5±0.6 ^{cC}	8.5±0.3 ^{dD}	0 ^{eE}
	90	100 ^{aA}		32.5±0.6 ^{bB}	28.3±0.5 ^{cC}	26.3±0.5 ^{cC}	0 ^{dD}	0 ^{dD}
黄果枸杞	70	100 ^{aA}		23.8±1.6 ^{bB}	19.6±0.7 ^{bcBC}	17.5±1.5 ^{cdBC}	15.3±1.3 ^{cdC}	13.7±0.9 ^{dC}
	80	100 ^{aA}		18.0±1.2 ^{bB}	17.7±1.2 ^{bB}	16.8±1.1 ^{bB}	13.6±0.8 ^{bbB}	2.3±0.2 ^{cC}
	90	100 ^{aA}		15.6±0.9 ^{bB}	16.2±0.7 ^{bB}	4.8±0.7 ^{cC}	0 ^{dD}	0 ^{dD}

0~5 min为热处理时间。不同小写字母表示相同品种相同处理温度不同处理时间的数据在0.05水平上有显著差异, 大写字母表示在0.01水平上有极显著差异。

红果枸杞的相对酶活性分别是49.8% (70℃)、32.9% (80℃)和28.3% (90℃), 而黄果枸杞分别为19.6% (70℃)、17.7% (80℃)和16.2% (90℃)。在80℃下处理PPO的相对酶活性仅为初始值的8.5%和13.6%; 而在90℃下处理3 min, 可完全抑制2种枸杞鲜果的PPO活性。可见, 70℃以上的短时高温处理均可有效抑制PPO活性, 且温度越高, 完全抑制酶活性所需时间就越短。在今后的枸杞汁加工过程中, 考虑到温度较低时可有效保护枸杞果实中营养成分等情况, 可选择80℃热处理3 min的方法来抑制褐变。

2.4 不同抑制剂对枸杞鲜果PPO活性的影响

2.4.1 抗坏血酸

抗坏血酸对2种枸杞鲜果PPO活性具有显著的抑制作用, 均随抗坏血酸浓度的升高而降低(图3)。当抗坏血酸溶液浓度较低时($\leq 2.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 随着抗坏血酸浓度的升高, 2种枸杞鲜果PPO相对酶活性呈极显著降低趋势, 红果枸杞和黄果枸杞的PPO相对酶活性从100% (初始酶活性)分别下降到60.4%和77.5%。抗坏血酸溶液浓度介于5.5~11.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 枸杞PPO相对酶活性降低趋势较平缓, 红果枸杞和黄果枸杞鲜果PPO相对酶活性分别降低至53.4%和64.9%。随着抗坏血酸浓度进一步升高, 红果枸杞的PPO相对酶活性迅速降低; 在抗坏血酸溶液浓度达到88.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 黄果枸杞PPO相对酶活性降至0, 其PPO活性被完全抑制; 红果枸杞PPO相对酶活性降至19.3%, 抑制效果显

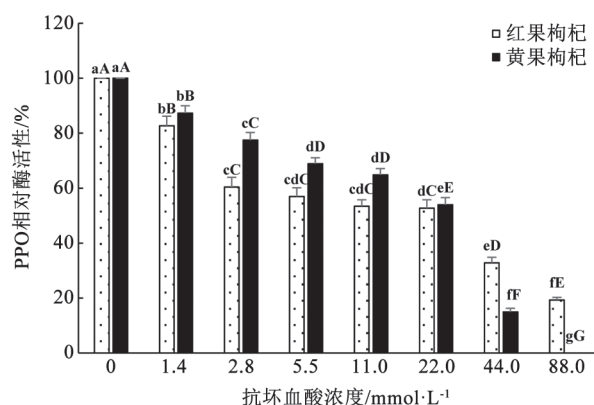


图3 抗坏血酸浓度对两种枸杞鲜果PPO活性的影响

Fig.3 The effect of ascorbic acid concentration on PPO activity in fresh fruit of the two kinds of *L. barbarum*

著。因此, 红果枸杞和黄果枸杞鲜果的PPO活性均随抗坏血酸溶液浓度的升高而降低, 浓度为88.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 可完全抑制黄果枸杞PPO相对酶活性。

2.4.2 L-半胱氨酸

L-半胱氨酸因其良好的抑菌和抗氧化性能, 常被用作鲜切果蔬的保鲜剂(令阳等2019)。在L-半胱氨酸溶液浓度为0.000 75 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 红果枸杞PPO相对酶活性为54.3%, 黄果枸杞为54.4%; 随着L-半胱氨酸溶液浓度的升高, 2种枸杞PPO相对酶活性显著降低, 黄果枸杞和红果枸杞PPO的相对酶活性分别在0.012和0.024 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时被完全抑制(图4)。可见, L-半胱氨酸对2种枸杞鲜果PPO的抑制作用显著, 较低浓度时就可很好地抑制2种枸杞鲜果的PPO活性。

2.4.3 柠檬酸

柠檬酸是一种在食品领域应用广泛的食品添加剂和PPO促褐变抑制剂。两种枸杞鲜果的PPO相对酶活性随柠檬酸溶液浓度的增大, 总体表现趋势为上下波动(图5)。当溶液浓度低于0.4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 枸杞PPO相对酶活性随柠檬酸溶液浓度的增大而缓慢降低。柠檬酸溶液浓度介于0.6~1.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间时, PPO相对酶活性数值出现上下波动的现象; 当溶液浓度为1.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 红果枸杞和黄果枸杞的PPO相对酶活性分别为76.5%和68.5%。可见, 柠檬酸对枸杞鲜果PPO活性抑制效果不理想, 在实际生产中不宜用来抑制枸杞鲜果的PPO活性。

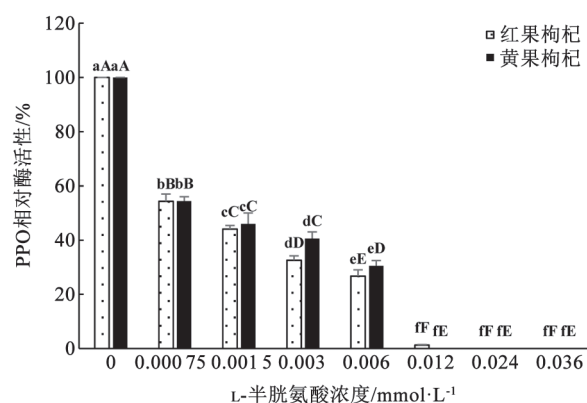


图4 L-半胱氨酸浓度对两种枸杞鲜果PPO活性的影响

Fig.4 The effect of L-cysteine concentration on PPO activity in fresh fruit of the two kinds of *L. barbarum*

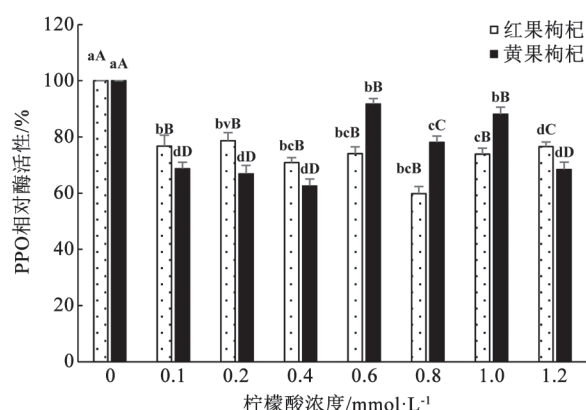


图5 柠檬酸浓度对两种枸杞鲜果PPO活性的影响

Fig.5 The effect of citric acid concentration on PPO activity in fresh fruit of the two kinds of *L. barbarum*

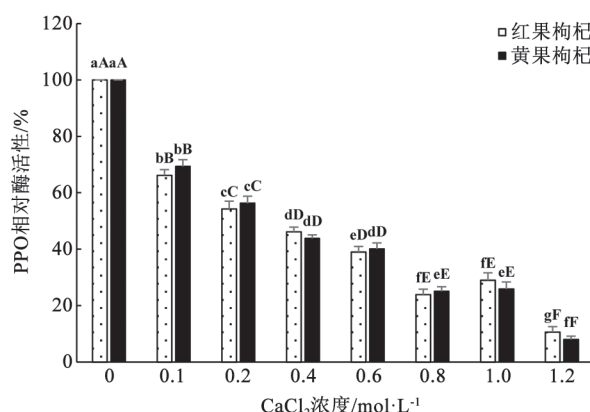


图6 CaCl_2 浓度对两种枸杞鲜果PPO活性的影响

Fig.6 The effect of CaCl_2 concentration on PPO activity in fresh fruit of the two kinds of *L. barbarum*

2.4.4 CaCl_2

CaCl_2 对枸杞PPO具有显著抑制作用,随着浓度的升高, PPO相对酶活性呈下降趋势(图6)。 CaCl_2 溶液浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,红果枸杞和黄果枸杞的PPO相对酶活性分别为66.2%和69.4%;当 CaCl_2 溶液浓度为 $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, PPO相对酶活性分别为23.9%和25.1%;而当 CaCl_2 溶液浓度 $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,红果枸杞PPO相对酶活性为10.7%,黄果枸杞PPO相对酶活性仅为8.0%。可见,两种枸杞PPO相对酶活性均随 CaCl_2 溶液浓度的增加而显著降低,抑制效果明显。因此, CaCl_2 也可作为2种枸杞鲜果PPO活性的优良抑制剂。

3 讨论

影响果实PPO热稳定性的因素主要有植物种类(郭兵兵等2017; 俞露等2019)、成熟度(何利华2010)和处理方式(何利华2010)等。本研究发现2种枸杞鲜果与大多数水果(邹礼根等2014; 刘亮等2015) PPO的酶学特性相似,均呈随温度升高先增高后降低的趋势;但最适温度略有差异,红果枸杞为 $36 \sim 40^\circ\text{C}$,黄果枸杞为 36°C ,均在 70°C 恒温放置20 min后完全失活。这可能是在高温状态下, PPO三维空间结构的完整性和稳定性受到严重破坏(郭兵兵等2017),使酶蛋白变性失去活性。两种枸杞鲜果中PPO均具有一定的热稳定性,随着反应温度的升高与时间的延长, PPO活性逐渐降低,这与大果山楂(*Malus domeri*) (郭兵兵等2017)、刺梨(*Rosa roxburghii*) (俞露等2019)等中PPO热稳定性变化趋势相一致。

酶对环境酸碱度极为敏感,每种酶只在一定的pH值范围内才会表现出活性。研究中发现,两种枸杞鲜果相对酶活性的适宜pH值分别为弱酸和中性条件,在此条件下酶的活性较强,这一结果与刘威(2014)关于红果枸杞多酚氧研究结果不同,可能与粗酶液提取方法不同有关。在该实验条件下,随着pH值的增大,红果枸杞和黄果枸杞鲜果中PPO相对酶活性均呈双峰曲线。而这种双峰曲线的产生原因可能与枸杞中存在PPO同工酶有关系,也可能是因为PPO是一种含铜的蛋白质,其中的铜离子在不同pH值条件下有不同的解离率,从而导致其不同的酶活性。

不同抑制剂对枸杞PPO活性的抑制效果显著不同, L-半胱氨酸在较低浓度时就能较好地抑制枸杞PPO活性, $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时可完全抑制枸杞PPO活性,并且L-半胱氨酸是一种天然氨基酸,常作为食品添加剂,因此,枸杞鲜果果汁加工过程中可选为首选PPO抑制剂。抗坏血酸和 CaCl_2 作为枸杞PPO的酶活抑制剂,效果次之, $88.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度抗坏血酸可完全抑制PPO活性,这与刘威(2014)得出抗坏血酸浓度为 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时就能完全抑制枸杞PPO的结果存在一定差异,原因可能与粗酶液提取方法及主要活性酶成分不同有关。抗坏血酸是

人体必需的营养物质,也可作为PPO活性抑制剂在枸杞汁褐变调控应用方面发挥重要作用。柠檬酸在该实验条件下对枸杞鲜果PPO抑制作用不显著,与刘威(2014)研究结果相似。

果蔬的酶促褐变研究一直是农产品贮藏和加工方面的热点问题之一,近年来在酶促褐变的机理(陈晨等2018)及褐变控制技术的机制(冯程程等2019)两方面开展了较为深入的研究。应用化学抑制剂依然是控制果蔬酶促褐变最为常用的方法,具有重要的应用价值。采用化学方法为主,物理或多种方法相结合来抑制果蔬的酶促褐变方面也取得了一定的成绩,但采用现代生物技术和基因工程技术可从根本上控制果蔬褐变,将会成为未来重要的研究方向之一。因此,在今后的枸杞新品种选育研究中,还需基因工程技术的介入,通过多学科领域联合深入开展褐变控制技术研究,助推枸杞高品质深加工产品的开发和枸杞种植产业的可持续发展。

参考文献(References)

- Chen C, Hu WZ, Jiang AL, et al (2018). Physiological mechanism for browning inhibition in fresh-cut apple by cysteine. *Food Sci*, 39 (3): 282–288 (in Chinese with English abstract) [陈晨, 胡文忠, 姜爱丽等(2018). 半胱氨酸控制鲜切苹果褐变的生理机制. *食品科学*, 39 (3): 282–288]
- Coseteng MY, Lee CY (1987). Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentration in relation to degree of browning. *Food Sci J*, 52 (4): 985–989]
- Feng CC, Yu J, Wang CL (2019). Study on the preservation of fresh-cut purple sweet potato by L-cysteine. *Food Ferm Ind*, 45 (22): 150–156 (in Chinese with English abstract) [冯程程, 于筠, 王春玲(2019). L-半胱氨酸对鲜切紫甘薯护色保鲜作用. *食品与发酵工业*, 45 (22): 150–156]
- Gao GX, Wang WH (2017). Recent progress in technologies for the improvement of protein-based film performance based on molecular cross-linking. *Food Sci*, 38 (9): 280–286 (in Chinese with English abstract) [高贵贤, 王稳航(2017). 基于分子交联的蛋白膜性能改良技术的研究进展. *食品科学*, 38 (9): 280–286]
- Guo BB, Ye ZQ, Huang XX, et al (2017). Enzymological characteristics of polyphenol oxidase from *Malus domeri* (Bois) Chev. *Stor Proc*, 17 (4): 20–24 (in Chinese with English abstract) [郭兵兵, 叶志青, 黄欣欣等(2017). 大果山楂多酚氧化酶的酶特性研究. *保鲜与加工*, 17 (4): 20–24]
- Hao HY, Zhao GA, Xu Y, et al (2003). The characterization of the apple polyphenoloxidase. *J Wuxi Univ Light Ind*, 22 (1): 7–11 (in Chinese with English abstract) [郝慧英, 赵光鳌, 徐岩等(2003). 苹果中多酚氧化酶的性质. *无锡轻工大学学报*, 22 (1): 7–11]
- He LH (2010). Postharvest pear polyphenol oxidase (PPO) isozymes and genetic relationship with the browning of fruit (dissertation). Shihezi: Shihezi University (in Chinese with English abstract) [何利华(2010). 鸭梨采后多酚氧化酶(PPO)同工酶及基因与果实褐变关系的研究(学位论文). 石河子: 石河子大学]
- Lan T, Huang YP, Liang QP, et al (2019). Study on chemical constituents from root and stem of *Lycium barbarum* L. *Nat Prod Res Dev*, 31: 1491–1497 (in Chinese with English abstract) [兰婷, 黄远鹏, 梁秋萍等(2019). 宁夏枸杞根和茎的化学成分及抗炎活性研究. *天然产物研究与开发*, 31: 1491–1497]
- Li LH (2018). Study on enzymatic properties of polyphenol oxidase from lettuce. *Stor Proc*, 18 (1): 71–75 (in Chinese with English abstract) [李利华(2018). 莴笋多酚氧化酶的酶学特性研究. *保鲜与加工*, 18 (1): 71–75]
- Ling Y, Deng LL, Yao SX, et al (2019). Effect of L-cysteine treatment on the quality of ‘Qingcui’ plum fruit at room temperature storage. *Food Sci*. 40 (21): 222–228 (in Chinese with English abstract) [令阳, 邓丽莉, 姚世响等(2019). L-半胱氨酸处理对青脆李果实常温贮藏品质的影响. *食品科学*, 40 (21): 222–228]
- Liu L, Wang RK, Cheng HY, et al (2015). Isolation and purification and characterization of polyphenol oxidase from peach pulp. *J Nucl Agr Sci*, 29 (6): 1121–1128 (in Chinese with English abstract) [刘亮, 王如坤, 程慧媛等(2015). 水蜜桃多酚氧化酶分离纯化及其酶学特性研究. *核农学报*, 29 (6): 1121–1128]
- Liu W (2014). Research on browning and the change of main active substance content during *Lycium barbarum* juice making (dissertation). Yinchuan: Ningxia University (in Chinese with English abstract) [刘威(2014). 枸杞制汁过程中褐变及主要活性物质含量变化的研究(学位论文). 银川: 宁夏大学]
- Luo Q, Mi J, Zhang LS, et al (2015). Research on composition and antioxidant activity of carotenoids from *Lycium* L. and different fruits & vegetables. *Food Res Dev*, 36 (24): 39–42 (in Chinese with English abstract) [罗青, 米佳, 张林锁等(2015). 枸杞及不同果蔬中类胡萝卜素含量及抗氧化活性研究. *食品研究与开发*, 36 (24): 39–42]
- Ma HL, Wang J, Liu B, et al (2015). Experiment and dynamics of dehydration and inactivation of enzyme of potato slices by simultaneous infrared dry-blanching. *Trans Chin Soc Agr Eng*, 31 (7): 304–310 (in Chinese with English abstract) [马海乐, 王娟, 刘斌等(2015). 马铃薯片红外

- 加热灭酶脱水试验及动力学. 农业工程学报, 31 (7): 304–310]
- Wang KC (2016). Research on optimization of processing conditions and control of browning and sterilization of celery juice (dissertation). Shanghai: Shanghai Normal University (in Chinese with English abstract) [王凯晨 (2016). 芹菜制汁工艺条件优化及褐变与除菌控制研究(学位论文). 上海: 上海师范大学]
- Yang GY, Mou DH, Zhao GX, et al (2010). Enzymatic characteristics of polyphenol oxidase in Zhaozhou snow pear. Food Mach, 26 (5): 10–12 (in Chinese with English abstract) [杨光宇, 牟德华, 赵广西等(2010). 赵州雪花梨多酚氧化酶酶学特性研究. 食品与机械, 26 (5): 10–12]
- Yu L, Mu B, Ji SY (2019). Study on the inhibitors and extraction technique of polyphenol oxidase in *Rosa roxburghii* Tratt. Food Res Dev, 40 (15): 86–90 (in Chinese with English abstract) [俞露, 穆波, 吉升阳(2019). 刺梨多酚氧化酶的提取工艺及其抑制剂研究. 食品研究与开发, 40 (15): 86–90]
- Zhao JH, Li HX, Zhou X, et al (2012). Influence of drought stress on plant growth and sugar accumulation in fruit of *Lycium barbarum* L. Plant Physiol J, 48 (11): 1063–1068 (in Chinese with English abstract) [赵建华, 李浩霞, 周旋等(2012). 干旱胁迫对宁夏枸杞生长及果实糖分积累的影响. 植物生理学报, 48 (11): 1063–1068]
- Zou LG, Qiu J, Zhao Y, et al (2014). Study on enzymatic characterization of polyphenol oxidase of pear fruit. Stor Proc, 14 (1): 19–22 (in Chinese with English abstract) [邹礼根, 邱静, 赵芸等(2014). 蜜梨果实多酚氧化酶酶学特性的研究. 保鲜与加工, 14 (1): 19–22]

The studies on the enzymatic characteristics of polyphenol oxidase and its influence factors in two kinds of fresh fruits of *Lycium barbarum* L.

ZHU Jinxia*, KONG Dejie, LI Miao, ZHENG Guobao*, LI Wei

Agricultural Biotechnology Research Center of Ningxia Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, China

Abstract: A comparative study was carried out to research the enzymatic properties of polyphenol oxidase (PPO) and its influence factors in fresh fruits of *Lycium barbarum* ‘Ningqi 1’ and *L. barbarum* var. *auranticarpum* ‘Ningnongqi 4’, which were planted in Ningxia region. The results show that PPO activity in ‘Ningqi 1’ exhibited the maximum under pH 6.5 and 36–40°C, and in ‘Ningnongqi 4’ under pH 7.0 and 36°C. Besides, the PPO activity could be significantly inhibited by short-time and high-temperature treatment. The inhibitors, such as ascorbic acid, L-cysteine and calcium chloride, could significantly inhibit the PPO activity in the tested fresh fruits. L-cysteine had the optimal inhibitory effect. When L-cysteine concentration was 0.024 mmol·L⁻¹, the PPO activity could be completely inhibited. Our findings in this study could provide basic data and technical support for the fresh fruit processing and drying in *L. barbarum*.

Key words: *Lycium barbarum*; polyphenol oxidase; enzyme activity; inhibitor

Received 2019-11-08 Accepted 2020-01-14

This work was supported by the Natural Science Foundation of Ningxia Hui Autonomous Region (2018AAC03279).

*Co-corresponding authors: Zhu JX (jinixazhu001@163.com), Zheng GB (zhenggb1121@163.com).