

# 芡实多酚氧化酶的酶学性质

刘 静<sup>1</sup>, 钱建亚<sup>1,2,\*</sup>, 李成良<sup>1</sup>, 李良俊<sup>3</sup>, 陈学好<sup>3</sup>

(1.扬州大学食品科学与工程学院, 江苏 扬州 225127; 2.江苏省乳品生物技术与安全控制重点实验室, 江苏 扬州 225127; 3.扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009)

**摘 要:**以紫花苏芡和紫花刺芡种仁为原料制备粗酶液, 研究多酚氧化酶(PPO)酶学性质。结果表明:紫花苏芡和紫花刺芡 PPO 最适作用条件均为温度 45℃和 pH 6.5; 铁离子和亚铁离子对芡实 PPO 酶活性具有较强的促进作用, 钙离子低质量浓度时抑制酶活性, 较高质量浓度时使酶活性反弹, 没有表现出明显的激活作用, 铝离子有一定的促进作用, 铜离子低质量浓度对酶活性有促进作用, 高质量浓度有抑制作用; 有机酸柠檬酸、草酸、抗坏血酸和 EDTA、还原剂亚硫酸氢钠和硫代硫酸钠对紫花苏芡和紫花刺芡 PPO 酶活性都有抑制作用。

**关键词:**芡实; 多酚氧化酶; 抑制剂

## Enzymatic Properties of Polyphenol Oxidase from Gordon Euryale Seed

LIU Jing<sup>1</sup>, QIAN Jian-ya<sup>1,2,\*</sup>, LI Cheng-liang<sup>1</sup>, LI Liang-jun<sup>3</sup>, CHEN Xue-hao<sup>3</sup>

(1. School of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China;  
2. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Safety Control, Yangzhou 225127, China;  
3. School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** Dehulled kernels of two varieties of *Euryale ferox* Slisb, Zihua Suqian and Zihua Ciqian from respectively Suzhou and Hongze, Jiangsu province of China, were used as raw materials to prepare and characterize crude polyphenol oxidase (PPO) extract. The results showed that PPO enzymes from both varieties of gordon euryale had the highest activity at 45 °C and pH 6.5. Ferric and ferrous ions were highly effective in promoting PPO activity. Calcium inhibited PPO activity at low concentrations, but not at high concentrations. Aluminum ion and copper ion at low concentrations activated PPO activity, while high levels of copper ions inhibited it. PPOs were inhibited by organic acids, like citric acid, oxalic acid, ascorbic acid, and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and the reductants sodium bisulfate and sodium thiosulfate.

**Key words:** *Euryale ferox*; polyphenol oxidase; inhibitor

中图分类号: TS201.2; TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)07-0176-06

芡为睡莲科芡属(*Euryale ferox* Salisb)一年生大型水生草本植物, 原产中国和东南亚各地。广泛分布于我国南至海南、北至黑龙江, 有“南芡”和“北芡”之分<sup>[1-2]</sup>。芡的种仁——芡实, 不仅营养价值高, 还具有养血安神、益肾固精、去湿健脾、止泻止带等保健功效。芡实味甘性平, 入脾、肾、胃经, 既能益肾, 又能健脾, 营养先天、后天之本, 提高人体的免疫力, 祛病强身, 延年益寿。《神农本草经》将芡实列为上品, “主治湿痹, 腰脊酸痛, 补中除暴疾, 益精气, 强志, 令耳目聪明, 久服轻身不饥”。

多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)是植物

体内普遍存在的一种末端氧化还原酶<sup>[3]</sup>, 它与品质保持和感官等密切相关, 影响植物的经济价值。芡实在贮藏加工过程中易产生褐变, 原因可能是因为酚类物质在贮藏、加工过程中被多酚氧化酶催化形成褐变产物<sup>[4]</sup>。本研究拟对芡实 PPO 性质作初步探讨, 旨在为多酚氧化酶的提取提供更广泛的来源。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

芡实为紫花苏芡(江苏苏州产)和紫花刺芡(江苏洪泽产)籽粒脱壳种仁。

收稿日期: 2011-05-20

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(200903017-02)

作者简介: 刘静(1989—), 女, 本科生, 主要从事食品化学与营养研究。E-mail: 623088200@qq.com

\* 通信作者: 钱建亚(1964—), 男, 教授, 博士, 主要从事食品化学与营养研究。E-mail: jyqian@yzu.edu.cn

丙酮 中国恒利试剂厂；氯化钙、EDTA 上海紫一试剂厂；磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化亚铁、氯化铁、硫酸铜、抗坏血酸、柠檬酸、草酸、亚硫酸氢钠、硫代硫酸钠 国药集团化学试剂有限公司；聚乙烯吡咯酮 德国 Basf 公司。

## 1.2 仪器与设备

FW20 粉碎机 中国亨利仪器厂；FA1104 电子天平 上海天平仪器厂；WB201 恒温水浴锅 上海申生科技有限公司；DGF30/7-1A 电热鼓风干燥箱 南京试验仪器厂；722 分光光度计 上海精密科学仪器有限公司；UV-2400PC 紫外-可见分光光度计 日本岛津仪器公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 PPO 丙酮粉制备

称取一定量的芡实，加 5 倍质量  $-18^{\circ}\text{C}$  冷冻丙酮后捣碎，抽滤，用冷冻丙酮淋洗滤渣 3 遍，抽干后得丙酮粉， $-40^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3.2 PPO 活性测定

用含有聚乙烯吡咯酮(PVP)的磷酸盐缓冲液(0.2mol/L、pH 6.8) 10:1(V/m)将丙酮粉溶解，4000r/min 离心 10min，上清液即为粗酶液<sup>[5]</sup>。于 1cm 比色皿中，加入磷酸盐缓冲溶液(0.2mol/L, pH 6.8)1mL 和 0.1mol/L 邻苯二酚溶液 1mL。混匀后加入酶液，记时，每 15s 记录酶和底物混合体系的吸光度，以吸光度对时间曲线最初直线段的斜率表示酶活力，一个酶活力单位定义为在测定条件下，每分钟引起吸光度改变 0.001 所需的酶量<sup>[6]</sup>。对测定体系进行吸收光谱扫描，最大吸收波长为 400nm。后续酶活测定均在波长 400nm 进行。

### 1.3.3 温度对芡实 PPO 活性的影响

将加有 0.2mol/L、pH 6.8 磷酸盐缓冲溶液 4mL、0.1mmol/L 邻苯二酚 0.6mL 和 PPO 粗酶液 0.4mL 的反应体系，分别于 25、35、45、55、65 $^{\circ}\text{C}$  保温 10min，以 400nm 波长处吸光度间接表示酶活性。

### 1.3.4 pH 值对芡实 PPO 活性的影响

分别将加有 pH4.5、5.5、6.5、7.5、8.5 磷酸盐缓冲溶液(0.2mol/L) 4mL、0.10mmol/L 邻苯二酚 0.6mL 和 PPO 粗酶液 0.4mL 的反应体系，于 25 $^{\circ}\text{C}$  保温 10min，以 400nm 波长处吸光度间接表示酶活性。

### 1.3.5 底物浓度对芡实 PPO 活性的影响

在加有 pH6.8 磷酸盐缓冲溶液 4mL、PPO 粗酶液 0.4mL 的反应体系中，分别加入 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25mol/L 邻苯二酚 0.6mL。25 $^{\circ}\text{C}$  保温 10min，以 400nm 波长处吸光度间接表示酶活性。

### 1.3.6 酶用量对芡实 PPO 活性的影响

在加有 pH 6.8 磷酸盐缓冲溶液 4mL、0.1mol/L 邻

苯二酚 0.6mL 的反应体系中，分别加入 PPO 粗酶液 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mL。25 $^{\circ}\text{C}$  保温 10min，以 400nm 波长处吸光度间接表示酶活性。

### 1.3.7 金属离子对芡实 PPO 活性的影响

在加有 0.2mol/L、pH 6.8 磷酸盐缓冲溶液 4mL、0.1mol/L 邻苯二酚 0.6mL 和 PPO 粗酶液 0.4mL 的反应体系中，分别加入  $\text{FeCl}_2$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{AlCl}_3$  和  $\text{CuSO}_4$  等盐溶液 0.2mL。25 $^{\circ}\text{C}$  保温 10min，以 400nm 波长处吸光度间接表示酶活性。

### 1.3.8 有机酸对芡实 PPO 活性的影响

在加有 0.2mol/L、pH 6.8 磷酸盐缓冲溶液 4mL、0.1mol/L 邻苯二酚 0.6mL 和 PPO 粗酶液 0.4mL 的反应体系中，分别加入抗坏血酸、柠檬酸、草酸以及 EDTA 等有机酸 0.2mL。有机酸质量浓度分别为，柠檬酸：1、2、3、4、5g/100mL；草酸：0.2、0.4、0.6、0.8、1.0g/100mL；抗坏血酸：0.2、0.4、0.6、0.8、1.0g/100mL；EDTA：0.1、0.2、0.3、0.4、0.5g/100mL。25 $^{\circ}\text{C}$  保温 10min，测定 400nm 波长处吸光度，计算不同条件下的相对酶活性。

### 1.3.9 还原剂对芡实 PPO 活性的影响

在加有 0.2mol/L、pH 6.8 磷酸盐缓冲溶液 4mL、0.1mol/L 邻苯二酚 0.6mL 和 PPO 粗酶液 0.4mL 的反应体系中，分别加入亚硫酸氢钠和硫代硫酸钠 0.2mL，溶液质量浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5g/100mL。25 $^{\circ}\text{C}$  保温 10min，测定 400nm 波长处吸光度，计算不同条件下的相对酶活性。

## 2 结果与分析

### 2.1 温度对芡实 PPO 活性的影响

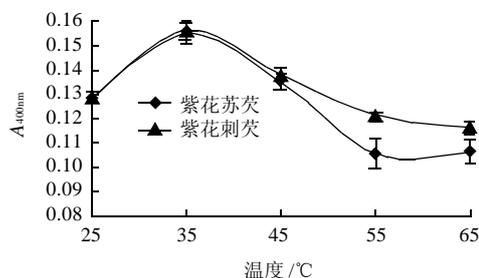


图1 温度对 PPO 活性的影响

Fig.1 Effect of temperature on the activity of PPO from gordon euryale seed

由图 1 可知，在 35 $^{\circ}\text{C}$  条件下，紫花苏芡和紫花刺芡的 PPO 都表现出最大酶活力。35 $^{\circ}\text{C}$  以下 PPO 活性随温度

升高增加; 35℃以上, PPO 活性随着温度升高而降低。这是因为随着温度上升, 分子的热运动加剧, 单位时间内底物与酶接触的几率增高, 酶活性增大; 但是随温度进一步升高, 酶蛋白逐渐变性, 酶活性降低。最适温度是两种作用平衡的结果<sup>[7]</sup>。

## 2.2 pH 值对芡实 PPO 活性的影响

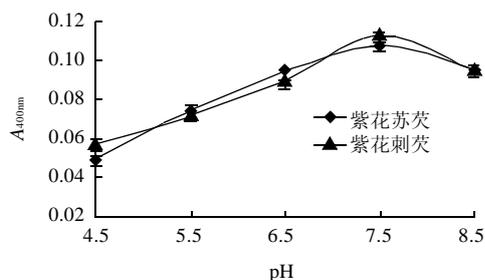


图2 pH 值对 PPO 活性的影响

Fig.2 Effect of pH on the activity of PPO from gordon euryale seed

由图2可知, pH7.5时, 紫花苏芡和紫花刺芡的PPO活性最强, 在4.5~7.5范围内, pH值增大酶活性增加, 高于7.5时, pH值升高, 酶活性降低。这可能是因为PPO酶为碱性含铜酶, 在较强酸性环境下, PPO中的铜解离出来, 使活性降低; 当pH值大于7时, 在碱性环境中, PPO中的辅基铜解离, 形成不溶性的Cu(OH)<sub>2</sub>, 使其活性降低<sup>[8]</sup>。两种来源PPO的活性差别不大。

## 2.3 底物浓度对芡实 PPO 活性的影响

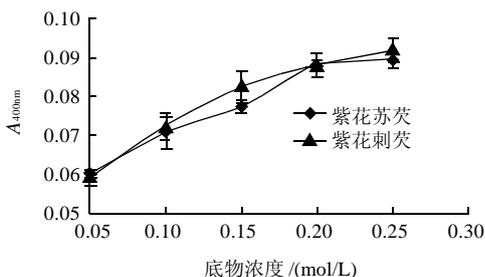


图3 底物浓度对 PPO 活性的影响

Fig.3 Effect substrate concentration on the activity of PPO from gordon euryale seed

由图3可知, 底物浓度较低时, 底物浓度增加显著提高紫花苏芡和紫花刺芡PPO活性。酶活性达到一定值后, 即使继续增加底物浓度, 其变化也不明显。这是因为底物浓度较低时, 酶过量产物少, 表现为酶活性较低; 随着底物浓度增加, 与底物结合的酶分子增多并逐渐被底物饱和, 产物量趋于恒定, 即使增加底物浓度也不能提高酶活性<sup>[9]</sup>。

## 2.4 酶用量对芡实 PPO 活性的影响

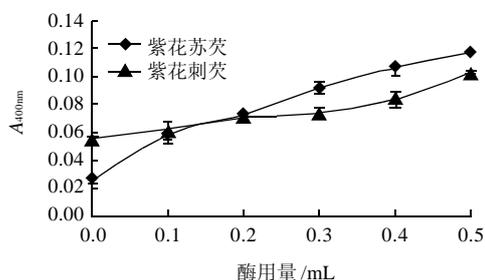


图4 酶用量对 PPO 活性的影响

Fig.4 Effect of enzyme concentration on the activity of PPO from gordon euryale seed

由图4可知, 较低酶用量时, 酶用量增加引起紫花苏芡和紫花刺芡的PPO活性显著增加。达到一定值后, 酶用量与酶活的线性关系发生改变, 原因是在酶用量较低时, 底物过量, 随着酶用量的增加, 越来越多的酶分子与底物结合, 此时, 底物逐渐被饱和, 直至达到最大饱和值。紫花苏芡PPO活性受酶用量的影响似乎更大。

## 2.5 金属离子对芡实 PPO 活性的影响

### 2.5.1 Fe<sup>2+</sup> 和 Fe<sup>3+</sup> 对芡实 PPO 活性的影响

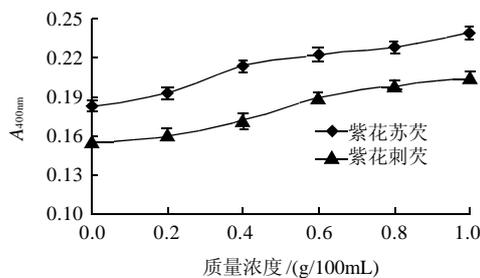


图5 氯化亚铁对 PPO 活性的影响

Fig.5 Effect of FeCl<sub>2</sub> on the activity of PPO from gordon euryale seed

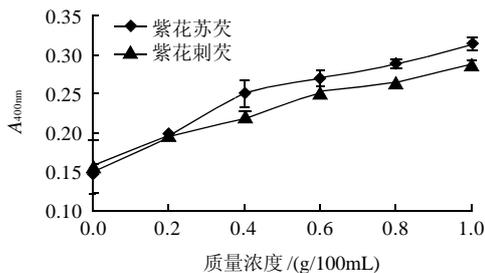


图6 氯化铁对 PPO 活性的影响

Fig.6 Effect of FeCl<sub>3</sub> on the activity of PPO from gordon euryale seed

由图 5、6 可知, 随着  $Fe^{3+}$  和  $Fe^{2+}$  质量浓度增加, 酶反应体系的吸光度增加, 表明紫花苏芡和紫花刺芡的 PPO 活性显著增加。这主要是因为铁离子有氧化作用使酚类化合物形成醌, 而且能催化 PPO 中的铜氧化呈色。在加工中应注意避免原料与铁接触。紫花苏芡 PPO 对  $Fe^{2+}$  的反应似乎更敏感。

### 2.5.2 $Ca^{2+}$ 对芡实 PPO 活性的影响

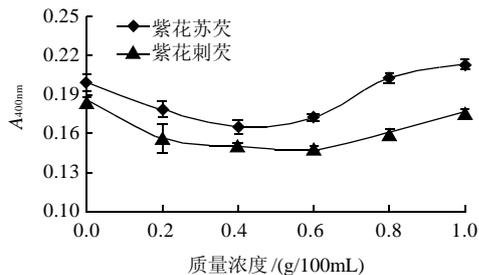


图 7 氯化钙对 PPO 活性的影响

Fig.7 Effect of  $CaCl_2$  on the activity of PPO from gordon euryale seed

由图 7 可知, 氯化钙质量浓度较低时, 随着质量浓度增加, 紫花苏芡和紫花刺芡 PPO 活性降低, 当氯化钙质量浓度达到一定值时, 酶活性增加, 但没有明显高于初始活性。钙离子通常与酶的活性有较大关系, 是很多酶的激活剂<sup>[10]</sup>。

### 2.5.3 $Al^{3+}$ 对芡实 PPO 活性的影响

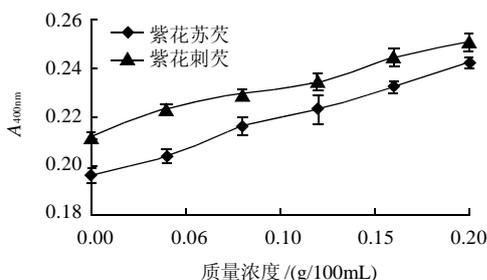


图 8 氯化铝对紫花苏芡 PPO 活性的影响

Fig.8 Effect of  $AlCl_3$  on the activity of PPO from gordon euryale seed

由图 8 可知, 在一定的范围内, 随着  $Al^{3+}$  质量浓度增加, 紫花苏芡和紫花刺芡的 PPO 活性显著增加, 说明  $Al^{3+}$  对褐变具有一定的促进作用。紫花刺芡 PPO 活性受  $Al^{3+}$  的影响程度更大。

### 2.5.4 $Cu^{2+}$ 对芡实 PPO 活性的影响

由图 9 可知, 在  $Cu^{2+}$  质量浓度较低时, 随着  $Cu^{2+}$  质量浓度增大, 紫花苏芡和紫花刺芡的 PPO 活性逐渐增加。 $Cu^{2+}$  对 PPO 活性起激活作用; 当  $Cu^{2+}$  质量浓度达到一定值时, 对酶活力逐渐表现为抑制作用, 即随  $Cu^{2+}$

质量浓度增大, 其酶活力逐渐降低。其原因可能是因为 PPO 为含铜酶, 需要  $Cu^{2+}$  发挥作用, 但铜的数量并非越多越好。

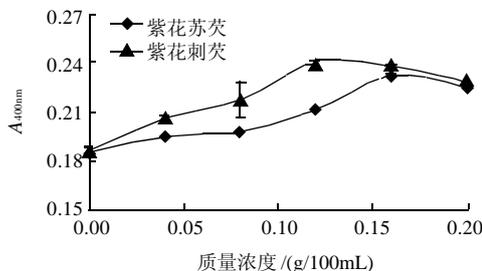


图 9 硫酸铜对芡实 PPO 活性的影响

Fig.9 Effect of  $CuSO_4$  on the activity of PPO from gordon euryale seed

## 2.6 有机酸对芡实 PPO 活性的影响

### 2.6.1 柠檬酸对芡实 PPO 活性的影响

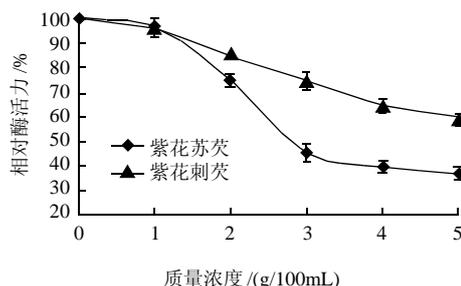


图 10 柠檬酸对 PPO 活性的影响

Fig.10 Effect of citric acid on the activity of PPO from gordon euryale seed

由图 10 可知, 随柠檬酸质量浓度的增加, 紫花苏芡和紫花刺芡 PPO 活性受抑制加强。这可能是由于柠檬酸对 PPO 的辅基铜有较强的螯合作用。此外, 柠檬酸的酸性使体系 pH 值偏离 PPO 最适 pH 值, 从而抑制酶的活性<sup>[11]</sup>。紫花刺芡 PPO 活性对柠檬酸的适应性似乎更强。

### 2.6.2 草酸对芡实 PPO 活性的影响

由图 11 可知, 草酸对紫花苏芡和紫花刺芡 PPO 活性的抑制作用弱于柠檬酸, 质量浓度为 0.2g/100mL 时, PPO 相对酶活力约为 90%, 随着质量浓度增大, 对 PPO 活性的抑制作用越来越强, 当质量浓度为 1g/100mL 时, PPO 活性的相对酶活力分别降为 61.5% 和 58.3%。两种来源 PPO 活性差异不显著, 可能跟草酸的酸性较弱有关。

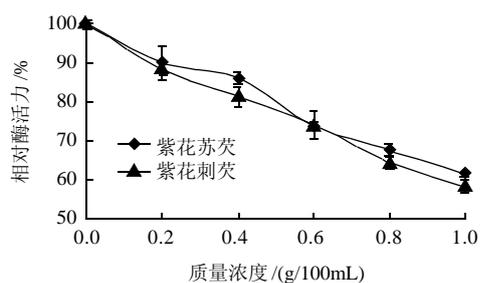


图 11 草酸对 PPO 活性的影响

Fig.11 Effect of oxalic acid on the activity of PPO from gordon euryale seed

## 2.6.3 抗坏血酸对芡实 PPO 活性的影响

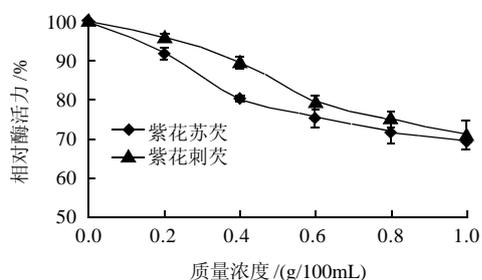


图 12 抗坏血酸对 PPO 活性的影响

Fig.12 Effect of ascorbic acid on the activity of PPO from gordon euryale seed

由图 12 可知, 抗坏血酸对紫花苏芡和紫花刺芡的 PPO 活性有抑制作用并有浓度效应。这可能是由于其还原作用, 抗坏血酸将  $\text{Cu}^{2+}$  还原成  $\text{Cu}^{+}$ , 同时抑制醌类物质之间聚合以及抑制醌类物质与氨基酸或蛋白质作用形成黑色素大分子<sup>[12]</sup>。两种来源 PPO 活性差异不显著。

## 2.6.4 EDTA 对芡实 PPO 活性的影响

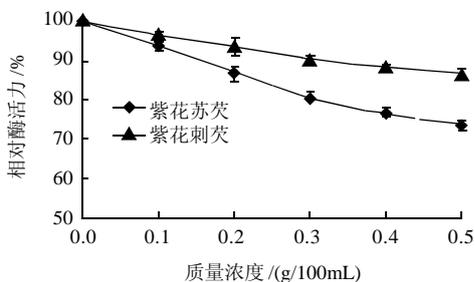


图 13 EDTA 对 PPO 活性的影响

Fig.13 Effect of EDTA on the activity of PPO from gordon euryale seed

由图 13 可知, EDTA 对紫花苏芡和紫花刺芡 PPO 活性有抑制作用, 这是因为 EDTA 具有较强的螯合能力,

能螯合多酚氧化酶中  $\text{Cu}^{2+}$ , 从而抑制 PPO 的活性<sup>[13]</sup>。紫花刺芡 PPO 活性受 EDTA 质量浓度的影响较小, 也许是因为其中的铜含量较低(X- 荧光法测得紫花苏芡和紫花刺芡种仁铜含量分别为(1.90g/kg 和 1.48g/kg), 可作进一步的研究。

## 2.7 还原剂对芡实 PPO 活性的影响

## 2.7.1 亚硫酸氢钠对芡实 PPO 活性的影响

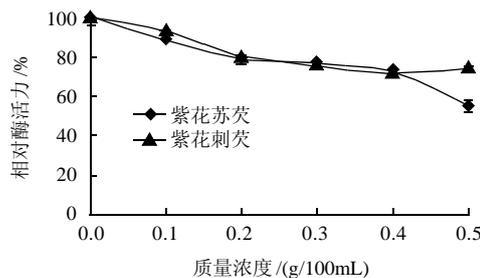


图 14 亚硫酸氢钠对 PPO 活性的影响

Fig.14 Effect of  $\text{NaHSO}_3$  on the activity of PPO from gordon euryale seed

由图 14 可知, 紫花苏芡和紫花刺芡 PPO 活性受亚硫酸氢钠抑制效果明显, 这可能是因为醌不可逆地被还原转变成无色产物<sup>[14]</sup>。紫花刺芡 PPO 活性对亚硫酸氢钠的适应性似乎更强。

## 2.7.2 硫代硫酸钠对芡实 PPO 活性的影响

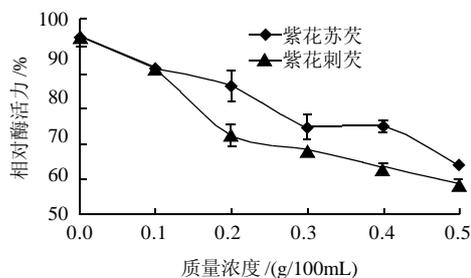


图 15 硫代硫酸钠对 PPO 活性的影响

Fig.15 Effect of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  on the activity of PPO from gordon euryale seed

由图 15 可知, 硫代硫酸钠对 PPO 活力具有一定的抑制作用, 质量浓度为 0.1g/100mL 时, 紫花苏芡和紫花刺芡 PPO 相对酶活力分别为 91.5% 和 90.3%。质量浓度增大, 对 PPO 活性的抑制作用增强, 当达到 0.5g/100mL 时, 紫花苏芡和紫花刺芡 PPO 的相对酶活力分别降到 63.8% 和 58.8%。原因应该与硫代硫酸钠的还原性有关<sup>[15]</sup>。

## 3 结 论

紫花刺芡和紫花刺芡多酚氧化酶为较温和条件的

酶, 金属离子  $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Fe}^{2+}$  对 PPO 酶促反应表现出较强的促进作用; 钙离子低质量浓度时抑制酶活, 当质量浓度增加后又使酶活性反弹回复, 但没有明显的激活作用, 这在文献中也有报道<sup>[3]</sup>, 但原因不明。有机酸如柠檬酸、草酸、抗坏血酸和 EDTA 及还原剂如亚硫酸氢钠、硫代硫酸钠对紫花苏茨和紫花刺茨的 PPO 酶促反应有显著的抑制作用。紫花苏茨和紫花刺茨 PPO 酶促褐变反应受以上因素的影响程度不同, 既可能跟酶自身性质有关, 也可能跟反应产物的转化有关。关于茨实多酚氧化酶的报道几乎没有, 要揭示产生差异的原因, 需对酶进行分离和纯化, 并采用不同的底物如邻苯三酚、儿茶酚、酪氨酸等进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 赵有为. 中国水生蔬菜[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 52.
- [2] 刑湘臣. 茨实杂谈[J]. 烹调知识, 2001(7): 46-47.
- [3] 李忠光, 龚明. 植物多酚氧化酶活性测定方法的改进[J]. 云南师范大学学报, 2005, 25(1): 44-45.
- [4] 杨昌鹏, 胡艳妮, 黄华梅, 等. 杨桃多酚氧化酶的提取研究[J]. 河北农业科学, 2009, 13(12): 29-30.
- [5] 李立祥, 吴红梅. 提取方法对茶多酚氧化酶活性的影响[J]. 中国茶叶加工, 2001(4): 26-31.
- [6] 刘雅嘉, 李炜, 衣杰荣. 香菇多酚氧化酶酶学特性的研究[J]. 食品工业科技, 2009(1): 183-188.
- [7] 周春梅, 王欣, 王俊城, 等. 白玉菇多酚氧化酶的酶学特性[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(5): 5-8.
- [8] 李新华, 高路. 紫甘薯多酚氧化酶酶促反应最适条件的研究[J]. 粮油食品科技, 2008, 16(3): 42-45.
- [9] VAUGHN K C, LAX A R, DUKE S O. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function[J]. *Physiologia Plantarum*, 1988, 72: 659-665.
- [10] 黄海霞, 张真, 吴金芝. 小麦多酚氧化酶特性及褐变控制研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(31): 13574-13575;13638.
- [11] 朱凤妹, 杜彬, 李军, 等. 榆黄菇多酚氧化酶的性质及抑制研究[J]. 食品科技, 2008(6): 6-22.
- [12] 张亮. 魔芋多酚氧化酶的提取纯化、特性及对多糖流变性的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [13] 汤凤霞, 魏好程, 曹禹. 芒果多酚氧化酶的特性及抑制研究[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 156-160.
- [14] 涂勇刚, 谢明勇, 田颖刚, 等. 泰和乌骨鸡黑色素光谱性质及其稳定性研究[J]. 食品科技, 2008(5): 171-175.
- [15] 罗志刚, 杨连生, 姜绍通, 等. 抗坏血酸和亚硫酸钠在甘薯破碎中抗褐变的研究[J]. 食品工业科技, 2002(5): 52-53.