

# 生菜多酚氧化酶特性研究

马 晓<sup>1</sup>, 陈 刚<sup>2</sup>

(1. 河南职业技术学院 环境艺术工程系, 河南 郑州 450046; 2. 郑州师范学院 生命科学学院, 河南 郑州 450044)

**摘要:**为避免生菜褐变的发生, 减缓其褐变进程, 研究了生菜多酚氧化酶的酶学特性和部分抑制剂对该酶活性的影响。结果表明: 生菜多酚氧化酶最适 pH 为 8.0, 最适底物浓度为  $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 动力学方程为  $V = 0.8859[S]/(0.0617 + [S])$ , 最适温度为  $25^{\circ}\text{C}$ 。抗坏血酸、亚硫酸氢钠对酶活性的抑制效果最明显。生菜内外部叶片的酶活性随着酶液存放时间的变化趋势不同。

**关键词:** 生菜; 多酚氧化酶; 特性

**中图分类号:** S636.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2016)02-0077-04 DOI: 10.11942/j.issn1002-2767.2016.02.0077

生菜是叶用莴苣的俗称, 原产欧洲地中海沿岸, 传入中国的历史较悠久, 近年来, 栽培面积迅速扩大, 成为百姓日常食用的主要蔬菜之一, 生菜具有药用、食用、保健等多方面价值, 产量高, 价格低廉, 食用方便, 深受人们喜爱。但生菜易发生褐变, 这主要是由于绿叶植物叶绿体中含有多酚氧化酶的原因, 多酚氧化酶会催化多酚氧化为醌, 醌聚合并与细胞内蛋白质的氨基酸反应, 产生黑色素沉淀, 相应研究也较多<sup>[1-5]</sup>。生菜褐变严重影响其外观与品质, 影响产品的销售, 以及食品的营养价值, 对销售者与消费者均不利。为尽量避免生菜褐变的发生, 减缓其褐变进程, 研究不同 pH、温度、抑制剂等对生菜多酚氧化酶的影响, 最大程度地减缓其褐变的发生, 从而达到较佳的状态, 提高其商业与食用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

生菜购自当地市场, 选取新鲜、生长一致、无褐斑、无病虫害的部分为试验材料。

### 1.2 方法

**1.2.1 生菜多酚氧化酶粗酶液的制备** 取新鲜, 无褐斑的生菜叶 10 g, 按照 1:1.5 的比例, 加入预冷的磷酸缓冲液 (pH8.0) 15 mL, 研磨成匀浆, 转移至离心管中, 于  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心 15 min, 取上清液, 即为生菜多酚氧化酶的粗酶液, 放入  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。

**1.2.2 最适波长的确定** 取 pH8.0 磷酸缓冲液 3 mL,  $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  邻苯二酚溶液 0.1 mL, 混匀, 于  $25^{\circ}\text{C}$  保温 10 min 后, 倒入比色皿中, 加入 0.1 mL 粗酶液, 迅速摇匀, 于 400 nm 处测其吸光度值变化, 每隔 5 s 扫描一次, 共 1 min, 重复 3 次。随后重复以上步骤, 在 400~600 nm 测试其吸光度值变化。

**1.2.3 酶活性测定** 取 pH8.0 磷酸缓冲液 3 mL,  $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  邻苯二酚溶液 0.1 mL, 混合, 于  $25^{\circ}\text{C}$  保温 10 min 后, 倒入比色皿中, 加入 0.1 mL 粗酶液, 迅速摇匀后, 在 420 nm 波长处测吸光度值, 每 5 s 扫描一次, 共 90 s, 重复 3 次。同时做空白对照。

以每克样品每分钟内吸光度值增加 0.001 为一个酶活力单位  $\text{U}(\Delta A \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$ 。

**1.2.4 pH 对多酚氧化酶活性的影响** 分别取 3 mL 磷酸缓冲液 (pH4.5~9.0, 以 0.5 为一个梯度),  $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  邻苯二酚溶液 0.1 mL, 混匀, 于  $25^{\circ}\text{C}$  保温 10 min 后, 倒入比色皿中, 加入 0.1 mL 粗酶液, 迅速摇匀后, 在 420 nm 波长处测吸光度值, 每 5 s 扫描一次, 共 1 min, 重复 3 次。

**1.2.5 底物浓度对多酚氧化酶活性的影响** 分别取 pH8.0 磷酸缓冲液 3 mL, 0.1 mL 邻苯二酚溶液 (浓度为  $0.02 \sim 0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 以  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  为一个梯度;  $0.3 \sim 1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 以  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  为一个梯度), 混匀, 于  $25^{\circ}\text{C}$  保温 10 min 后, 倒入比色皿中, 加入 0.1 mL 粗酶液, 迅速摇匀后, 在 420 nm 波长处测吸光度值, 每 5 s 扫描一次, 共 1 min, 重复 3 次。分别拟合生菜多酚氧化酶活性随不同底物浓度的变化直线斜率, 即为反应初速

收稿日期: 2015-10-11

第一作者简介: 马晓 (1980-), 女, 河南省漯河市人, 硕士, 讲师, 从事植物生理与抗性研究。E-mail: maxiao720@163.com。

度  $V$ 。作  $1/V-1/[S]$  的双倒数图。

1.2.6 温度对多酚氧化酶活性的影响 分别取 pH8.0 磷酸缓冲液 3 mL,  $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  邻苯二酚溶液 0.1 mL, 混匀, 于  $0 \sim 40^\circ\text{C}$  (以  $5^\circ\text{C}$  为一个梯度) 保温 10 min 后, 倒入比色皿中, 加入 0.1 mL 粗酶液, 迅速摇匀后, 在 420 nm 波长处测吸光度值, 每 5 s 扫描一次, 共 1 min, 重复 3 次。

1.2.7 抑制剂对多酚氧化酶活性的影响 取 pH8.0 磷酸缓冲液 3 mL,  $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  邻苯二酚溶液 0.1 mL, 0.1 mL 不同浓度 (浓度为  $2 \sim 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 以  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  为一个梯度) 的亚硫酸氢钠、抗坏血酸、EDTA-2Na、草酸、柠檬酸等抑制剂, 混匀, 于  $25^\circ\text{C}$  保温 10 min 后, 倒入比色皿中, 加入 0.1 mL 粗酶液, 迅速摇匀后, 在 420 nm 波长处测吸光度值, 每 5 s 扫描一次, 共 1 min, 重复 3 次。同时做空白对照。

1.2.8 酶液的存放时间对多酚氧化酶活性的影响 取同一颗生菜最外部叶片、最内部叶片各提取两份粗酶液, 将一份外部叶片粗酶液与一份内部叶片粗酶液放置于  $4^\circ\text{C}$  冰箱中, 另一份外部叶片粗酶液与内部叶片粗酶液放置于室温下, 每天同一时间按照 1.3.3 中的步骤, 测定多酚氧化酶活性, 连续测定 7 d。

## 2 结果与分析

### 2.1 最大吸收波长的确定

由图 1 可得知, 生菜多酚氧化酶在 420 nm 波长处有最大吸收峰, 因此, 在后续试验中均采用 420 nm 作为工作波长。

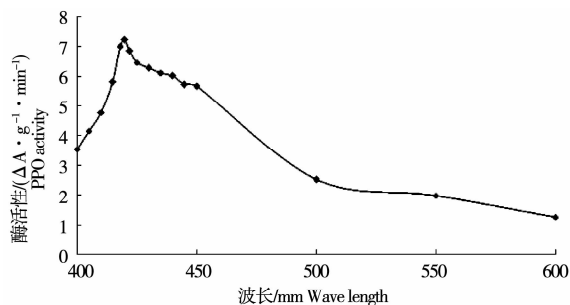


图 1 生菜多酚氧化酶最大吸收波长的确定  
Fig. 1 Determination of the maximum absorption wave length of PPO in lettuce

### 2.2 底物浓度对多酚氧化酶活性的影响

由图 2 可得知, 生菜多酚氧化酶在前 60 s 内吸光度值增加较为迅速, 60 s 后吸光度值逐步达到峰值, 趋于平缓, 因此选取以 60 s 作为反应测试时间。

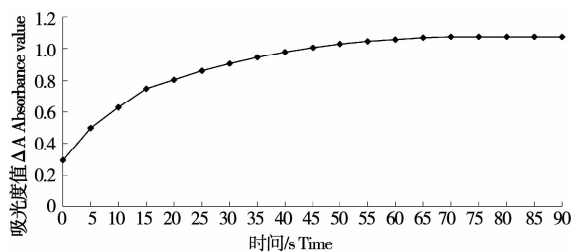


图 2 生菜多酚氧化酶反应进程曲线  
Fig. 2 The curve of reaction course of PPO in lettuce

### 2.3 pH 对生菜多酚氧化酶活性的影响

pH 对生菜多酚氧化酶活性的影响如图 3 所示, 由图可以看出, 在 pH4.5~8.0 阶段, 酶活性随 pH 的升高而上升, 在 pH8.0~9.0 阶段, 酶活性随 pH 的升高而下降。这是由于多酚氧化酶是一类含铜的氧化还原酶, 在酸性环境中, 多酚氧化酶中的铜离子能被解离出来, 从而失去酶活性, 而当处于过于碱性的环境时, 多酚氧化酶中的铜离子易转变为不溶性的氢氧化铜从而与酶脱离, 使酶失去活性, 使反应减弱<sup>[6-7]</sup>。在本试验中, 生菜多酚氧化酶的最适 pH 为 8.0。

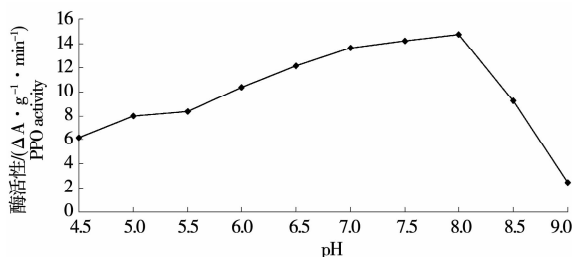


图 3 pH 对生菜多酚氧化酶活性的影响  
Fig. 3 Effect of pH on activity of PPO in lettuce

### 2.4 底物浓度对生菜多酚氧化酶活性的影响

底物浓度对生菜多酚氧化酶活性的影响如图 4 所示。本试验中生菜多酚氧化酶活性的最适底物浓度是  $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在底物浓度低于最适浓度时, 酶的活性部分没有完全与底物结合, 因此反应不够彻底, 但酶活性会随着底物浓度的升高而增加; 而当底物浓度高于最适浓度时, 酶的活性部位已全部与底物结合发生了反应, 达到了饱和状态, 随着底物浓度的继续增加, 酶活性不会继续增加, 反而略有下降。

### 2.5 生菜多酚氧化酶的反应动力学方程

由图 4 可以看出, 当底物浓度较低时, 底物浓度对反应初速度影响较大, 呈直线上升趋势, 随着底物浓度的增加, 底物浓度对反应初速度的影响逐渐达到最大并趋于平缓, 此现象符合单底物酶

促反应机理,因此可用米氏方程  $V = V_{\max}[S]/(K_m + [S])$  进行描述,将方程转化为  $1/V = K_m/V_{\max} \cdot 1/[S] + 1/V_{\max}$ ,对试验结果进行处理绘制  $1/V-1/[S]$  双倒数图,如图 5 所示,所得拟合直线的  $R^2$  值为 0.981 2,可见生菜多酚氧化酶促褐变反应动力学符合米氏方程,根据直线的斜率和截距,可求得该反应的米氏常数  $K_m=0.061\ 7\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $V_{\max}=0.885\ 9\ \text{U}\cdot\text{min}^{-1}$ ,由此得出该反应相应的动力学方程为  $V=0.885\ 9[S]/(0.061\ 7+[S])$ 。

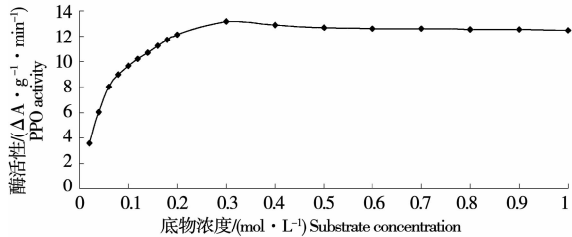


图 4 底物浓度对生菜多酚氧化酶活性的影响  
Fig. 4 Effect of substrate concentration on activity of PPO in lettuce

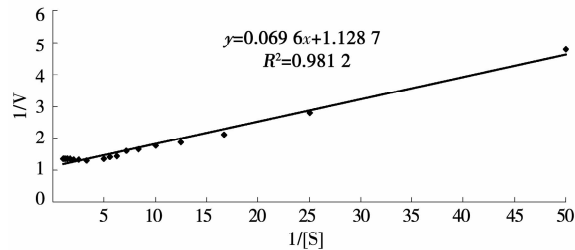


图 5  $1/V-1/[S]$  双倒数图

Fig. 5 The curve of  $1/V$  about  $1/[S]$

### 2.6 温度对生菜多酚氧化酶活性的影响

温度对生菜多酚氧化酶活性的影响如图 6 所示,由此可知,生菜多酚氧化酶的最适温度为  $25^{\circ}\text{C}$ ,在低于  $25^{\circ}\text{C}$  时,低温抑制了酶活性,随着温度升高酶活性逐渐升高,在  $25^{\circ}\text{C}$  达到峰值;当温度高于  $25^{\circ}\text{C}$  时,由于多酚氧化酶是一种蛋白质,高温导致蛋白质变性,从而使酶失活。

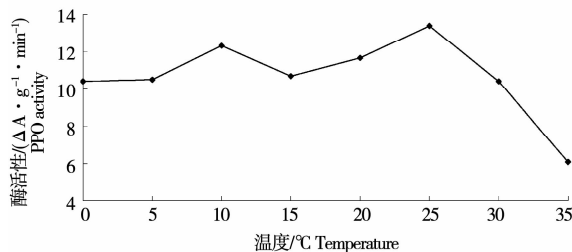


图 6 温度对生菜多酚氧化酶活性的影响

Fig. 6 Effect of temperature on activity of PPO in lettuce

### 2.7 抑制剂对生菜多酚氧化酶活性的影响

由图 7 可知,EDTA-2Na、草酸和柠檬酸对生菜多酚氧化酶活性的影响基本趋于平稳,随浓度的增加酶活性变化不大。抗坏血酸和亚硫酸氢钠对于生菜多酚氧化酶活性的影响较大,浓度越大,多酚氧化酶活性越低。抗坏血酸和亚硫酸氢钠是通过将酶促褐变反应的中间产物醌还原,从而抑制褐变<sup>[8-11]</sup>。

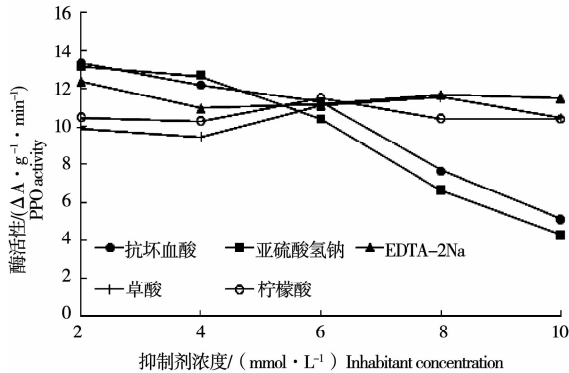


图 7 抑制剂对生菜多酚氧化酶活性的影响

Fig. 7 Effect of inhibitor on activity of PPO in lettuce

因此可选用抗坏血酸或亚硫酸氢钠作为生菜多酚氧化酶的抑制剂,亚硫酸氢钠是 GB2760 里规定范围和使用量的食品添加剂,而抗坏血酸是植物的固有成分,安全性高,因此抗坏血酸是在生菜加工过程中较为理想的多酚氧化酶抑制剂。

### 2.8 酶液的存放时间对生菜多酚氧化酶活性的影响

生菜最外部叶片、最内部叶片所提取酶液分别在  $4^{\circ}\text{C}$ 、室温状态下存放。由图 8 可知,生菜最外部叶片所提取酶液在前 3 d,酶活性随存放天数的延长而增加,第 3 天之后,酶活性随存放天数的增加而逐渐降低,这种现象在已有文献中出现过相似结果<sup>[11-14]</sup>。生菜最内部叶片所提取酶液随着存放时间的增加,酶活性逐渐降低。

虽然将酶液存放于室温或  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中对生菜多酚氧化酶活性影响区别不大,但在试验中观察到从第 5 天开始,不论是生菜最外部叶片还是最内部叶片,存放于室温下的酶液明显出现浑浊、结块现象,而  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中的酶液更接近于酶液最初提取时的状态。

在酶液存放过程中,从第 5 天起,存放于室温下的两份酶液出现明显的浑浊现象,而存放于  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中的酶液浑浊现象没有室温中的酶液明显,更接近于酶液最初的状态,因此最好将酶液存

放于4℃冰箱中,并且当天提取,当天使用,避免长时间存放所带来的试验误差。因此本试验所用的多酚氧化酶粗酶液均为现提现用。

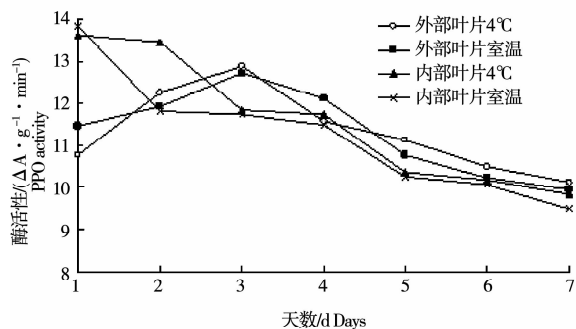


图8 酶液的存放时间对生菜多酚氧化酶活性的影响

Fig.8 Effect of storing time on activity of PPO in lettuce

### 3 结论

通过试验得知,生菜多酚氧化酶最适 pH 为 8.0,最适温度为 25℃,最适底物浓度为 0.3 mol·L<sup>-1</sup>,最适抑制剂为抗坏血酸。因此在生菜的运输、保鲜、加工过程中,可以通过避免使生菜处于最适环境和添加安全抑制剂的方式,最大程度地防止或减缓生菜发生褐变,延长其保鲜期,提高其商业价值与食用价值。

### 参考文献:

- [1] 胡金强,生菜(*Lactuca sativa* L.)多酚氧化酶特性研究[J].食品研究与开发,2014,35(14):103-106.
- [2] 饶先军,刘升,王则金,等.结球生菜多酚氧化酶动力学特性研究[J].食品工业科技,2011(9):80-82.
- [3] Muhammed Tajoddin, Shinde Manohar, Junna Lalitha, et al. Effect of Soaking and germination on polyphenol content and polyphenol oxidase activity of mung bean (*Phaseolus aureus* L.) cultivars differing in seed color[J]. International journal of food properties, 2014, 17(4/5/6):782-790.

- [4] Karla A Batista, Gustavo L A Batista, Guilherme L Alves, et al. Extraction, partial purification and characterization of polyphenol oxidase from *Solarium lycocarpum* fruits[J]. Journal of Molecular Catalysis, B. Enzymatic, 2014, 102: 211-217.
- [5] LiuYe, Song Xiaohu, Zhao Xiaoyan, et al. Inactivation of polyphenol oxidase from watermelon juice by high pressure carbon dioxide treatment. [J]. Journal of Food Science and Technology, 2013, 50(2):317-324.
- [6] 滕杰,丰金玉,熊硕,等.茶叶多酚氧化酶及其同工酶的研究进展[J].茶叶通讯,2014,41(2):10-13.
- [7] 李宁,郁志芳,赵友兴,等.莲藕多酚氧化酶的酶学特性[J].江苏农业学报,2002,18(1):63-64.
- [8] 高莉,李园园,曹琳青,等. D-异抗坏血酸钠对鲜切桃的保鲜护色效果研究[J].价值工程,2015,34(4):308-309.
- [9] 何军忠,袁家代,李维,等.八角莲多酚氧化酶的酶学性质[J].食品科学,2015,36(13):137-142.
- [10] Landi M, Degl'Innocenti E, Guglielminetti L, et al. Role of ascorbic acid in the inhibition of polyphenol oxidase and the prevention of browning in different browning-sensitive *Lactuca sativa* var. *capitata* (L.) and *Eruca sativa* (Mill.) stored as fresh-cut produce. [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(8):1814-1819.
- [11] Ji-Hyun Jang, Kwang-Deog Moon. Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activities on fresh-cut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid[J]. Food Chemistry, 2011, 124(2):444-449.
- [12] 王挥,陈卫军,龙雪峰,等.椰子不同部位 LPS、PPO 以及 POD 活性分布的研究[J].广东农业科学,2013,40(16):101-103.
- [13] 许金蓉,周明全,何建军,等.莲藕不同部位的酶活性研究[J].湖北农业科学,2005(3):89-90.
- [14] 赵娇.对虾中酚酶活性部位及稳定性分析[J].职业与健康,2000,16(12):37-38.

## Study on Characteristic of Polyphenol Oxidase in *Lactuca sativa* var. *ramosa* Hort.

MA Xiao<sup>1</sup>, CHEN Gang<sup>2</sup>

(1. Department of Environment Artistic Engineering, Henan Vocational and Technical College, Zhengzhou, Henan 450046; 2. School of Life Sciences, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou, Henan 450044)

**Abstract:** In order to avoid the browning of *Lactuca sativa* var. *ramosa*, the activity of polyphenol oxidase in lettuce and the effect of some inhabitant on polyphenol oxidase were studied. The results showed that the optimal pH was 8.0 and substrate concentration was 0.03 mol·L<sup>-1</sup>. The kinetic equation was  $V = 0.8859[S] / (0.0617 + [S])$ . The optimal temperature was 25℃. The depress effect of ascorbic acid and NaHSO<sub>3</sub> on polyphenol oxidase activity was the strongest. The activity of polyphenol oxidase between the outside and inner leaves was different as the storing time went on.

**Keywords:** *Lactuca sativa* var. *ramosa* Hort.; polyphenol oxidase; characteristic