

香菇多酚氧化酶酶学特性的研究

刘雅嘉, 李 炜, 衣杰荣*

(食品科学与技术学院, 上海海洋大学, 上海 200090)

摘 要:以没食子酸为底物, 以 3-甲基-2-苯并噻唑脒盐酸盐 (MBTH) 与酶作用产物形成粉红色的复合物, 通过分光光度法在 505nm 处测定该复合物的吸收来测定香菇多酚氧化酶 (PPO) 的活性。分别研究了温度、pH、底物浓度对酶活性的影响, 得到了米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max} , 并探讨了 PPO 提取液的稳定性。结果表明: 香菇 PPO 活性在 20~60℃ 内逐渐升高, 其最适 pH 为 4.6, 温度对酶活的影响比 pH 的影响要大。三种底物与 PPO 亲和力高低的顺序为 L-多巴 > 一水没食子酸 > 邻苯二酚, 其米氏常数 K_m 分别为 0.98、1.45、3.07 mmol/L, 最大反应速度 V_{max} 分别为 29、49、80 U。

关键词:香菇, 酶促褐变, 多酚氧化酶, 反应动力学

Study on characters of PPO in mushroom

LIU Ya-jia, LI Wei, YI Jie-rong*

(School of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The activity of polyphenol oxidase (PPO) from *Lentinus edodes* was determined by spectrophotometer at 505nm using Gallic acid as substrate and 3-methylbenzothiazolinone hydrazone (MBTH) as chromophore coupling agent. The effects of the temperature, pH, substrate concentration on PPO activity were studied and the reaction kinetic equation was established. Our results showed that the activity of PPO increased with the increasing of temperature in the range of 20℃ to 60℃ and the optimum pH was 4.6. The affinities with PPO of three substrates were in following sequence: L-dopa > Gallic acid > catechol. The K_m were 0.98, 1.45, 3.07 mmol/L, respectively. The V_{max} were 29, 49, 80 U, respectively.

Key words: *Lentinus edodes*; enzymatic browning; PPO; reaction kinetics

中图分类号: TS201.2*5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)01-0183-04

香菇 [*Lentinus edodes* (Berk.) sing] 属伞菌目, 口蘑科, 香菇属, 也称香蕈、香信、冬菇或花菇。它是我国食用历史悠久及首次驯化栽培的优良食用菌, 营养丰富、味道鲜美, 被视为“菇中之王”^[1]。香菇表面及菌褶由白变红、褐色, 最后变成褐黑的褐变过程, 被视为香菇商品性和鲜度下降的主要标志。香菇采收后, 在常温下容易褐变, 尤其是受机械伤后褐变迅速。多酚氧化酶 (Polyphenol Oxidase, PPO) 是导致香菇子实体褐变的主要酶。该酶是一种含铜基的糖蛋白, 其催化作用机制在于铜的氧化还原作用, 多酚氧化酶催化各种酚类物质氧化成醌类, 再聚合成黑色素。香菇子实体在采收加工之前细胞处于完整状态, 酚和醌之间保持动态平衡, 当组织或细胞被破坏后, 多酚氧化酶和酚类物质相互接触, 在多酚氧化酶的作用下, 导致醌的生成和大量积累, 并进一步聚合成黑色素, 引起香菇褐变^[2,3], 这样就降低了其营养价值和商品价值。而如何有效地保持鲜菇的价值, 已

成为急需解决的问题。因此, 我们就香菇多酚氧化酶的酶学特性进行了研究, 以期香菇商业化贮藏保鲜提供相关的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

香菇 易初莲花超市购得当日的新鲜、无机械损伤的香菇; 一水没食子酸、邻苯二酚、L-3,4-二羟基苯丙氨酸 (L-多巴)、N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)、3-甲基-2-苯并噻唑脒盐酸盐 (MBTH)、苯甲基磺酰氟 (PMSF)、4-氨基苯甲酰盐酸盐 (PAB) 均为分析纯。

HR 2860 型组织捣碎机 PHILIPS 公司; GL-26G-II 型冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂; 恒温水浴加热锅 上海青浦沪西仪器厂; WFJ 2100 型可见光分光光度计 尤尼柯 (上海) 仪器有限公司; 电子分析天平 (Mettler AE 160) $d = 0.0001g$, 上海精密科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 香菇 PPO 粗酶液的制备 参照 Giovanni Spagna^[4] 和 Josefa Escribano^[5,6] 的方法并加以改进: 新鲜香菇去柄后, 迅速称取 30g, 切成小块放入组织捣

收稿日期: 2008-05-14 * 通讯联系人

作者简介: 刘雅嘉 (1983-), 男, 硕士在读, 研究方向: 食品加工工程。

基金项目: 上海市重点学科建设项目资助 (T1102)。

碎机,加入预冷过的 50mmol/L pH7.0 磷酸盐缓冲溶液 100mL(含 1mmol/L PMSF 和 1mmol/L PAB 的丝氨酸蛋白酶抑制剂),捣碎处理 2min,用 8 层 200 目的纱布过滤,弃去残渣,保留滤液,放入冰箱静置 10min,然后对滤液进行冷冻离心(10000r/min, 20min, 4℃),离心后的上清液即多酚氧化酶粗酶液。配制好的多酚氧化酶粗酶液可以分装于小试管中,并放置于冰箱中-24℃ 条件下备用。

1.2.2 MBTH 与酶作用产物形成的复合物最大吸收波长的确定 在试管中加 1mL 5mmol/L 没食子酸溶液为底物,0.3mL 41.4mmol/L MBTH 溶液,0.05mL DMF 试剂,0.7mL 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液(pH4.6),0.85mL 蒸馏水,加 0.1mL 粗酶液振荡均匀,常温下反应 30min,再加入 0.5mL 8% H₂SO₄ 溶液终止反应。测定时以蒸馏水为空白,在紫外可见分光光度计中扫描,并观察 350~650nm 波长范围内其最佳吸收波长。

1.2.3 PPO 活性的测定 参照 Alison J.Winder 和 Henry Harris^[7] 的方法并加以改进:在试管中依次加入 1mL 5mmol/L 没食子酸溶液,0.3mL 41.4mmol/L MBTH 溶液,0.05mL DMF 试剂,0.7mL 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液(pH4.6),0.85mL 蒸馏水,振荡混合均匀,恒温水浴锅 40℃ 反应 5min,精确加入 0.1mL 粗酶液,充分振荡混合均匀,恒温水浴锅 40℃ 反应 5min,再加入 0.5mL 8% H₂SO₄ 溶液终止反应。可见光分光光度计在波长 505nm 处测定吸光值 A。测定时的空白对照为反应体系先加入 H₂SO₄ 溶液终止反应,后加入粗酶液。

一个酶活力定义为:在测定条件下,1min 催化 1μmol 分子底物转化的酶量为该酶的一个活力单位(U, activity unit)。

酶的比活性按下式计算:

$$\text{酶的比活性 (U/g)} = \Delta \text{OD} / (0.001 \cdot \text{FW} \cdot t)$$

式中:ΔOD 为反应时间内光密度的变化;FW 为样品鲜重(g);t 为反应时间(min)。

酶的相对活性计算:在测定条件下,以酶的比活性的最高值作为 100。

1.2.4 PPO 最适温度的测定 操作同 1.2.3,使用恒温水浴锅将没食子酸溶液体系温度分别设置为 20、30、40、50、60℃,保温 5min 后加入粗酶液,再在相同温度下反应 5min,最后加 H₂SO₄ 溶液终止反应,505nm 处测定其吸光值 A。以温度为横坐标、吸光值 A 为纵坐标,绘制吸光值 A-温度曲线。

1.2.5 PPO 最适 pH 的测定 操作同 1.2.3,配制 0.2mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH3.6~5.6),磷酸盐缓冲液(pH5.0~8.0),使用恒温水浴锅在 40℃、505nm 条件下测其酶活。以 pH 为横坐标、酶的相对活性为纵坐标,绘制相对活性-pH 曲线。

1.2.6 PPO 的 Km 值的测定 操作同 1.2.3,分别以一水没食子酸、L-多巴、邻苯二酚为底物,测定 PPO 的活性,根据 Lineweaver-Burk^[8] 双倒数作图法估算其 Km 值。一水没食子酸浓度设置为:2.5、5.0、7.5、10.0mmol/L;邻苯二酚浓度设置为:L-多巴浓度设置为:1.0、2.0、4.0、5.0mmol/L;邻苯二酚浓度设置为:

1.0、2.5、5.0、10.0mmol/L。此外,实验当中配置的底物溶液应储存在棕色试剂瓶并放置于 4℃ 冰箱中。

1.2.7 PPO 提取液稳定性的测定 操作同 1.2.1,用 pH 为 4.6 的预冷缓冲溶液提取粗酶液,得到的 PPO 粗酶液分别放置于 4、30、40、50、60、70℃ 水浴锅中保温,经过 0、2、4、6、8、10、12h 后按照 1.2.3 的方法测定 PPO 的活性。以时间为横坐标、酶的相对活性为纵坐标,绘制相对活性-时间曲线。

操作同 1.2.1,分别用 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的预冷缓冲溶液提取粗酶液,得到的 PPO 粗酶液分别放置于 40℃ 水浴锅中保温,经过 0、2、4、6、8、10、12h 后按照 1.2.3 的方法测定 PPO 的活性。以时间为横坐标、酶的相对活性为纵坐标,绘制相对活性-时间曲线。

2 结果与分析

2.1 PPO 酶作用生成产物的性质

操作同 1.2.2,反应液中的 3-甲基-2-苯并噻唑脒盐酸盐(MBTH)试剂作为发色团偶联剂,与底物酶促氧化生成的醌类物质结合生成粉红色复合物,通过测定此复合物的数量来反映香菇中 PPO 的活性^[4]。

研究了该复合物在不同波长下的吸收,结果如图 1 所示,反应生成的粉红色物质在 505nm 处有最大吸收峰,并且此显色物质至少稳定存在 1.0h 以上(数据没有显示)。得到的最大吸收波长与 Alison J.Winder 和 Henry Harris^[7] 实验结果相同,此后实验均在此波长条件下进行。

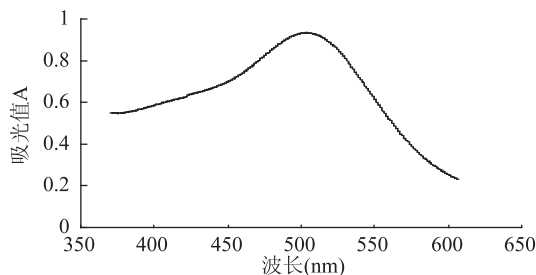


图1 波长扫描图谱

2.2 温度对 PPO 的影响

如图 2 所示,以一水没食子酸为底物时,当温度低于 30℃ 时 PPO 活性较低;在 30~40℃ 之间 PPO 活性随温度升高而显著上升,60℃ 达到最大;60℃ 以后由于实验条件限制没有测量。高温时底物的自动氧化速度非常快,这一点可从空白对照试样(含有底物而酶失活)在 60℃ 以上时颜色迅速变成红色得到验证。

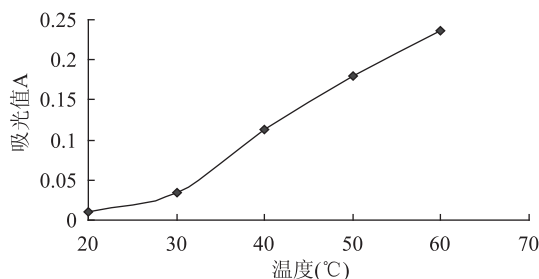


图2 温度对香菇 PPO 活性的影响

温度对酶活性的影响有双重性:一方面,随着温度的升高,溶液中分子的热运动加剧,单位时间内底物与酶接触的几率增高,酶活性增大;另一方面,随温度升高酶蛋白变性也增加,酶活性降低,最适温度的大小是这两种作用相平衡的结果。此结果与姜红波等研究茶树菇^[9]和邵伟等研究白蘑菇^[10]所得最适温度为 40℃,与吴靖娜等研究鸡腿菇^[11]所得最适温度为 20℃相差较大,可能是由于 PPO 的最适温度随食用菌种类和底物种类的不同表现出一定差异。

2.3 pH 对 PPO 的影响

研究了不同 pH 对反应液中 PPO 活性的影响,结果如图 3 所示,当以一水没食子酸为底物时,PPO 的最适 pH 为 4.6,酶活性的适宜 pH 相对偏酸性,在 pH4.4~5.0 之间比较高,在 pH4.6 时酶活达到最高值。在低于 pH4.4 时,酶活性呈明显下降趋势,在 pH5.0~7.0 之间时酶活缓慢下降,pH 大于 7.0 酶活呈明显的下降趋势。其原因可能是 PPO 为一种含 Cu 蛋白质,在 pH 改变的条件下构象会发生变化,从而影响其活性。在 pH 较低的酸性环境条件下,PPO 中的辅基 Cu^{2+} 被解离出来,使其活性受到抑制;在 pH 大于 7 的碱性环境条件下,PPO 中的辅基 Cu^{2+} 会解离生成不溶性的 $\text{Cu}(\text{OH})_2$,使其失活,从而减少酶促褐变发生。

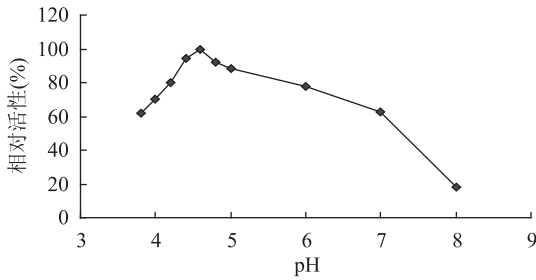


图3 pH 对香菇 PPO 活性的影响

2.4 不同底物 Km 值的确定

如图 4~图 6 所示,作出 $1/V$ 对 $1/[S]$ 的双倒数图,可近似得到一条直线。根据直线斜率和截矩可求得一水没食子酸、L-多巴、邻苯二酚为底物的米氏常数 K_m 值分别为:1.45、0.98、3.07mmol/L,最大反应速度 V_{max} 值分别为:49、29、80U。

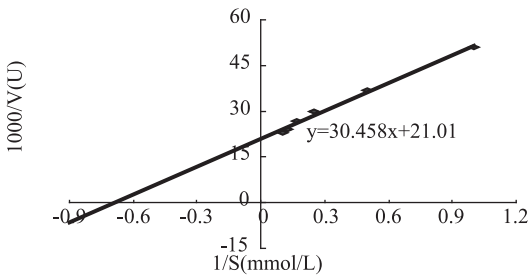


图4 一水没食子酸为底物双倒数曲线

由于 K_m 的大小反映酶与底物亲和力的大小, K_m 越小说明酶与底物亲和力越大。因此,所测的三种底物与 PPO 亲和力高低顺序为:L-多巴 > 一水没食子酸 > 邻苯二酚。国内测定 PPO 活性大多数采用邻苯二酚作为底物,但是邻苯二酚作为底物,所测的数值不稳定,在短时间内数值下降很快,此现象成因至

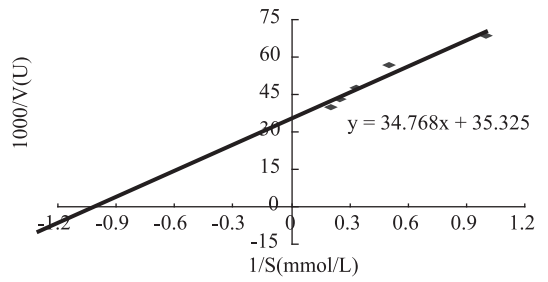


图5 L-多巴为底物双倒数曲线

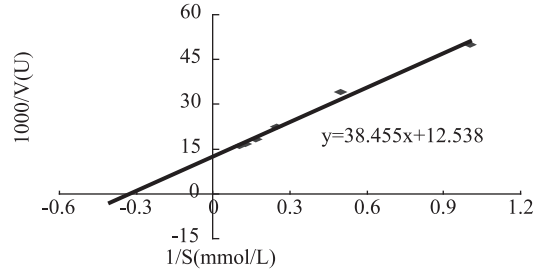


图6 邻苯二酚为底物双倒数曲线

今还未研究清楚。本实验以邻苯二酚作为底物,所测的数值为终止反应后立即所测且还未变化的数值。

2.6 PPO 稳定性实验

把 PPO 的提取液置于不同的温度下放置一定的时间,再分别测定其酶的活性大小,结果如图 7。

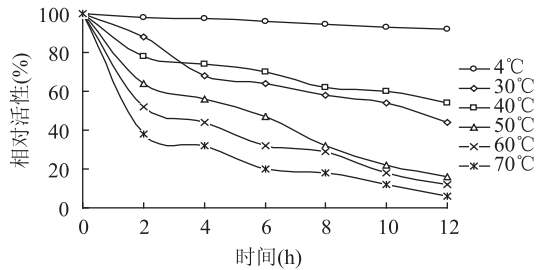


图7 PPO 提取液的热稳定性

从图 7 可以看出,在不同温度条件下,前 2h PPO 活性下降较大,其中 70℃ 条件下下降最快;在 30、40℃ 条件下,2h 后酶活性下降较平缓,12h 后 PPO 活性下降约 50%;而在 50、60、70℃ 条件下,2h 后酶活性下降依然很快,12h 后 PPO 活性下降约 80%。

图 8 是用不同 pH 的缓冲液来提取 PPO,得到的提取液放置在 40℃ 的水浴中,其酶活随时间的变化情况。

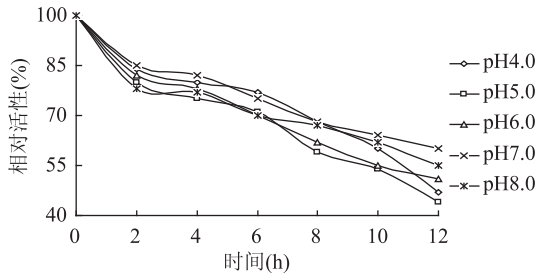


图8 PPO 不同 pH 提取液的稳定性

从图 8 可以看出,在不同 pH 条件下,前 2h PPO 活性下降较大,此后 4h PPO 活性下降较平缓,最后 6h 下降较快。12h 内,pH7.0 条件下酶活下降最小,约为 40%;pH8.0 条件下酶活下降最大,约为 50%。说

(下转第 188 页)

响到酿酒酵母在橙汁中生长的延滞期。有文献指出^[3],25℃下酿酒酵母发酵橙汁24h开始产醇,已开始导致橙汁腐败。因此,在橙汁生产加工中应尽量在延滞期结束前(被酿酒酵母污染后6h以内)完成对橙汁的杀菌处理,或在延滞期结束前将橙汁温度降至5℃以下以抑制酿酒酵母的生长,均可降低橙汁发生由酵母腐败而导致胀袋的风险。

即便达到《中华人民共和国国家标准 GB 19297—2003》中对果蔬汁饮料中酵母指标要求(产品酵母数量 $\leq 20\text{cfu/mL}$)的橙汁产品,在生产、贮藏、销售、消费过程中如果冷链温度控制不力,产品长时间暴露于8℃以上的环境中,发生腐败胀袋的风险依然很高。

为减少橙汁酵母腐败的经济损失,橙汁生产加工企业必须减少在生产各环节中可能引入的微生物风险,严格评估生产工艺对酵母的杀菌能力。对于常温保存的产品,需保证杀菌后产品中酵母不得检出;对杀菌要求较低、允许有符合国标要求酵母残留的产品,如鲜榨即售或保质期较短的产品,需严格保证产品在0~5℃的温度范围中生产、贮藏、销售。

在建立常温保存橙汁的 HACCP 食品安全管理体系时,《中华人民共和国国家标准 GB 19297—

2003》中对果蔬汁饮料中酵母指标要求(产品酵母数量 $\leq 20\text{cfu/mL}$)不能作为合理有效的微生物危害控制限值输入体系。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家标准 GB 19297—2003 果、蔬汁饮料卫生标准[S]. 北京:中国标准出版社,2004.
- [2] V H Tournas, J Heeres, L Burgess. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices [J]. Food Microbiology, 2006, 23: 684~688.
- [3] 陈瑶, 赖崇德, 刘玄, 等. 橙汁酿酒酵母菌株的分离筛选和发酵性能的测定[J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(4): 665~669.
- [4] 中华人民共和国国家标准 GB/T 4789.28—2003 4.78 食品卫生微生物学检验染色法、培养基和试剂[S]. 北京:中国标准出版社, 2003. 228.
- [5] 中华人民共和国国家标准 GB/T 4789.15—2003 食品卫生微生物学检验霉菌和酵母计数[S]. 北京:中国标准出版社, 2003. 101~105.
- [6] David McSwaned 等著, 吴永宁等译. 食品安全与卫生基础[M]. 北京:化学工业出版社, 2006. 64.

(上接第185页)

明 PPO 在中性条件下比酸性或碱性条件下稳定。

酶在50℃以上放置12h其PPO活性下降80%以上(图7),而改变pH(如pH4.0和pH5.0)放置同样的时间,其PPO活性的减少低于55%。由此说明温度比pH对PPO活性的影响程度要大。

3 结论

香菇 PPO 活性在20~60℃内逐渐升高,最适pH为4.6。酶的稳定性实验表明,改变pH和温度都会影响PPO的活性,温度对酶活的影响比pH的影响要大。PPO与三种底物亲和力和强弱顺序为:L-多巴>一水没食子酸>邻苯二酚,其 K_m 值分别为:0.98、1.45、3.07mmol/L, V_{max} 值分别为29、49、80U。

参考文献:

- [1] 吕素彬, 张庆芳, 殷梅. 不同处理防止蘑菇褐变的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 1997, 28(3): 248~250.
- [2] 王泽生, 池致念, 王贤樵. 双孢蘑菇易褐变菌株的多酚氧化酶特征[J]. 食用菌学报, 1999, 6(4): 15~20.
- [3] 冯叙桥, 赵静. 蘑菇贮藏保鲜原理与技术[J]. 中国食用菌, 1995, 14(3): 43~44.
- [4] Giovanni Spagna, Riccardo N. Characterization of tomato

polyphenol oxidase and its role in browning and lycopene content [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53: 2032~2038.

[5] Josefa Escibano, Juana Cabanes. Characterization of latent polyphenol oxidase in table beet: effect of sodium dodecyl sulphate [J]. J Sci Food Agric, 1997, 73: 34~38.

[6] Josefa Escibano, Juana Cabanes. Characterization of monophenolase activity of table beet polyphenol oxidase. Determination of kinetic parameters on the tyramine/dopamine Pair [J]. J Agric Food Chem, 1997, 45: 4209~4214.

[7] Alison J Winder, Henry Harris. New assays for tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase [J]. European Food Research and Technology, 1997, 205 (5): 375~379.

[8] Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants [J]. J Am Chem Soc, 1934, 56: 685~688.

[9] 姜红波, 童金华, 林启训, 等. 茶树菇多酚氧化酶动力学研究[J]. 保鲜研究, 2006(5): 14~16.

[10] 邵伟, 乐超银, 黄艺, 等. 蘑菇多酚氧化酶酶学特性初步研究[J]. 食用菌, 2007(2): 5~6.

[11] 吴靖娜, 黄枝梅, 林启训, 等. 鸡腿菇多酚氧化酶动力学特性[J]. 山地农业生物学报, 2007, 26(1): 43~47.

一套《食品工业科技》在手 纵观食品工业发展全貌