

芦荟多酚氧化酶特性的研究*

沈金玉 黄家音 李晓莉

(清华大学化工系, 北京, 100084)

摘要 研究了芦荟多酚氧化酶的基本性质。以邻苯二酚为底物, 采用分光光度法在 410nm 处测定芦荟多酚氧化酶的活性, 研究了温度、pH 值、底物浓度以及酶浓度对其活性的影响, 并建立了酶促褐变反应动力学方程。实验结果表明, 芦荟多酚氧化酶的最适温度为 40℃, 最适 pH 值为 6.5, 其酶促褐变反应动力学符合米氏方程所描述的单底物酶促反应动力学, 相应的动力学参数 $K_m = 0.28 \text{ mol/L}$, $V_{\max} = 2.32 \times 10^{-2} \text{ U/min}$ 。文中还研究了利用蛋白酶抑制褐变的方法, 以芦荟多酚氧化酶液 (mL): 木瓜蛋白酶 (mL, 浓度 0.5 mg/mL) = 5:1 的比例向芦荟多酚氧化酶粗酶液中添加木瓜蛋白酶, 在 55℃、pH 5.7 条件下, 水解 10 min 可较好地抑制多酚氧化酶的活性, 从而抑制芦荟的酶促褐变。

关键词 芦荟, 酶促褐变, 多酚氧化酶, 木瓜蛋白酶

酶促褐变是果蔬深加工过程中普遍存在的严重问题。在果蔬产品的深加工过程中, 其内部的多酚类物质在多酚氧化酶的催化下氧化, 生成醌类化合物, 该化合物进一步聚合形成复杂的聚合物——黑素, 从而导致果蔬制品的褐变^[1]。

多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, 简称 PPO) 的系统命名是邻二酚: 氧-氧化还原酶 (E1, 10, 3, 1), 是以铜离子为辅基, 以氧气为受氢体的一种末端氧化酶^[2]。文中以芦荟为对象, 主要研究芦荟多酚氧化酶的特性及其影响芦荟制品酶促褐变的主要因素。

根据 Labuza 等报道^[3], 有 3 种植物蛋白酶: 无花果蛋白酶 (ficin)、木瓜蛋白酶 (papain) 和菠萝蛋白酶 (bromelain) 被证实对酶促褐变抑制效果明显。文中采用木瓜蛋白酶对芦荟酶促褐变的抑制作用进行探索性研究。

1 材料、仪器与实验方法

1.1 实验材料

芦荟 (美国库拉索品种), 购于清华大学照澜院花市。木瓜蛋白酶 (12 u/mg), 购于北京欣经科生物技术公司。

邻苯二酚、丙酮、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、无水乙酸钠、冰醋酸、甘氨酸、HCl、Tris 等均为分析纯, 购于北京中关村化学试剂商店。

1.2 实验仪器

XHF-1 高速分散器 (上海兴华电子仪器厂),

KUBOTA 6930 高速冷冻离心机 (日本 KUBOTA 公司), 8453 紫外可见分光光度系统 (安捷伦科技有限公司), 电热恒温水浴锅 (天津市泰斯特仪器有限公司), PHS-3B 精密 pH 计 (上海精密科学仪器有限公司雷磁仪器厂), 85-1 恒温磁力加热搅拌器 (金坛市新佳仪器厂), SHB-III 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司), Sartorius 千分之一电子天平 (北京赛多利斯天平有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 芦荟 PPO 粗酶液的制备^[4]

取新鲜芦荟叶片 100 g, 去皮、捣碎, 以 1:2 (w/v) 的比例加入冷冻丙酮 (-20°C) 沉淀, 抽滤后将滤渣溶于适量 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中, 加入冷冻丙酮再沉淀 1 次。将第 2 次沉淀所得的悬浮液在 4°C 条件下, 8000 r/min 离心 15 min, 除去上清液, 将沉淀风干后制得粗丙酮粉, 于 4°C 冰箱中保存备用。取 1 g 粗丙酮粉, 溶于 20 mL pH 6.8 磷酸盐缓冲液中, 搅拌约 10 min 混合均匀。在 4°C 条件下, 10000 r/min 离心 10 min, 所得上清液即为实验所需要的芦荟 PPO 粗酶液。

1.3.2 芦荟 PPO 活性的测定^[5]

以 2 mL pH 6.8 磷酸盐缓冲液和 2 mL 0.1 mol/L 邻苯二酚溶液的混合液为底物, 加入 0.5 mL 粗酶液反应 5 min 后, 于 410 nm 处测定产物 OD 值, 以 OD 值的大小表示芦荟 PPO 活性的大小。酶活力单位定义为: 在最适温度、最适 pH 条件下, 每 mmol/L 底物浓度每分钟增加 0.001 吸光度所需要的酶量, 为 1 个酶活力单位。

第一作者: 学士, 副教授。

* 江苏省科技发展计划经费资助 (No. BE2003380)

收稿时间: 2004-12-03

2 结果与讨论

2.1 芦荟 PPO 反应进程曲线的测定

以 1 min 的时间间隔测定 0~10 min 的芦荟 PPO 活性(用吸光度表示),做出反应进程曲线,如图 1 所示。

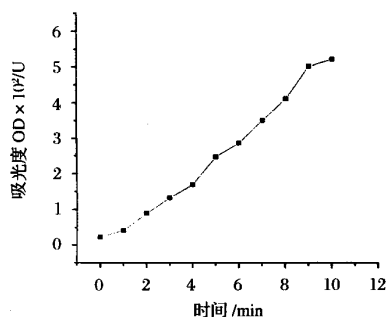


图 1 反应进程曲线

反应进程曲线上每一点的斜率就是该点相应时刻的反应速度。由图 1 可以看出,在初期,反应产物的吸光度比较小,表示褐变程度并不十分明显。但是,反应产物的吸光度随着时间的延长几乎成线性增长,说明芦荟 PPO 的活性始终维持在最初的水平,并没有随着时间的延长而下降,当达到一定的时间时,芦荟制品的褐变问题就会显现出来。

2.2 温度对芦荟 PPO 活性的影响

分别在 20℃、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃ 条件下测定芦荟 PPO 活性,吸光度随温度的变化曲线如图 2 所示。

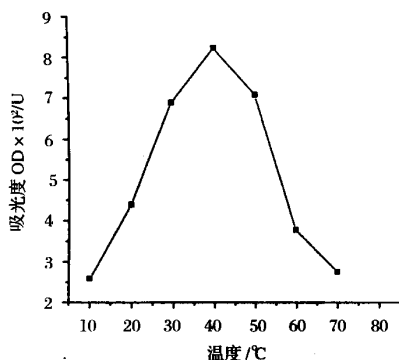


图 2 吸光度随温度变化曲线

由图 2 可以看出,芦荟 PPO 在 30~50℃ 具有较高的活性,其最适反应温度为 40℃,当温度达到 70℃ 后,芦荟 PPO 几乎完全失活。这是因为随着温度的升高,芦荟 PPO 变性,从而使其活性减弱。由此可见,芦荟 PPO 不是耐热的酶。因此,在较高温度条件

下处理即可使酶变性失活,在一定程度上可以抑制其酶促褐变发生。

2.3 pH 值对芦荟 PPO 活性的影响

用甘氨酸-HCl 缓冲液、NaAc-HAc 缓冲液、Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液及 Tris-HCl 缓冲液调整反应体系的 pH 值分别为 2.4、4.2、4.95、6.15、6.2、6.5、7.07、7.61、8.5、9.1,在 40℃ 下测定芦荟 PPO 活性,如图 3 所示。

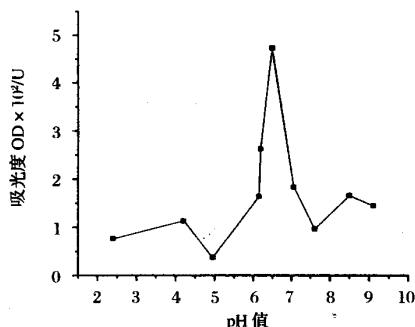


图 3 吸光度随 pH 值变化曲线

由图 3 可见,芦荟 PPO 在中性条件下具有较高的活性,其最适 pH 值为 6.5。这是因为其酶的活性部位含有组氨酸基团(pK=6.0),所以在中性条件下表现出较高的酶活性。此外,在酸性条件下,对酶的辅基铜离子的稳定性有利;在碱性条件下,铜离子以 Cu(OH)₂ 的形式沉淀出来,酶的活性受到抑制。图 3 中,pH 3~5 和 pH 8~9 范围内出现 2 个小峰,可能是由于存在同工酶产生的效应所致。

2.4 底物浓度对芦荟 PPO 活性的影响

以 0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.15 和 0.2 mol/L 邻苯二酚溶液为底物,在 40℃、pH 6.45 测定不同底物浓度时产物吸光度随时间的变化,并分别拟合所得直线斜率即为反应初速度 v_0 ,如图 4 所示。

做出反应初速度 v_0 随邻苯二酚浓度的变化曲线,如图 5 所示。

可以看出,芦荟 PPO 所催化的酶促褐变反应的反应初速度随底物浓度的变化曲线类似于米氏方程所描述的反应初速度随底物浓度的变化规律,对实验结果进行相应地处理进行验证。

米氏方程 $v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$ 可转化为 $\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}[S]}$ 形式。对实验结果进行处理做出 $1/v_0 \sim 1/[S]$ 图,如图 6 所示。

拟合直线相关系数达到 0.9987,可见芦荟 PPO

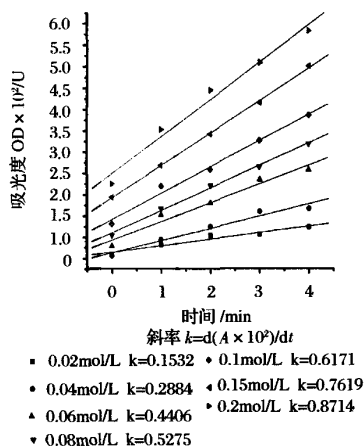


图4 不同邻苯二酚浓度下吸光度随时间变化图

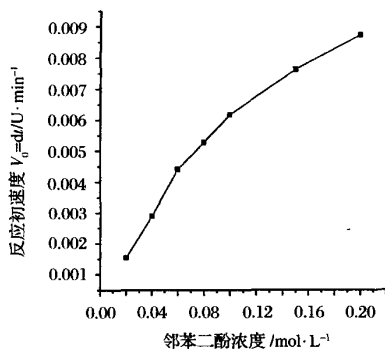
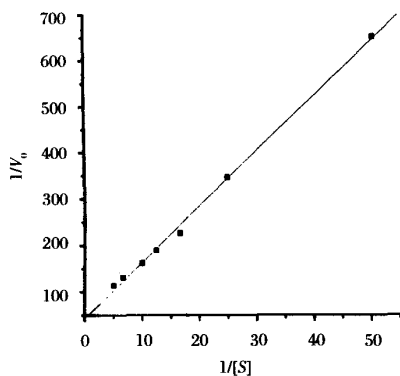


图5 反应初速度随邻苯二酚浓度变化曲线

图6 $1/v_0 \sim 1/[S]$ 图

的酶促褐变反应动力学符合米氏方程。根据直线斜率和截矩可求得该反应的米氏常数 $K_m = 0.28 \text{ mol/L}$, 最大反应速度 $V_{\max} = 2.32 \times 10^2 (\text{U/min})$, 相应的动力学方程为 $v = \frac{2.3172 \times 10^2 \cdot [S]}{0.2803 + [S]} (\text{U/min})$ 。

2.5 酶浓度对芦荟 PPO 活性的影响

反应液总体积维持在 4.5 mL 的前提下改变酶液添加量, 分别测定不同酶浓度下芦荟 PPO 的活性。

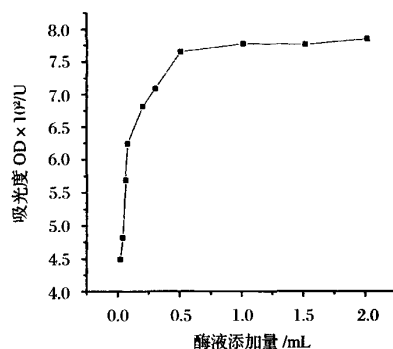


图7 吸光度随酶浓度的变化曲线

由图7可以看出, 在酶浓度较低的情况下, 酶活性几乎随酶浓度的增加而呈线性增长。当酶液添加量达到 0.1 mL 时, 酶活性也的增长趋势变得较为缓慢; 当酶液添加量达到 0.5 mL 以上时, 即使再增加酶浓度, 酶活性没有明显的提高。因此, 对于该酶促反应存在一个适宜酶浓度, 当酶浓度和酶活力达到最佳比值时, 即可获得较高的酶活又可使酶液充分发挥作用。

2.6 温度和 pH 值对木瓜蛋白酶抑制效果的影响

取 0.5 mL 芦荟 PPO 粗酶液, 加入 0.1 mL 木瓜蛋白酶 (1 mg/mL), 在不同温度下进行水解反应。水解 10 min 后, 于 40℃、pH6.45 条件下测定芦荟 PPO 剩余活性 u_2 。同时测定相同条件下未经水解反应的芦荟 PPO 活性 u_1 作为对照, 根据 $\eta = \frac{u_1 - u_2}{u_1}$ 计算抑制程度, 结果如图8和图9所示。

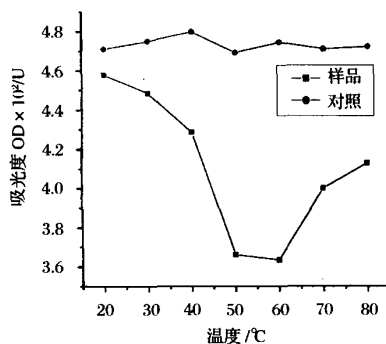


图8 吸光度随温度的变化图

用 NaAc-HAc 缓冲液、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液调节水解反应体系的 pH 值分别为 4.5、5、5.7、6.1、6.7。水解 10 min 后, 于 40℃、pH6.45 条件下测定芦荟 PPO 剩余活性, 同时测定相同条件下未经水解反应的 PPO 活性作为对照, 计算抑制程度, 结果如图10和图11所示。

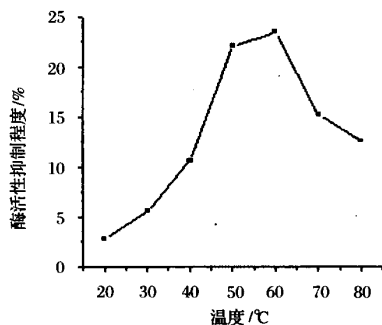


图9 抑制程度随温度的变化曲线

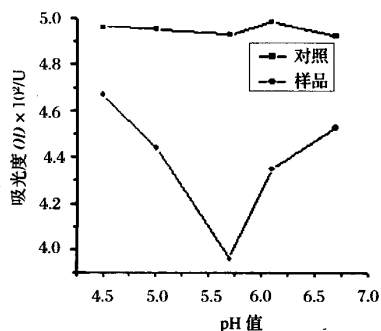


图10 吸光度随pH值的变化图

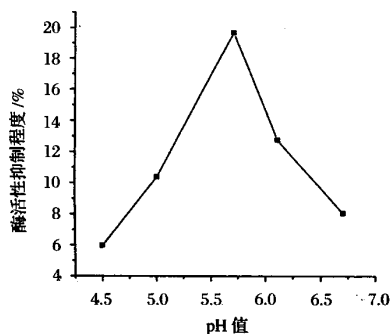


图11 抑制程度随pH的变化曲线

由图10和图11可以看出,以芦荟PPO为底物时,在55℃,pH5.7时木瓜蛋白酶达到最大活性,此时对芦荟酶促褐变的抑制效果是最好的。

2.7 木瓜蛋白酶添加量及水解时间对抑制效果的影响

测定不同木瓜蛋白酶浓度、不同水解时间条件下的剩余酶活性。以对照样品的酶活作为水解时间为0时刻的点,作出不同木瓜蛋白酶浓度下剩余酶活随水解时间的变化曲线,结果如图12所示。

由此可见,木瓜蛋白酶对芦荟褐变的抑制效果随着水解时间的延长而提高。这是因为水解时间越长,木瓜蛋白酶对芦荟PPO的水解进行得越彻底,使得

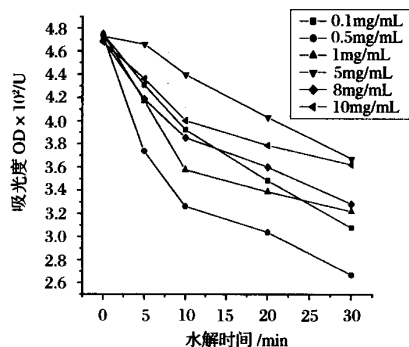


图12 吸光度随水解时间变化曲线

剩余的芦荟PPO活性越低,从而达到较好的抑制褐变的效果。不过在水解10 min以后,再延长时间对于提高抑制效果作用不是很明显,因此选择10 min作为酶法处理的时间参数。

对于水解10 min所得的结果计算不同木瓜蛋白酶浓度下的褐变抑制程度,作出抑制程度随木瓜蛋白酶浓度的变化曲线,如图13所示。

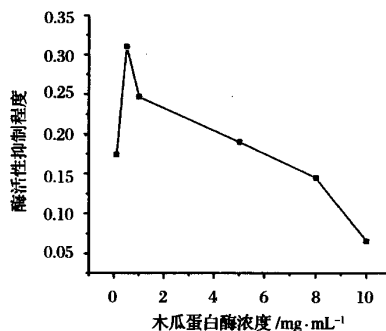


图13 抑制程度随蛋白酶浓度的变化曲线

当木瓜蛋白酶浓度较低时,增加其浓度可以提高抑制程度。但是当木瓜蛋白酶浓度过高时,抑制效果反而降低。这可能是因为浓度过高时,木瓜蛋白酶的蛋白质本身之间互相包埋形成包含体,将其活性部位包含在内部从而使蛋白酶的活性降低。在本实验条件下,木瓜蛋白酶的适宜添加比例为芦荟PPO酶液(mL):木瓜蛋白酶(mL,浓度为0.5 mg/mL)=5:1。

3 结 论

(1) 芦荟PPO不是很耐热的酶,其最适温度为40℃,最适pH值为6.5。

(2) 当芦荟PPO浓度较低时,酶促反应的初速度随酶浓度的增加而线性增长,但是当芦荟PPO浓度增加到一定程度时,其反应速度的增长趋势逐渐趋于平缓。

(3)芦荟 PPO 酶促褐变反应动力学符合米氏方程所描述的单底物酶促反应动力学,其反应速度与底物浓度的关系为:
$$v = \frac{2.3172 \times 10^2 \cdot [S]}{0.2803 + [S]} \text{ (U/min)}.$$

(4)以芦荟 PPO 为底物时,木瓜蛋白酶的最适温度为 55℃,最适 pH 值为 5.7,芦荟 PPO(mL):木瓜蛋白酶(mL,浓度 0.5 mg/mL)=5:1,水解 10 min 可达到较佳的抑制效果。

参 考 文 献

1 刘开华,邢淑婕. 浅析果蔬加工中酶促褐变的控制[J]. 信

阳农专学报, 1997, 7(3): 21~23

2 王璋. 食品酶学[J]. 北京:中国轻工业出版社, 1990

3 Labuza T P, Lillemo J H, Taoukis P S. Inhibition of polyphenol oxidase by proteolytic enzymes[J]. Fruit Processing, 1992, (2): 9~13

4 陈学红,秦卫东,高卉,赵家吉. 莴苣中多酚氧化酶特性的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(3): 29~32

5 诺卡基,杨方琪,高福成. 广东芝麻香蕉加工中的酶褐变研究(I)——多酚氧化酶的提取、分离及其特性研究[J]. 无锡轻工业学院学报, 1994, 13(1): 10~20

Study on Characteristics of Polyphenol Oxidase from Aloe

Shen Jinyu Huang Jiayin Li Xiali

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing, 100084, China)

ABSTRACT The properties of polyphenol oxidase extracted from aloe were investigated in this paper. The aloe polyphenol oxidase activities were spectrophotometrically determined at 410nm with catechol as substrate in different pH, temperature, substrate concentration and enzyme concentration. The reaction kinetic equation was also established in this study. Our results showed that the optimum temperature and pH of aloe polyphenol oxidase's was 40℃ and pH6.5, respectively. The reaction kinetic of enzymatic browning is accordant with Michaelis equation, the K_m and V_{max} were 0.28 mol/L and 2.32×10^{-2} U/min, respectively. This paper also studied the inhibition effect of aloe polyphenol oxidase with proteases. Adding papain to aloe polyphenol oxidase with the proportion of polyphenol oxidase (mL):papain(mL, 1mg papain in 1 mL phosphate buffer) = 5:1, thus resulted in the inhabitation of the aloe enzymatic browning.

Keywords aloe, enzymatic browning, polyphenol oxidase, papain

行业动态

丹麦酿酒工业企业联合会酒精酿造技术研讨会在京举行

2005年3月21~22日,丹麦酿酒工业企业联合会在北京召开了主题为“新技术——提高酒精生产企业盈利能力”的酒精酿造技术研讨会。该联合会成立于2003年,是由全球酿酒行业领先的技术和设备供应商所组成的策略性推广联盟组织。它旨在通过推广高新技术,促进中国酒精工业的发展。联合会成员分别是:

诺维信(中国)投资有限公司:世界酶制剂和微生物领域的先导,开发有适合高浓酒精发酵的液化酶和针对生醪发酵工艺的低温淀粉酶和糖化酶。阿法拉伐(上海)技术有限公司:是一家提供工业设备及工程的全球领先的供应商,可为优化客户工艺而专门提供设备单机、系统及服务。格兰富水泵(上海)有限公司:是一家处于领先地位的国际性水泵及其系统供应商。威立雅水处理技术(上海)有限公司:克鲁格公司是威立雅水务集团下属的子公司之一,是一家致力于环境工程的国际公司,研发产品威力雅环境系统是提供环境服务的领头羊。丹佛斯(上海)自动控制有限公司:是在研究、开发和生产精密机械以及电子元器件属于领先地位的制造商之一。由宁二氧化碳国际贸易(上海)有限公司:由宁工程公司设计和制造二氧化碳装置,并应用在不同的工业领域。阿特拉-斯托得公司:公司的业务在于将酒精生产中的副产品加工成为有市场价值的饲料。汤姆莎-德士提公司:专业从事酒精蒸馏及其副产品利用的国际化企业。

与会的联合会成员企业作了专题演讲,分别介绍了各自公司的先进技术与设备。丹麦酿酒工业企业联合会愿为中国的酒精生产企业在进一步降低成本,提高生产效率,保护环境,节水节能和竞争力方面提供全面的帮助,并期待与中国酒精酿造企业进行更加广泛的交流与合作。