

康娟, 庄尹宏, 林碧英, 等. 丝瓜多酚氧化酶及过氧化物酶酶学特性的研究 [J]. 福建农业学报, 2017, 32 (8): 854—858.

KANG J, ZHUANG Y-H, LIN B-Y, et al. Polyphenol Oxidase and Peroxidase in *Luffa cylindrica* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 32 (8): 854—858.

丝瓜多酚氧化酶及过氧化物酶酶学特性的研究

康娟, 庄尹宏, 林碧英*, 温庆放, 温文旭, 朱海生*

(1. 福建农林大学园艺学院, 福建 福州 350002; 2. 福建省农业科学院作物研究所, 福建 福州 350013; 3. 福建省农业科学院蔬菜研究中心, 福建 福州 350013)

摘 要: 应用分光光度法研究丝瓜多酚氧化酶及过氧化物酶酶学特性的影响因素, 为丝瓜酶促褐变的研究提供基础。以普通丝瓜果肉为材料, PPO 以邻苯二酚为底物, POD 以愈创木酚为底物, 研究分析反应温度、反应时间、pH 及测量波长、底物的浓度、PPO 提取酶液添加量对丝瓜 PPO、POD 活性的影响。丝瓜褐变相关酶提取和测定方法的优化: (1) PPO 最佳反应体系: 测定波长 408 nm、反应温度是 35℃、pH 为 6.0、酶液用量 0.15 mL, 最适底物为邻苯二酚, 底物浓度为 0.056 mol·L⁻¹; (2) POD 最佳反应体系: 测定波长 410 nm, 反应温度为 40℃, 最佳 pH 为 5.5, 酶液用量 0.1 mL, 底物是愈创木酚, 浓度为 0.067 mol·L⁻¹。

关键词: 丝瓜, 酶促褐变, 多酚氧化酶, 过氧化物酶, 酶学特性

中图分类号: S 642.4

文献标识码: A

文章编号: 1008—0384 (2017) 08—854—05

Polyphenol Oxidase and Peroxidase in *Luffa cylindrica*

KANG Juan, ZHUANG Yin-hong, LIN Bi-ying*, WEN Qing-fang, WEN Wen-xu, ZHU Hai-sheng*

(1. College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China;
2. Crops Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China;
3. Vegetable Research Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: Factors affecting the properties of polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) in luffa (*Luffa cylindrica*) were studied for information relating to enzymatic browning of the vegetable. The temperature, time duration, pH, and concentrations of the substrates, i. e., catechol for PPO activity and guaiacol for POD activity determinations, applied for the reaction as well as the wavelength used for the spectrophotometric color measurements were analyzed. The results indicated that (1) the optimum reaction system for PPO activity determination required the applications of wavelength at 408 nm for the spectrophotometry, a temperature at 35, a pH of 6.0, and an enzyme dosage of 0.15 mL with 0.056 mol·L⁻¹ catechol; and, (2) the optimum reaction system for POD, wavelength at 410 nm, a temperature at 40, a pH of 5.5, an enzyme dosage of 0.1 mL with 0.067 mol·L⁻¹ guaiacol.

Key words: *Luffa cylindrica*; enzymatic browning; PPO; POD; enzyme properties

丝瓜 *Luffa cylindrica* 作为一种经济价值较高的农作物, 主要栽培于温带和亚热带地区, 在我国南、北各地早已形成规模化种植。丝瓜适应性强, 耐热、耐湿、抗逆性强^[1], 营养价值很高, 且具有很好的医疗保健功能。然而, 在加工和运输过

程中丝瓜果肉极易褐变, 严重影响丝瓜产品的商品价值和食用价值^[2-3]。丝瓜的褐变属于酶促褐变, 其褐变的主要原因是丝瓜受到碰撞、摩擦、加热等因素刺激时, 活性氧增加, 损坏其细胞结构, 液泡中的酚类物质在细胞质中的酚类氧化酶的催化下氧

收稿日期: 2017-01-12 初稿; 2017-05-14 修改稿

作者简介: 康娟 (1993-), 女, 硕士研究生, 主要从事蔬菜栽培与生理生化研究

* 通讯作者: 林碧英 (1963-), 女, 教授, 主要从事蔬菜与设施园艺研究 (Email: lby3675878@163.com);

朱海生 (1978-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事蔬菜分子育种研究 (Email: zhs0246@163.com)

基金项目: 福建省科技计划——省属公益类科研院所基本科研专项 (2017R1026-6); 福建省农业科学院创新团队 PI 项目 (2016PI-40); 福建省农业科学院创新项目 (2015QC-6、PC2017-7); 福建省农业科学院作物研究所基金项目 (2015QN-1)

化形成醌，醌聚合形成黑色或褐色沉淀^[4-5]。酶促褐变是植物组织主要的褐变类型，一直是采后研究的重点。在褐变发生时，酶是褐变发生的重要影响因素和必备条件之一，

多酚氧化酶（PPO）是一类广泛分布于植物体中能催化酚类物质氧化成醌类的一种含铜的结合酶，被认为是酶促褐变过程中最主要的酶。多酚氧化酶活性的增高常伴随着褐变的发生，同时褐变程度与活性呈正相关。一般在植物的幼嫩组织含量较高，成熟衰老的部位含量较低^[6]，且不同植物 PPO 的特性各不相同^[7-8]。过氧化物酶（POD）是存在于植物组织中的一种活性较高的氧化还原酶^[9]。POD 在酶促褐变中常常辅助 PPO 进行酶促反应，在 H₂O₂ 存在时，POD 可催化类黄酮和酚类等物质的氧化和聚合形成褐色物质^[10]，从而使得组织发生褐变。本研究分析并明确丝瓜 PPO 及 POD 的酶学特性，为丝瓜褐变研究及果蔬褐变中酶的功能作用奠定了基础，并有利于通过控制酶促反应的条件、切断反应途径抑制褐变，从而找到抑制褐变的方法并创制出控制褐变的果蔬新品种。

1 材料与方法

1.1 试验材料与设备

材料：从福建省福清市东张基地选取大棚栽培的 62 个品种（系）作为供试材料（表 1）。选择无病虫害、无机械损伤、无畸形的丝瓜，进行清洗，快速削皮分装于保鲜袋中，液氮速冻后放置于-80℃冰箱中备用。

试剂：PVPP、柠檬酸、NaH₂PO₄、邻苯二酚、PEG、PVP、TriTonX-100、愈创木酚、30% H₂O₂、HCL、EDTA。

反应混合液：pH = 6.0、0.1 mol · L⁻¹ 的 NaH₂PO₄-柠檬酸缓冲液，pH = 6.0、0.05 mol · L⁻¹ 的邻苯二酚溶液，0.025 mol · L⁻¹ 愈创木酚溶液，0.5 mol · L⁻¹ 过氧化氢溶液（现配）。

设备：DK-8D 型电热恒温水浴锅、紫外可见光分光光度计（UV-754）、电子分析天平（OHAUS）、高速台式冷冻离心机（HITACHICR 21GⅢ型）、超声波清洗机（KQ-400D）、磁力搅拌器，酸度计（OHAUS），光照培养箱，制冰机。

1.2 试验方法

1.2.1 粗酶液的制备 将冷冻丝瓜清洗干净后去皮，称取 2 g 果肉至于研钵上，加 5 mL pH 为 6.0 的 NaH₂PO₄-柠檬酸缓冲液，再加少许 pvpp 在冰上快速研磨成匀浆，12 000 r · min⁻¹ 于 4℃ 超低温

冷冻离心机上离心 30 min，上清液即为粗酶液。蒸馏水透析过夜，4℃ 保存。

表 1 供试材料
Table 1 Material applied

自编号	材料	栽培类型	自编号	材料	栽培类型
1	5	有棱丝瓜	32	65	普通丝瓜
2	29	有棱丝瓜	33	160	普通丝瓜
3	38	有棱丝瓜	34	159	普通丝瓜
4	43	有棱丝瓜	35	68	普通丝瓜
5	45	有棱丝瓜	36	37	普通丝瓜
6	48	有棱丝瓜	37	92	普通丝瓜
7	60	有棱丝瓜	38	30	普通丝瓜
8	69	有棱丝瓜	39	A2	普通丝瓜
9	77	有棱丝瓜	40	A4	普通丝瓜
10	78	有棱丝瓜	41	A1×A5	普通丝瓜
11	80	有棱丝瓜	42	A5	普通丝瓜
12	85	有棱丝瓜	43	A1	普通丝瓜
13	87	有棱丝瓜	44	A1×A3	普通丝瓜
14	89	普通丝瓜	45	A6	普通丝瓜
15	97	有棱丝瓜	46	12	普通丝瓜
16	110	有棱丝瓜	47	8	普通丝瓜
17	113	普通丝瓜	48	LA1	普通丝瓜
18	114	普通丝瓜	49	Y3	普通丝瓜
19	126	普通丝瓜	50	L3	普通丝瓜
20	127	有棱丝瓜	51	LA1×A3	普通丝瓜
21	128	有棱丝瓜	52	YA1×A3	普通丝瓜
22	133	有棱丝瓜	53	Y151	有棱丝瓜
23	142	普通丝瓜	54	Y89	普通丝瓜
24	144	有棱丝瓜	55	L38	有棱丝瓜
25	S151	有棱丝瓜	56	L 黑 10	普通丝瓜
26	158	有棱丝瓜	57	L89	普通丝瓜
27	黑 10	普通丝瓜	58	L151	有棱丝瓜
28	黑 13	普通丝瓜	59	S3	普通丝瓜
29	黑 12	普通丝瓜	60	Y 黑 10	普通丝瓜
30	6	有棱丝瓜	61	44	普通丝瓜
31	61	普通丝瓜	62	Y38	普通丝瓜

1.2.2 酶测定方法 PPO 酶测定^[11]：用 0.1 mol · L⁻¹ 的 NaH₂PO₄-柠檬酸缓冲液配制浓度为 0.1 mol · L⁻¹ 的邻苯二酚反应底物，将 4 mL 0.05 mol · L⁻¹ 的 NaH₂PO₄-柠檬酸缓冲液与 1 mL 邻苯二酚溶液混匀，以 NaH₂PO₄-柠檬酸缓冲液为对照组，加入 4℃ 保存的 PPO 酶液。35℃ 下反应 15 s，

立刻测定 5 min 内在 420 nm 处 OD 值变化,每隔 30 s 记录 1 次。3 次重复。以每分钟吸光值的变化 ($\Delta_{OD420\text{ nm}}$ 值) 为 1 个 PPO 酶活单位。

POD 酶测定^[12]: 用 $0.05\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaH_2PO_4 -柠檬酸缓冲液分别配制浓度为 $0.025\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 愈创木酚溶液和 $0.5\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 过氧化氢溶液,取 3 mL $0.025\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 愈创木酚溶液和 0.5 mL POD 粗酶液,再加 0.2 mL 过氧化氢溶液迅速混合反应,以 NaH_2PO_4 -柠檬酸缓冲液为对照组,测定 3 min 内波长 470 nm 处的 OD 值,每 30 s 记录 1 次。以每分钟吸光值的变化 ($\Delta_{OD470\text{ nm}}$ 值) 计算酶活力。

1.2.3 PPO 及 POD 酶反应时间的影响研究 利用 1.2.2 测定方法,将反应溶液和酶液混匀后,立即测定多酚氧化酶及过氧化物酶在 6 min 内的吸光度,每 30 s 测 1 次。

1.2.4 PPO 及 POD 酶最佳测定波长的研究 同 1.2.2 测定方法,扫描丝瓜 PPO 产物和 POD 产物在 380~480 nm 间的吸光度,每 10 nm 测定 1 次 OD 值,绘制吸收图,确定其最大吸收波长。

1.2.5 pH 对丝瓜 PPO 及 POD 活性的影响 配制 pH 分别为 3.6、4.6、5.6、6.0、6.6、7.0、7.6、8.0 的 NaH_2PO_4 -柠檬酸缓冲液,测定 pH 值对 PPO 及 POD 活性的影响,试验重复 3 次。

1.2.6 PPO 及 POD 酶最适反应温度的研究 反应混合液混匀后分别在 15、20、25、30、35、40、45、50℃ 在水浴锅中预热 3 min 后测定其吸光度,研究反应温度与 PPO 及 POD 活性的相关性。

1.2.7 底物浓度对 PPO 及 POD 活性的影响 分别配制浓度为 0.011、0.022、0.033、0.044、0.056、0.067、0.078 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的邻苯二酚溶液和愈创木酚溶液,加入到 PPO 及 POD 对应反应混合液中,于 30℃ 和 45℃ 下各自水浴 3 min 后测定吸光度。3 次重复。

1.2.8 酶液量对 PPO 及 POD 活性的影响 同 1.2.2 方法,在 NaH_2PO_4 -柠檬酸缓冲液与底物的混合液中,分别加入 50、100、150、200、250、300 μL 的 PPO 及 POD 粗酶液,在 30℃ 和 45℃ 下水浴 3 min 后测定吸光度。绘制图。

2 结果与分析

2.1 测定波长对 PPO 及 POD 活性的影响

在 380~480 nm 进行了波峰扫描,由图 1 可以看出,PPO 酶活性反应产物的吸光度在 380~410 nm 内逐渐增大,在 408 nm 处达到最大值,OD 值为

0.242,之后随着吸收波长增大,吸光度逐渐下降,无其他杂质干扰。POD 酶活性反应产物的吸光度随着吸收波长的增大呈先上升后下降的趋势,在 410 nm 处达到最大,OD 值为 0.351,之后平缓降低。PPO 与 POD 的酶活性最佳测定波长基本相同。

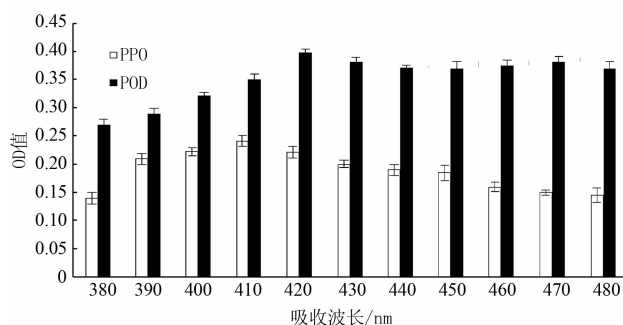


图 1 测定波长对 PPO 及 POD 活性的影响

Fig. 1 Effect of wavelength on PPO and POD activity measurements

2.2 反应时间对 PPO 及 POD 活性的影响

利用 1.2.2 测定方法,立即测定 30 s 至第 56 min 的吸光度。由图 2 可知,PPO 在反应前 2.5 min 内 OD 值变化很快,2.5 min 时吸光度达到最大,OD 值为 0.221,表明初始阶段反应速度很快,之后随着反应时间的进行,反应速度降低,吸光度变化幅度减小。POD 在前 4.5 min 内反应时间与速度呈正相关,在 5 min 时吸光度达到最大值 0.556,之后变化幅度不大。综上,在测定丝瓜酶活性变化时,PPO 以前 2.5 min 为准,POD 以前 4.5 min 为准。

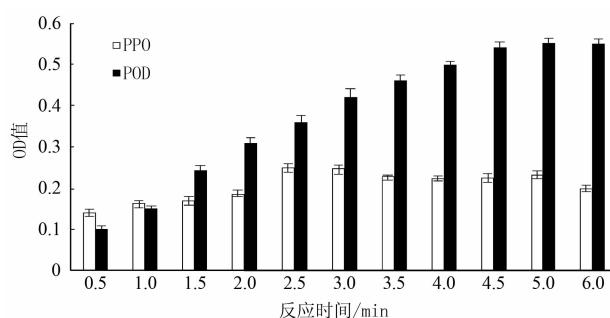


图 2 丝瓜 PPO 及 POD 反应进程

Fig. 2 PPO and POD reaction curves

2.3 pH 对 PPO 及 POD 活性的影响

pH 对 PPO 及 POD 活性的影响如图 3。由图 3 可知,丝瓜 PPO 及 POD 的活性随 pH 的变化而变化。在 pH 3.6~6.8,丝瓜 PPO 的活性随 pH 的增加而不断升高,当 pH 值为 6.0 时酶反应产物的吸光度达到最大值为 0.378,酶的活性最高;在

pH 值 6.0~8.0 范围内丝瓜 PPO 的活性随 pH 的增加而下降。丝瓜 POD 的活性, 总体在酸性条件下更高, 酶活性随着酸度的减小而增强, pH 5.5 时达到最高, 肩峰为 pH 7.0。

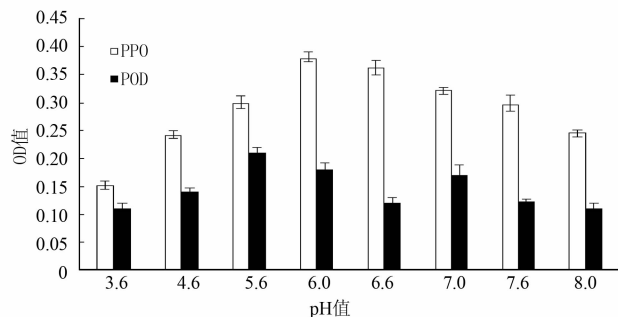


图 3 pH 对 PPO 及 POD 活性的影响

Fig. 3 Effect of reaction pH on PPO and POD activities

2.4 温度对 PPO 及 POD 活性的影响

由图 4 可知, 在 30~45℃ 内吸光度较高, 其中 PPO 在 35℃ 时吸光度达到最大, 活性最高, 表明其最适温度为 35℃。温度对 POD 活性的影响, 在 30、40℃ 时酶活性较高, 40℃ 达最大值, 此后酶活随温度的升高逐渐下降, 丝瓜 POD 的最适温度为 40℃。

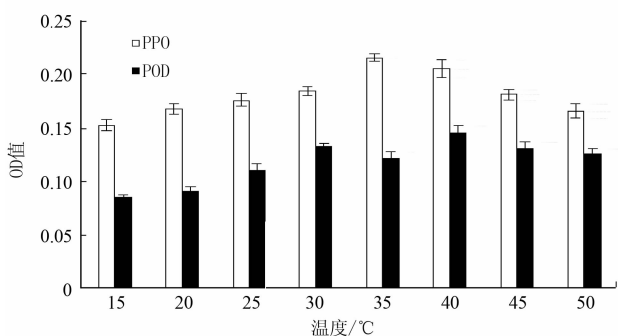


图 4 温度对 PPO 及 POD 活性的影响

Fig. 4 Effect of reaction temperature on PPO and POD activities

2.5 底物浓度对 PPO 及 POD 活性的影响

底物 (酚类物质)、酶和氧是酶促褐变形成的 3 个物质条件^[13]。由图 5 可知, 在酶液浓度一定时, 当底物浓度为 0.011~0.056 mol·L⁻¹ 时, PPO 活性随着底物浓度的增加而增加, 增幅较大; 当底物浓度≥0.056 mol·L⁻¹ 时, 吸光度变化幅度较小, PPO 活性趋于稳定。在底物浓度为 0.011~0.056 mol·L⁻¹ 范围内, POD 活性随着底物浓度的增加而缓慢增大, 之后急剧增加, 在 0.067 mol·L⁻¹ 时吸光度达到最大。

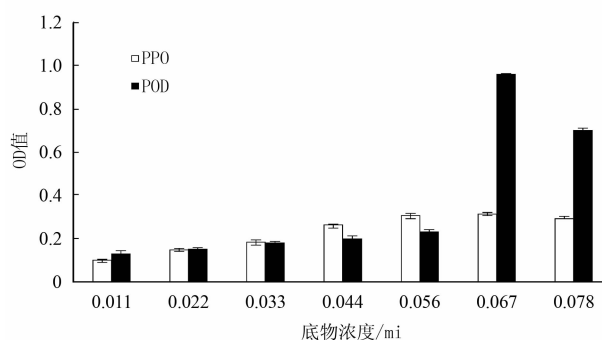


图 5 底物浓度对 PPO 及 POD 活性的影响

Fig. 5 Effect of substrate concentration on PPO and POD activity determinations

2.6 酶液量对 PPO 及 POD 活性的影响

如图 6 所示, 在底物浓度不变时, PPO 活性随着酶液加入量的增多而增加, 在 0.15 mL 时吸光度达到最大, 总体变化幅度不大。POD 活性随酶液加入量的增加而急剧增加, 在酶液加入量 0.1 mL 时 OD 值达到最大, 而后随着酶液量的增加逐渐降低, 反应速度与酶液量基本上呈正相关。

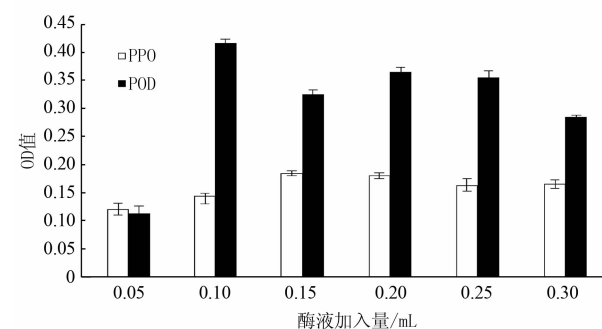


图 6 酶液量对 PPO 及 POD 活性的影响

Fig. 6 Effect of enzyme concentration on PPO and POD activity determinations

3 讨论与结论

植物组织中 PPO 及 POD 都具有各自明显紫外吸收特征, 不同植物不同组织中 PPO 与 POD 其紫外吸收波峰也不尽相同^[14]。丝瓜果实 PPO 及 POD 的最大吸收波峰分别为 408 nm 和 410 nm, 这与黄树萍^[15]等对丝瓜的研究结果接近。当以邻苯二酚为底物, 浓度为 0.056 mol·L⁻¹, 酶液添加量为 0.15 mL, 反应温度为 35℃, pH 值为 6.0 时丝瓜 PPO 活性最高。当以愈创木酚为底物, 浓度为 0.067 mol·L⁻¹, 反应温度 40℃, pH 为 5.5 和 7.0 时丝瓜 POD 活性最高。在测定丝瓜酶活性变化时, PPO 以前 2.5 min 为准, POD 以前 4.5 min

为准。

pH 对 POD 的影响研究中出现肩峰这可能是由于丝瓜存在过氧化物同工酶^[16]。随着碱性越来越强, POD 的活性开始下降。过酸过碱的 pH 环境都不利于丝瓜 PPO 及 POD 的活性。温度对酶活性的影响有双面性: 一边随着温度升高, 酶催化反应速度加快; 另一方面温度升高, 会破坏酶蛋白, 反而降低酶的活性^[17]。

一般在底物浓度一定时, 酶活性随酶液量的增加而增加, 当酶液量达到一定值时, 酶活性线性增长趋于平缓。主要由于酶液量较低时, 底物过量, 随着酶液量的增加, 越来越多的酶分子与底物结合, 随后底物逐渐被酶液饱和, 当酶液量达到一定时, 达到最大饱和度, 反应速度减缓, 之后其增加速度基本保持平稳。当酶液量较多而底物浓度不足时将产生限制因子, 反应速度与酶液量之间不再保持线性关系。另外, 酶作用的产物增加, 对酶产生抑制作用, 从而导致反应速度增长量下降。酶的激活和抑制作用属于化学修饰的范畴, 它们大部分是离子或简单的有机化合物。关于 PPO 及 POD 在酶促褐变中的作用机理及在分子水平的研究还有待进一步深入了解。

因此, 在丝瓜加工处理过程中, 降低 pH 可有效防止丝瓜褐变, 低温贮藏和高温处理亦有利于减轻或控制褐变的发生, 调节底物浓度和反应酶液量也可以间接控制褐变的发生。

参考文献:

- [1] 苏小俊, 徐海, 高军, 等. 普通丝瓜果实性状的遗传分析 [J]. 江苏农业报, 2009, 25 (5): 112—118.
- [2] 黄树苹, 谈太明, 徐长城, 等. 丝瓜多酚氧化酶的酶学特性初步研究 [J]. 中国蔬菜, 2009, (10): 17—22.
- [3] 王成, 王辉, 娄丽娜, 等. 普通丝瓜果肉褐变的鉴定方法 [J]. 江苏农业科学, 2012, 40 (11): 137—138.
- [4] 周向军, 高义霞, 袁毅君, 等. 丝瓜过氧化物酶的特性和抑制作用研究 [J]. 中国酿造, 2013, 29 (19): 103—106.
- [5] 花秀凤, 陈锐, 黄斌斌. 普通丝瓜果肉褐变的变异及低褐变品种的筛选 [J]. 中国农学通报, 2013, 29 (19): 103—106.
- [6] 孙友位. 普通小麦籽粒多酚氧化酶及黄色素含量相关基因克隆与表达机理分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- [7] THIPIYAPONG P. Tomato polyphenol oxidase. Differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals [J]. Plant Physiology, 1997, 115: 409.
- [8] SHAHAR T. The tomato 66.3-kD polyphenoloxidase gene: Molecular identification and developmental expression [J]. The Plant Cell, 1992, 4 (2): 135.
- [9] SERRANO-MARTINEZ A, FORTEA M I, DELAMOR F M, et al. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annum* L.) Peroxidase [J]. Food Chemistry, 2008, 107 (1): 193—199.
- [10] 叶梅. 植物组织褐变的研究进展 [J]. 重庆工商大学学报, 2005, 22 (14): 326—381.
- [11] 李合生. 植物生理生化试验原理与技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [12] 周向军, 高义霞, 袁毅君, 等. 丝瓜过氧化物酶的特性和抑制作用研究 [J]. 中国酿造, 2011, (10): 81—85.
- [13] 周俊辉, 周家容, 曾浩森, 等. 园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展 [J]. 园艺学报, 2000, 27 (S1): 481—486, 201 (10): 81—85.
- [14] 代丽, 宫长荣, 史霖, 等. 植物多酚氧化酶研究综述 [J]. 植物生理学, 2007, 23 (6): 312—316.
- [15] 黄树苹, 谈太明, 徐长城等. 丝瓜多酚氧化酶的酶学特性初步研究 [J]. 中国蔬菜, 2009, (10): 17—22.
- [16] 秦卫东, 钱寿凤, 周瑞. 仙人掌多酚氧化酶的特性及抑制研究 [J]. 食品科学, 2004, 25 (9): 64—66.
- [17] 郭嵩光. 基础生物化学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 87.

(责任编辑: 柯文辉)