

廖春丽,王 衡,李亚平,等. *L*-半胱氨酸及金属离子对马铃薯、苹果、甘薯多酚氧化酶活性的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):375-377.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.118

# *L*-半胱氨酸及金属离子对马铃薯、苹果、甘薯多酚氧化酶活性的影响

廖春丽<sup>1</sup>, 王 衡<sup>1</sup>, 李亚平<sup>1</sup>, 胡继勇<sup>2</sup>, 赵安芳<sup>1</sup>

(1. 河南城建学院生命科学与工程学院,河南平顶山 467036;2. 河南城建学院化学与材料工程学院,河南平顶山 467036)

**摘要:**以马铃薯、苹果和甘薯为研究对象,研究 *L*-半胱氨酸和金属离子对上述 3 种作物多酚氧化酶(PPO)活性的影响。结果表明,*L*-半胱氨酸对马铃薯、苹果和甘薯 PPO 活性抑制作用明显,随着 *L*-半胱氨酸浓度增大,酶活性降低幅度越大,作用于马铃薯、苹果的 IC<sub>50</sub> (导致酶活性下降 50% 的抑制剂浓度)为 0.05 mmol/L,甘薯为 0.10 mmol/L。0.20 mmol/L *L*-半胱氨酸,使马铃薯、苹果和甘薯中 PPO 活性抑制率在 90% 以上,随着时间的延长,最大抑制率变化不大。无论是马铃薯、苹果还是甘薯,Mn<sup>2+</sup> 和 Fe<sup>3+</sup> 对它们的 PPO 活性有不同程度的激活作用,而 Ca<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup> 和 Cu<sup>2+</sup> 对 PPO 活性有一定的抑制作用。抑制作用最强的是 Cu<sup>2+</sup>,3.0 mmol/L Cu<sup>2+</sup> 对马铃薯 PPO 活性抑制率为 49.1%,对苹果 PPO 活性抑制率为 60.8%,对甘薯 PPO 活性抑制率为 69.7%。

**关键词:**马铃薯;苹果;甘薯;多酚氧化酶;*L*-半胱氨酸;金属离子

**中图分类号:** TS201.2<sup>+</sup>5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0375-03

多酚氧化酶(PPO)是广泛存在于生物体内的含铜氧化还原酶,它包括单酚氧化酶、双酚氧化酶和漆酶<sup>[1]</sup>。它在动植物体酶促褐变、体内色素合成的过程中起了关键作用<sup>[2]</sup>,更是果蔬酶促褐变过程中起重要作用的一种酶<sup>[3-4]</sup>。它能将酪氨酸羟化,产生 3,4-二羟基苯丙氨酸(*L*-多巴),然后再

将多巴氧化成多巴醌,多巴醌自发聚合且和细胞内蛋白质的一些氨基酸基团发生反应,产生黑色和褐色的物质,导致组织酶促褐变<sup>[5]</sup>,因此 PPO 是引起褐变的关键酶。褐变问题一直是很多果蔬收获后保藏、加工等过程中导致质量下降,经济价值降低的一个非常重要的问题,因此研究防止褐变的 PPO 抑制剂是农产品加工需要解决的主要问题。*L*-半胱氨酸(*L*-半胱氨酸)作为一种高效安全的 PPO 抑制剂,在食品保鲜中的应用已有研究<sup>[6]</sup>。本研究以马铃薯、苹果和甘薯为研究对象,探讨 *L*-半胱氨酸和金属离子对马铃薯、苹果和甘薯 PPO 活性的调控,为防止果蔬贮藏加工过程中褐变提供理论基础。

收稿日期:2014-11-12

基金项目:河南省教育厅项目(编号:12B180002)。

作者简介:廖春丽(1980—),女,河南信阳人,硕士,讲师,从事微生物发酵研究。Tel:(0375)2089072;E-mail:liao20130427@163.com。

在品质提升和香气风格改善方面都有明显的提升。每个温度馏分的成分组成和含量与其香气风格特征和在卷烟中的吸味有着密切联系。80~95℃馏分富集了一些具有青香、果香和甜香的成分,在卷烟加香中增加了香气的丰富性;110~115℃的馏分与原油在成分组成上一致,但通过内部成分含量的调整后与自然烟香更协调了。另外,虽然 110~115℃馏分和 115℃蒸余物在卷烟加香中都存在明显的缺陷,但是这 2 组馏分的柠檬醛相对含量分别高达 84.20% 和 93.36%,可进一步加工获得高纯度的柠檬醛或者直接用作调配柠檬香味的香料。本研究在用精密精馏技术处理柠檬草精油提高其在烟草中的适用性的同时,也为柠檬草的充分开发和利用提供了一定的理论依据。

## 参考文献:

- [1] 冯兰香,杜永臣,刘广树. 蓬勃发展中的台湾芳香植物产业[J]. 中国蔬菜,2004(2):45-47.
- [2] Blanco M M, Costa C, Freire A O, et al. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice[J]. Phytomedicine, 2009,16(2/3):265-270.

- [3] 杨 欣,姜子涛,李 荣. 天然食用香料柠檬草精油的研究进展[J]. 食品研究与开发,2010,31(8):217-219.
- [4] 王 勇,王瑞祥,李永辉. 新鲜海南柠檬草精油的 GC-MS 分析[J]. 海南医学院学报,2012,18(9):1203-1205.
- [5] 袁爱萍,陆建荣,丁立生. 云南柠檬草油化学成份研究[J]. 广西植物,1990,10(4):369-371.
- [6] 靳海波,郭志武,李达仁,等. 精密精馏分离 C<sub>6</sub> 烷烯烃的研究[J]. 石油化工高等学校学报,2004,17(3):23-26.
- [7] 张维刚,方岩雄,宋启煌,等. 精密精馏分离光学异戊醇研究[J]. 化学工程,2000,28(4):10-11,17.
- [8] 田文彦. C<sub>9</sub> 芳烃中连三甲苯与茚满的精密精馏及分离[J]. 精细石油化工,2008,25(1):63-65.
- [9] 谢剑平. 烟草与烟气化学成分[M]. 北京:化学工业出版社,2011.
- [10] 杨森艳,姚 雷. 柠檬草精油抗菌性研究[J]. 上海交通大学学报:农业科学版,2005,23(4):374-376,382.
- [11] 谢剑平. 烟草香原料[M]. 北京:化学工业出版社,2009.
- [12] 香料解析(二十六):罗勒烯[J]. 国内外香化信息,2013(11):15-16.
- [13] 张悠金,金闻博. 烟用香精香料[M]. 合肥:中国科学技术大学出版社,1996.

1 材料与方法

1.1 材料

无花号马铃薯、红富士苹果、甘薯(市售)。

1.2 方法

1.2.1 PPO 的分离纯化 将在 4 ℃ 冰箱中预冷的马铃薯、苹果、甘薯洗净后去皮,分别切块,称取 100 g 加入 300 mL 冷冻丙酮(−20 ℃),匀浆 2 min,然后抽滤,滤饼再用冷冻丙酮提取,反复 3 次抽滤至无色,继续抽干至无丙酮味,即制得马铃薯丙酮干粉。制得干粉置于冰箱中于 −20 ℃ 冷冻保存,使用时分别称取 5 g 干粉,以 1 g : 8 mL 的比例溶于在 4 ℃ 冰箱中预冷的 0.2 mol/L 磷酸缓冲溶液(pH 值 6.8)中,搅拌 10 min (整个试验操作都在冰上进行),然后用冷冻离心机(4 ℃)于 15 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液,即得 3 种作物的 PPO 粗酶液<sup>[7]</sup>。粗酶液进一步用 40% 饱和度硫酸铵盐析(缓慢加入并搅拌,直至完全溶解),然后用冷冻离心机(4 ℃)于 6 000 r/min 离心 20 min,弃除沉淀,向收集到的上清液中加入 70% 饱和度硫酸铵(缓慢加入并搅拌,直至完全溶解),最后在冷冻离心机(4 ℃)中,于 6 000 r/min 离心 20 min,收集沉淀,沉淀用 4 ℃ 预冷的 PBS 溶解,得纯化的 PPO 酶液。

1.2.2 PPO 活性的测定 参照 Franceso 等的方法<sup>[8-9]</sup>,作部分修改。总反应体系 9.5 mL,在 6 mL 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 6.8)的反应体系中,加入 1 mL 0.1 mol/L 的邻苯二酚溶液为底物,置于 30 ℃ 恒温水浴锅中保温 10 min,再加入 0.5 mL 纯化的 PPO 酶液和不同量的 L-半胱氨酸,30 ℃ 间隔 1 min 在 475 nm 波长下测定吸光度  $D_{475\text{ nm}}$ ,测定 5 次,每次重复 3 次。以不加 L-半胱氨酸为对照,各处理取 4 mL 样品提取液进行比色。

1.2.3 PPO 活性的计算 本试验以邻苯二酚为底物,在 PPO 催化下生成有色产物。其显色物质在 475 nm 处有最大吸收,吸光度在单位时间内的变化和单位酶活性成正比。制作  $D_{475\text{ nm}}$  随时间变化的曲线,根据曲线的初始线性部分计算 1 min 吸光度变化值  $\Delta D_{475\text{ nm}}$ ,然后以 1 g 鲜质量果蔬样品 1 min 吸光度变化值增加 1 时为 1 个 PPO 活性单位(U)<sup>[10]</sup>,相关公式为:

$$\text{PPO 活性} = \frac{\Delta D_{475\text{ nm}} \times V}{\Delta t \times V_s \times m}$$

式中: $\Delta D_{475\text{ nm}}$ 为反应混合液的吸光度变化值; $\Delta t$ 为酶促反应时间,min; $V$ 为样品提取液总体积,mL; $V_s$ 为测定时所取样品提取液体积,mL; $m$ 为样品质量,g。

1.2.4 金属离子对酶活性的影响 为了测定金属离子对 PPO 的影响,按表 1 所示组成反应体系,按“1.2.2”节方法测定 PPO 活性,按“1.2.3”节方法计算 PPO 活性,最后按下面公式计算 PPO 相对活性:

$$\text{PPO 相对活性} = \frac{\text{测定组 PPO 活性} - \text{对照组 PPO 活性}}{\text{对照组 PPO 活性}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 L-半胱氨酸对马铃薯 PPO 活性的影响

L-半胱氨酸对马铃薯中 PPO 活性的抑制作用也非常强,随着浓度越大,酶活性降低越多(图 1);当添加 0.05 mmol/L

表 1 金属离子对多酚氧化酶影响试验反应体系组成

组别	样品	各试剂用量(mL)				
		磷酸缓冲液	0.1 mol/L 邻苯二酚	0.2 mmol/L L-半胱氨酸	金属离子溶液	相对纯化 PPO 溶液
对照组	测定样	7	1	0	1	0.5
	对照样	8	1	0	0	0.5
测定组	测定样	6	1	1	1	0.5
	对照样	8	1	0	0	0.5

注:金属离子包括 CaCl<sub>2</sub>、NaCl、CuSO<sub>4</sub>、MnCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>3</sub>,浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 mmol/L。

L-半胱氨酸,马铃薯中 PPO 活性抑制率为 60%;当添加 0.20 mmol/L L-半胱氨酸,马铃薯中 PPO 活性抑制率为 90%~92%,而且随着时间的延长,最大抑制率变化不大。

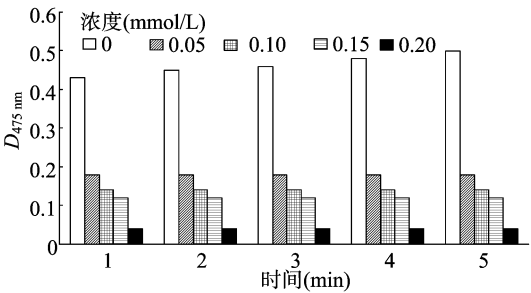


图 1 L-半胱氨酸对马铃薯 PPO 活性的影响

2.2 L-半胱氨酸对苹果 PPO 活性的影响

从图 2 中看出,L-半胱氨酸对苹果中的 PPO 活性有明显的抑制作用,随着浓度越大,酶活性降低越多:当添加 0.10 mmol/L L-半胱氨酸,1 min 时苹果中 PPO 活性抑制率为 50%;当 L-半胱氨酸添加量为 0.05 mmol/L,反应 2 min,苹果中 PPO 活性抑制率为 50%;添加 0.20 mmol/L L-半胱氨酸,苹果中 PPO 活性抑制率为 90%~97%,而且随着时间的延长,最大抑制率变化不大。加入抑制剂之后 PPO 活性几乎没有增长,这说明 L-半胱氨酸对 PPO 活性的抑制作用是属于不可逆的。

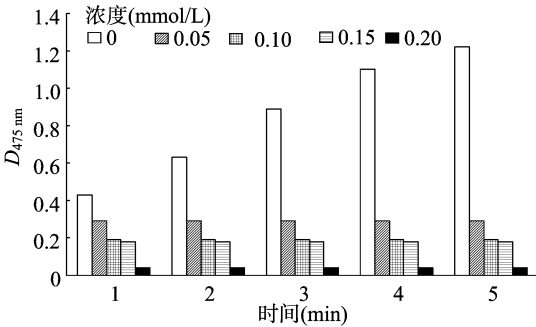


图 2 L-半胱氨酸对苹果 PPO 活性的影响

2.3 L-半胱氨酸对甘薯 PPO 活性的影响

甘薯是一种淀粉含量较高的蔬菜,洗净去皮的甘薯在空气中 30 s 内表面就能变黑,所以说甘薯中 PPO 活性非常高。由图 3 可见,L-半胱氨酸对甘薯中 PPO 活性的抑制作用也非常强,浓度越大,酶活性降低越多:当添加 0.10 mmol/L L-半胱氨酸,甘薯中 PPO 活性抑制率为 50%;当添加 0.20 mmol/L L-半胱氨酸,甘薯中 PPO 活性抑制率为

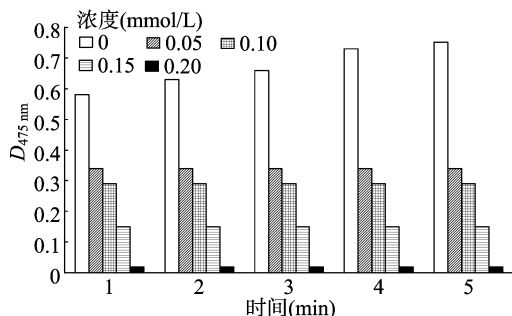


图3 L-半胱氨酸对甘薯 PPO 活性的影响

96%~97%。随着时间的延长,最大抑制率变化不大。

#### 2.4 金属离子对马铃薯、苹果和甘薯 PPO 活性的影响

从表 2 可知,无论是马铃薯、苹果还是甘薯, $Mn^{2+}$  和  $Fe^{3+}$  对它们的酶活性不仅没有抑制,反而是激活作用,且随着离子浓度的增加,激活越明显。 $Ca^{2+}$ 、 $Na^{+}$  和  $Cu^{2+}$  对酶活性有一定的抑制作用,其中对马铃薯、苹果和甘薯 PPO 活性抑制作用最强的是  $Cu^{2+}$ ,随着  $Cu^{2+}$  浓度的增大,PPO 的活性逐渐下降。在  $Cu^{2+}$  浓度为 3.0 mmol/L 时对马铃薯 PPO 活性抑制率达到 49.1%,对苹果 PPO 活性抑制率达到 60.8%,对甘薯 PPO 活性抑制率达到 69.7%。

表 2 金属离子对马铃薯、苹果和甘薯 PPO 活性的影响

作物	金属离子浓度 (mmol/L)	不同金属离子处理的 PPO 活性抑制率 (%)				
		$Ca^{2+}$	$Na^{+}$	$Cu^{2+}$	$Mn^{2+}$	$Fe^{3+}$
马铃薯	0.5	-26.6	-17.3	-29.7	+1.6	+3.7
	1.0	-30.0	-25.4	-34.0	+5.3	+8.0
	1.5	-26.0	-29.2	-37.6	+7.8	+10.9
	2.0	-40.0	-34.6	-41.4	+8.1	+13.5
	3.0	-32.0	-36.7	-49.1	+11.2	+18.6
苹果	0.5	-34.8	-25.8	-34.8	+3.6	+10.2
	1.0	-29.8	-23.7	-33.1	+6.7	+8.7
	1.5	-31.6	-24.2	-49.8	+8.4	+16.0
	2.0	-32.3	-29.9	-52.2	+8.9	+19.6
	3.0	-30.9	-34.3	-60.8	+10.0	+23.0
甘薯	0.5	-21.2	-19.8	-31.4	+6.2	+7.8
	1.0	-19.2	-16.6	-41.7	+20.8	+29.3
	1.5	-23.4	-19.7	-49.6	+31.4	+37.8
	2.0	-30.0	-20.9	-53.2	+32.8	+41.7
	3.0	-27.7	-29.7	-69.7	+34.0	+40.2

注:“+”代表激活作用,“-”代表抑制作用。

### 3 结论与讨论

L-半胱氨酸的浓度在 0.20 mmol/L 以内对马铃薯、苹果、甘薯 3 种蔬果中的 PPO 活性都产生抑制作用,而且随着 L-半胱氨酸浓度的升高,抑制作用也更加明显,0.20 mmol/L L-半胱氨酸对 3 种蔬果中的 PPO 活性有最大抑制作用,分别使甘薯、苹果、马铃薯 PPO 的活性下降 44.5%、39.1%、44.8%,也就是说 L-半胱氨酸对 3 种蔬果的抑制作用表现为:马铃薯>甘薯>苹果。

PPO 属于蛋白酶,其在发生作用时需要金属离子的参与,金属离子作为酶的辅基,是不可或缺的,能使酶行使正常的功能,所以在酶存在的环境中,人为地加入一些金属离子,势必

会对 PPO 的活性造成影响,不同的金属离子对 PPO 有不同的影响。因为  $Cl^{-}$ 、 $SO_4^{2-}$  2 种阴离子在一定的浓度范围内,对 PPO 的活性没有影响<sup>[11]</sup>,所以向反应体系中加入 1 mL 不同浓度的  $CaCl_2$ 、 $NaCl$ 、 $CuSO_4$ 、 $MnCl_2$ 、 $FeCl_3$  溶液,对 PPO 的影响都是由于溶液中阳离子的影响。 $Cu^{2+}$  的浓度在 3.0 mmol/L 以内对 3 种作物都有明显的抑制作用,而且都是随着  $Cu^{2+}$  浓度的升高,对 3 种蔬果中的 PPO 的抑制作用也越来越明显,3.0 mmol/L  $Cu^{2+}$  对马铃薯、苹果、甘薯的 PPO 有最大的抑制作用,分别使马铃薯、苹果、甘薯 PPO 活性下降 49.1%、60.8%、69.7%。3 种蔬果对  $Cu^{2+}$  的敏感程度表现为:甘薯>苹果>马铃薯。

在 3.0 mmol/L 的浓度以内,随着  $Na^{+}$  和  $Ca^{2+}$  浓度的升高,3 种作物中的 PPO 活性都表现为逐渐下降,但下降的幅度不大。 $Ca^{2+}$ 、 $Na^{+}$  在 3.0 mmol/L 的浓度时,马铃薯 PPO 活性分别下降 32.0%、36.7%,苹果 PPO 活性分别下降 30.9%、34.3%,甘薯 PPO 活性分别下降 27.7%、29.7%;3 种作物对  $Ca^{2+}$  和  $Na^{+}$  的敏感程度表现为:马铃薯>苹果>甘薯。 $Fe^{3+}$  和  $Mn^{2+}$  在 3 mmol/L 的浓度以内对 3 种作物中的 PPO 有激活作用,两者的激活作用表现为: $Fe^{3+}$ > $Mn^{2+}$ ;3 种作物对  $Fe^{3+}$  和  $Mn^{2+}$  的敏感程度表现为:甘薯>苹果>马铃薯。

#### 参考文献:

- [1] 陈清西,宋康康.酪氨酸酶的研究进展[J].厦门大学学报:自然科学版,2006,45(5):731-737.
- [2] 赵会全,刘望夷.酪氨酸酶的分子生物学研究进展[J].国外医学:分子生物学分册,1991,13(6):273-275,292.
- [3] Sánchez-Ferrer A, Rodríguez-López J N, García-Cánovas F, et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1995, 1247(1): 1-11.
- [4] 韩涛,李丽萍.果蔬多酚氧化酶的抑制及褐变的防治因素[J].北京农学院学报,1999,14(4):88-93.
- [5] Protá G. Progress in the chemistry of melanins and related metabolites[J]. Medicinal Research Reviews, 1989, 8(4): 525-556.
- [6] İyidoğan N F, Bayındır A. Effect of L-cysteine, kojic acid and 4-hexylresorcinol combination on inhibition of enzymatic browning in Amasya apple juice[J]. J Food Engineering, 2004, 62: 299-304.
- [7] 王磊,阮征,骆成尧,等.马铃薯多酚氧化酶酶学特性及热稳定性模型的研究[J].食品工业科技,2012,33(19):92-96.
- [8] Franceso P. Inhibition of apple polyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 1993, 17(1): 21-30.
- [9] Kouakou T H, Kouadio Y J, Kouamé P, et al. Purification and biochemical characterization of polyphenol oxidases from embryonic and nonembryonic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cells[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 158(2): 285-301.
- [10] 黄绍华,胡晓波,王震宙,等.山药中多酚氧化酶的活性测定及其护色研究[J].食品与发酵工业,2005,13(6):27-29.
- [11] 薛超彬,王勤,贺量,等.金属离子对菜青虫酚氧化酶活性的影响[J].厦门大学学报:自然科学版,2005,44(增刊1):120-122.