

红肉桃皮中多酚氧化酶的酶学特性及结构表征

黄行健 程玉鑫 刘思宇 徐晓云 胡婉峰 潘思轶

华中农业大学食品科学技术学院/环境食品学教育部重点实验室, 武汉 430070

摘要 以红肉桃桃皮中多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)作为研究对象,采用 Tris-HCl 缓冲液进行提取并采用硫酸铵盐析法和柱层析法进行纯化,电泳得到单一的条带。根据米氏常数确定桃皮 PPO 的最适底物为邻苯三酚,采用分光光度计法测定桃皮中多酚氧化酶的活性,其最适温度为 45 ℃、最适 pH 值为 7.0~7.5, PPO 在中性 pH 值环境中以及 55 ℃ 以下更为稳定。分别应用圆二色谱仪、荧光光谱仪、动态散射光谱仪对 PPO 的结构进行表征。圆二色谱表明,该 PPO 二级结构包含 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角以及无规卷曲等结构,其含量分别为 50.61%、32.47%、10.83% 和 6.21%。荧光光谱表明,该 PPO 最大发射波长为 352 nm,相对荧光强度为 133.9,表明荧光基团处于极性亲水环境中。动态散射光谱显示,该 PPO 粒径分布集中在 255 nm 处,表明其在溶液中以聚集形态存在。

关键词 红肉桃皮; 多酚氧化酶; 酶促褐变; 酶学性质; 结构表征

中图分类号 TS 255.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)03-0114-08

红肉桃(*Prunus persica* (L.) Batsch)是湖北省特色桃品种之一,又称血桃,其果肉呈红色或紫红色。红肉桃果实风味香甜,肉质鲜美,质地脆嫩^[1]。然而受传统消费习惯及果实经济效益所限,红肉桃的种质资源相对于白肉桃和黄肉桃,在桃产业中仅占极小比重。红肉桃中花色苷含量丰富,一些红肉桃资源果实的抗氧化能力可与蓝莓相媲美^[2],深受人们的喜爱。然而,红肉桃在贮藏过程易出现表皮或果肉褐变,导致果肉软绵,风味丧失,营养损耗^[3];同时在加工过程中,多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)催化多酚类化合物的氧化褐变,导致其加工制品色泽深暗,严重影响了红肉桃及其加工制品的食用价值和商品价值^[4-5]。影响褐变的主要因素包括氧气浓度、环境温度、抗氧化剂种类及用量,这些因素的变化影响 PPO 的活性与酚类底物的相互作用。目前国内外对于红肉桃的研究主要集中在其种质资源^[1,6]、色素类成分分析^[7-10]、生理活性评价^[11]等方面。但对于红肉桃的贮藏及加工性能,特别是加工过程中酶促褐变及褐变相关酶的酶学特性鲜见报道。笔者对红肉桃桃皮中 PPO 的酶学特性进行研究,考察红肉桃 PPO 在不同环境下的稳定

性,并采用圆二色谱仪、荧光光谱仪以及动态散射光谱仪对其结构进行表征,为红肉桃加工产业化应用过程中的酶促褐变控制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1) 试验材料。湖北红肉桃购于农贸市场。邻苯二酚、邻苯三酚、间苯二酚、没食子酸、绿原酸、硫酸铵、磷酸氢二钠、考马斯亮蓝 R250、甘氨酸和 TEMED,国药集团化学试剂有限公司;交联聚乙烯吡咯烷酮,美国国际特品公司(International Special Products);丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺和过硫酸铵,武汉谷歌生物科技有限公司;二巯苏糖醇(DTT)、SDS、Tris,上海源叶生物科技有限公司;电泳分子质量 Marker、DEAE-Sephadex-Fast flow 和 Sephacryl S200,GE-Healthcare Amersham 公司。

2) 试验设备。5804 R 离心分离机,德国 Eppendorf 公司;DYY-6C 型电泳仪电源,北京市六一仪器厂;Mini-PROTEAN4 型电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;Nano-ZS 型动态散射光谱仪,马尔文仪器公司;F-4600 型荧光分光光度计,日本日立公司;J-

收稿日期: 2016-01-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31401507)

黄行健,博士。研究方向:蛋白质化学与工程。E-mail: xueshu2007@aliyun.com

通信作者: 胡婉峰,博士,讲师。研究方向: 食品贮藏及加工。E-mail: wanfenghu@mail.hzau.edu.cn

1500型CD光谱仪,日本JASCO仪器公司。

1.2 试验方法

1)PPO的提取、分级及纯化。红肉桃皮洗净,切碎,与0.5 mol/L、pH 7.0的Tris-HCl提取缓冲液(含5%的PVPP)以1:2(体积比)混合榨汁,于4℃浸提过夜。将料液以4 000 r/min离心取上清液,加入硫酸铵粉末进行蛋白质沉淀,至80%饱和度后静置2 h,10 000 r/min离心,取沉淀。用少量Tris-HCl缓冲液溶解沉淀并透析。

经透析后的粗蛋白提取液浓缩并加样于经0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.0)平衡的DEAE Sepharose Fast Flow阴离子交换柱,用平衡缓冲液(500 mL、0.05 mol/L Tris-HCl)冲洗,用含0~1 mol/L NaCl、pH 7.0的Tris-HCl缓冲液500 mL进行梯度洗脱,洗脱速度为1 mL/min。检测各管的PPO活性,收集有活性的组分并浓缩,浓缩后的蛋白质溶液加样于经Tris-HCl缓冲液(pH 7.0)平衡的Sephacryl S200凝胶柱进行分子筛层析分离。以pH 7.0的Tris-HCl缓冲液洗脱,洗脱流速为0.3 mL/min,收集活性组分,浓缩后备用,绘制PPO活性峰^[12]。

2)Native-PAGE和SDS-PAGE电泳。Native-PAGE电泳:0.2 mL非变性样品缓冲液(不含SDS及DTT)与1 mL蛋白质样品混合。分别配制底物5%邻苯三酚染色溶液及考马斯亮蓝(R-250)染色液,Native-PAGE电泳中采用的浓缩胶和分离胶含量分别为5%和15%。样品的上样量为20 μL,Marker为5 μL,电流设置恒流15 mA。电泳完毕后,以5%邻苯三酚溶液作为底物反应溶液,凝胶浸泡并震荡10 s,取出凝胶观察显色条带;将凝胶于考马斯亮蓝(R-250)染色液中染色1 h,转移至脱色液中浸泡至蛋白条带清晰^[12]。

SDS-PAGE电泳:0.2 mL变性样品缓冲液(含SDS及DTT)与1 mL蛋白质样品混合。SDS-PAGE电泳中采用的浓缩胶和分离胶含量分别为5%和12%。样品混合液煮沸5 min,样品的上样量为20 μL,Marker上样量15 μL,电流设置恒流15 mA。电泳完毕后,将凝胶于考马斯亮蓝(R-250)染色液中染色1 h,转移至脱色液中浸泡至蛋白条带清晰^[12]。

3)PPO活性测定。以邻苯二酚为反应底物进行酶活性测定。以0.05 mol/L、pH 6.0的磷酸缓冲液为母液,配制0.1 mol/L的邻苯二酚溶液。反应体系包括0.5 mL酶液和2.5 mL的底物溶液。采

用分光光度计于25℃下记录反应液在420 nm下3 min内的吸光值的变化情况,绘制吸光值随时间变化的曲线,取线性变化范围的斜率作为酶活。即绝对酶活定义为单位酶量在测定条件下单位时间内引起吸光值的改变量^[13]。

4)PPO最适底物的测定。配制邻苯二酚、邻苯三酚、间苯二酚、没食子酸、绿原酸为底物溶液,浓度分别为0.04、0.05、0.06、0.07、0.08 mol/L。参照本文“1.2”3),取0.5 mL酶液与2.5 mL底物混匀,分别测定不同底物浓度下PPO的催化反应速率。计算每种底物反应的米氏常数 K_m ,根据不同的底物浓度[S]及其对应的反应速度 v ,求出两者的倒数,参照Lineweaver-Burk作图法,以 $1/v$ 为纵坐标, $1/[S]$ 为横坐标,绘出直线并外推至与坐标轴相交,纵坐标值即为 $1/v_{max}$,横截距即为 $1/K_m$,即 $K_m = -1/x^{[13]}$ 。

5)PPO最适pH值的测定。为排除缓冲液的组成对PPO活性造成的误差干扰,采用3种缓冲体系对PPO的最适pH值进行测定,并在相邻pH范围内的缓冲液分别设置重叠的pH值。配制0.1 mol/L的柠檬酸缓冲溶液(pH值分别为3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5),0.1 mol/L的磷酸缓冲溶液(pH值分别为5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5),0.1 mol/L Tris-HCl缓冲溶液(pH值分别为7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)。反应体系包括0.5 mL酶液以及2.5 mL 0.1 mol/L的邻苯二酚溶液(以上述不同pH值的缓冲液为母液配制),混匀后参照本文“1.2”3)测定酶活,比较不同pH下酶的活力表现,得出其酶催化反应的最适pH值^[12]。

6)PPO酸碱稳定性的测定。配制0.1 mol/L的柠檬酸缓冲溶液(pH值分别为3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5),0.1 mol/L的磷酸缓冲溶液(pH值分别为5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5),0.1 mol/L Tris-HCl缓冲溶液(pH值分别为7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)。将酶孵育于上述不同pH值的缓冲液中,冷藏放置12 h,透析到中性环境,参照本文“1.2”3)测定PPO活性。以pH为7.0的磷酸缓冲液中蛋白质的活性作为原始活性值,计算各梯度缓冲液作用下蛋白质的残留活性值^[12]。

7)PPO最适温度的测定。设定温度分别为25、35、45、55、65、75、85℃,取样品缓冲液于各温度下预热15 min,与1.0 mol/L邻苯二酚溶液快速混匀,使底物溶液终浓度为0.1 mol/L,迅速加入酶液,参

照本文“1.2”3)测定 PPO 活性,比较其吸光值变化速率,确定 PPO 的最适温度^[12]。

8)PPO 温度稳定性的测定。设定温度分别为 25、35、45、55、65、75、85 °C,取 100 μ L 酶液于各温度下分别处理 15、25、35、45 min,样品溶液于各温度下处理不同时间后,静置于室温,参照本文“1.2”3)测定 PPO 活性,比较不同温度下,处理不同时间后酶活性的变化^[12]。

9)PPO 的结构表征。圆二色谱的测定:采用 0.1 cm 光程的石英样品池。光栅扫描速度设定为 120 nm/min,响应时间为 0.2 s,带宽为 1 nm,扫描范围 190~240 nm。用 pH 为 7 的 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液与 0.062 0 mg/mL 蛋白质样品混合,以不含蛋白质的缓冲液作为空白对照,界面上 HT 不超过 700。所有试验在光电倍增管电压的线性范围内进行。每条谱线采集 3 遍。数据采用圆二色谱仪自带的 YANG-US,jwr 来分析酶的二级结构含量。

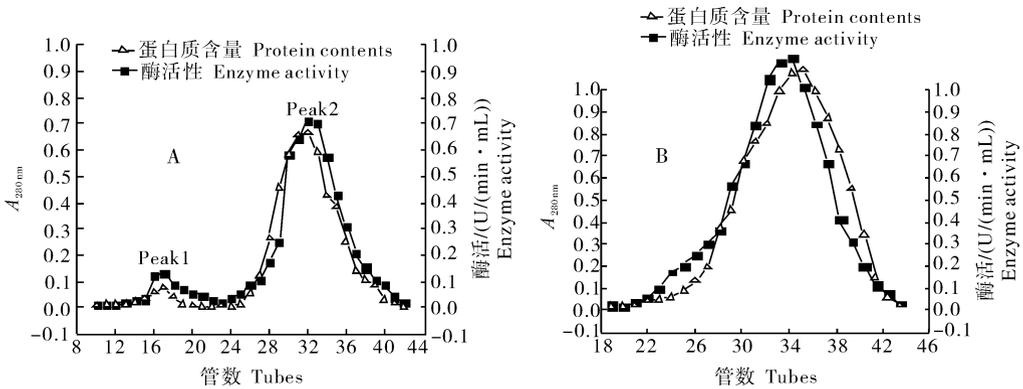
聚集形态分析:开启 NanoZS 等待 30 min 使激光稳定。设置样品参数,散射光为波长 532 nm 的激光,激光反射角为 15°,测定酶溶液的粒度,每组测量重复 3 次。

荧光光谱的测定:配制质量浓度为 0.1 mg/mL 的酶液,进行荧光测定,测定时先在 351.0 nm 发射波长下扫描得到其最大激发波长,然后用最大激发波长对蛋白质进行扫描得到各发射光谱^[14]。激发光谱的操作条件:扫描范围 200~900 nm,扫描速度 240 nm/min,激发狭缝和发射狭缝宽均为 5.0 nm,响应时间 0.1 s,记录数据波长间隔为 0.2 nm,PMT 电压为 400 V。

2 结果与分析

2.1 PPO 纯化结果

粗酶液经 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析的洗脱曲线和经 Sephacryl S200 柱层析分离曲线如图 1 所示。



A: 阴离子交换层析 DEAE Sepharose Fast Flow; B: Sephacryl S200 柱层析 Sephacryl S200.

图 1 蛋白质洗脱曲线

Fig.1 Protein elution profiles

先采用不含 NaCl 的平衡缓冲液洗脱杂蛋白,之后采用 1 mol/L NaCl 的平衡缓冲液。在梯度洗脱过程中主要出现 2 个酶活峰,其中第 1 个蛋白质吸收峰的蛋白质含量不高但有酶活,第 2 个蛋白质吸收峰的蛋白质含量较高,2 个蛋白质吸收峰与酶活峰重叠,表明至少有 2 种含有 PPO 活性的蛋白质。2 个蛋白质峰分别命名为峰 1 和峰 2。每隔 1 管进行酶活性检测,如图 2 所示,可知 16~18 管,28~38 管颜色相对较深,表明这些管中蛋白质有酶活性。这些管的位置正好与洗脱的蛋白含量高峰管相对应。收集活性峰,预处理试验测定峰 1 蛋白质含量极少,峰 2 蛋白质含量较高,收集峰 2 蛋白质样

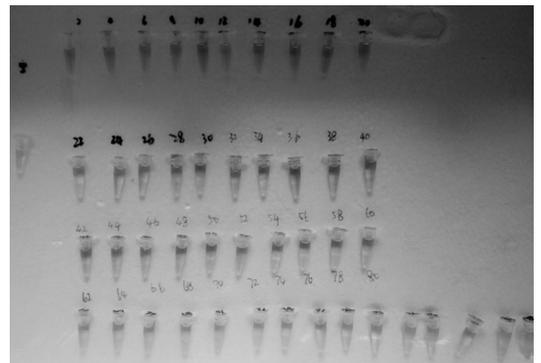


图 2 小管检测颜色对比图

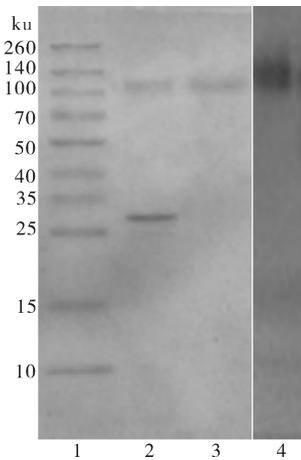
Fig.2 Color comparison chart of small tubes detection

液经超滤杯浓缩,再经 Sephacryl S200 柱进行层析分离。在洗脱过程中出现 1 个紫外吸收峰,且该吸收峰和酶活性峰重叠(图 1B),表明该蛋白值吸收峰主要为酶蛋白。

2.2 PPO 的 SDS-PAGE 和 Native-PAGE 电泳结果

峰 2 PPO 经 Sephacryl S200 柱层析纯化浓缩后,经 SDS-PAGE 电泳、Native-PAGE 电泳以及底物染色,对蛋白质进行分析(图 3)。

如图 3 所示,采用考马斯亮蓝染色时,PPO 在 Native-PAGE 电泳胶上呈现单一的蛋白条带,通过迁移率比对,其分子质量约为 120 ku,而在 SDS-PAGE 上则显示为 1 条 29 ku 左右亚基条带,说明该 PPO 可能为一个四聚体。这一亚基的分子质量比蛇果(38 ku)^[15]、茄子(58 ku)^[16]、柿(22~28 ku)^[17]更低。PPO 在 Native-PAGE 电泳胶上可被邻苯三酚底物染色并显示单一条带,其位置与考马斯亮蓝染色的条带位置相同,因此,可确定此蛋白质为目标 PPO。



1: SDS-Marker; 2: PPO SDS-PAGE; 3: PPO Native-PAGE; 4: 底物染色 Stained by pyrogallol.

图 3 PPO 电泳图

Fig.3 PPO electrophoresis patterns

2.3 PPO 的酶学性质

1)PPO 的最适底物。不同浓度的邻苯二酚、邻苯三酚溶液,与蛋白质作用的反应速率结果如图 4 所示。由图 4 可知,邻苯三酚和邻苯二酚催化蛋白质反应的速率皆与底物浓度成线性变化,且邻苯二酚反应速率随浓度的增大变化较快,邻苯三酚反应速率变化较慢。

米氏(Michaelis-Menten)方程是表示一个酶促反应的起始速度 v 与底物浓度 $[S]$ 关系的速度方程,是在假定存在一个稳态反应条件下推导出来的,

K_m 只由酶的性质决定,而与酶的浓度无关。由图 5 可知,邻苯三酚 K_m 值为 0.012 70,邻苯二酚 K_m 值为 0.024 20。由于 K_m 值反映的是酶与底物的亲和力, K_m 值越小,表示亲和力越好。比较可知,红肉桃中 PPO 与邻苯三酚的结合力较强,最适底物为邻苯三酚。PPO 能催化氧化酚羟基为羰基,酚羟基的数目越多,PPO 活性越高。同时同一苯环中,相邻的酚羟基比相间或者相对的酚羟基显现出更高的活性。

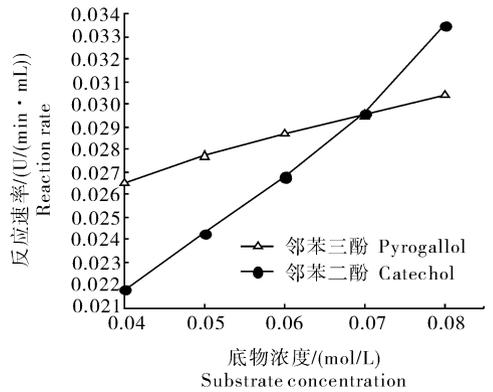


图 4 不同底物浓度与 PPO 活性的关系

Fig.4 Different substrate concentrations relationship with PPO activity

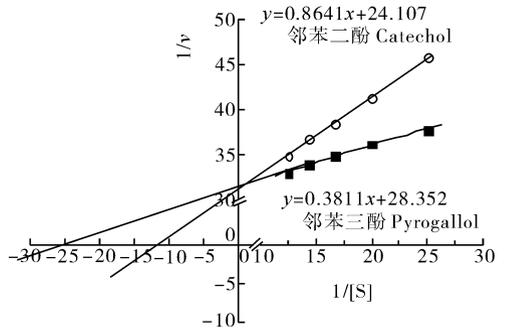


图 5 米氏常数的测定

Fig.5 Determination of the K_m

2)PPO 的最适作用 pH 值。为避免不同缓冲体系对蛋白质活性造成影响,试验中 3 组缓冲体系的 pH 值两两覆盖,以保证测出的 PPO 活性不受缓冲体系的干扰。PPO 在不同缓冲液、不同 pH 条件下的酶活性值测定结果如图 6 所示。PPO 的最佳反应 pH 值为 7.0~7.5,柠檬酸缓冲液环境为酸性环境,PPO 活性随 pH 升高而升高,Tris-HCl 缓冲液中的 PPO 活性随 pH 升高而降低。在 pH7.0 时,PPO 活性是在 pH 5.0 时活性的 4 倍,相比 pH 6.5 时酶活性升高 37.5%。pH 7.5~8.0 之间,酶活性

下降较快,降低 45.50%。分别测定柠檬酸缓冲液和磷酸缓冲液环境中的样品,活性值并不重叠,相同 pH 值不同缓冲液环境,仍会对 PPO 活性造成影响。

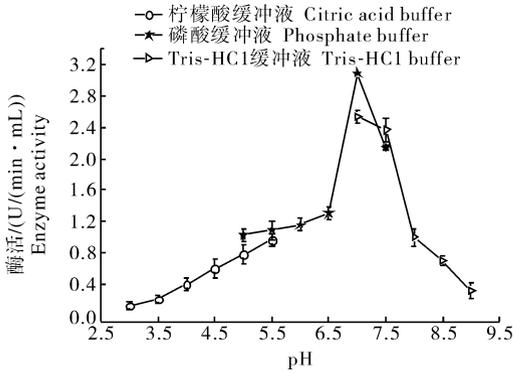


图 6 不同 pH 值下 PPO 的活性

Fig.6 PPO activity at different pH values

3)PPO 的最适作用温度。样品分别在不同温度下处理 15 min,测定 PPO 活性值(图 7)。在 45 °C 之前随温度升高活性增大,在 45 °C 处达到最高活性,45~65 °C 条件下,活性随温度升高下降缓慢,继续升温 PPO 活性下降较快,至 75 °C 时活性降为最高值的 13.30%。温度对 PPO 的活性影响是双重的,低于最适温度下,温度升高活性增大,加快 PPO 催化反应速度,高于最适温度时,随着温度升高活性降低,高温条件下 PPO 发生不可逆的变性,丧失催化反应的能力。

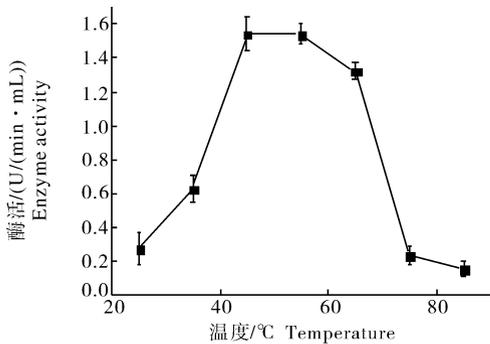


图 7 不同温度处理后 PPO 的活性

Fig.7 PPO activity at different temperatures

4)PPO 的 pH 稳定性。在最适温度 45 °C 条件下,不同缓冲液的不同 pH 值条件下,测定 PPO 残余活性值(图 8)。在柠檬酸缓冲液和 Tris-HCl 缓冲液环境中,PPO 的残余活性随 pH 值变化相对较快,磷酸缓冲液中 PPO 残余活性随 pH 变化缓慢。柠檬酸缓冲液中的 PPO 活性处于潜伏状态,随 pH

升高活性逐渐释放。在 pH 7.0~7.5,PPO 残余活性值为 1,达到最佳状态,随着 pH 的继续升高,PPO 活性受到抑制。较高酸性条件下以及碱性条件下 PPO 的活性较低,在低酸性以及接近中性条件下活性较高,pH 7.0~7.5 活性最高。

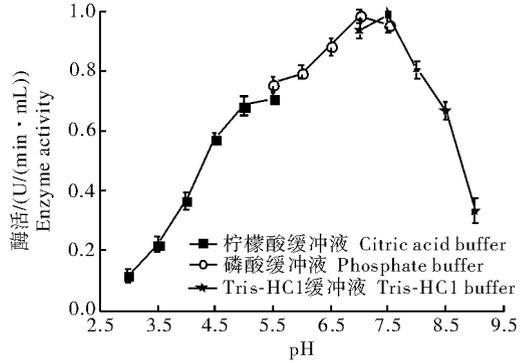


图 8 pH 稳定性测定结果

Fig.8 PPO stability at different pH values

5)PPO 的温度稳定性。样品加于 pH 7.0 磷酸缓冲液中,不同温度处理不同时间后,测量其残余活性(图 9)。25、35 °C 条件下,处理时间小于 35 min,PPO 处于潜伏状态,随着处理时间的延长,残余活性逐渐提高,即在较低温度下,延长处理时间,有利于激发 PPO 活性。45 °C 条件下,处理 15 min PPO 活性被激活,随着时间的延长,活性逐渐提高,处理 35 min 活性最高。55 °C 条件下,PPO 活性被激发,处理 25 min,出现酶活性的最高峰值,随着时间的延长,活性下降。这说明在 55 °C 条件下分子动能增大,PPO 表面基团暴露,与底物结合更充分,从而残余活性增高。65 °C 条件下 PPO 活性被抑制,残余活性随处理时间呈线性变化,处理时间越长 PPO 残余活性越低。在 75、85 °C 条件下,PPO 处理 15 min 即钝化,处理 25 min 完全失活。55 °C 处理 25 min

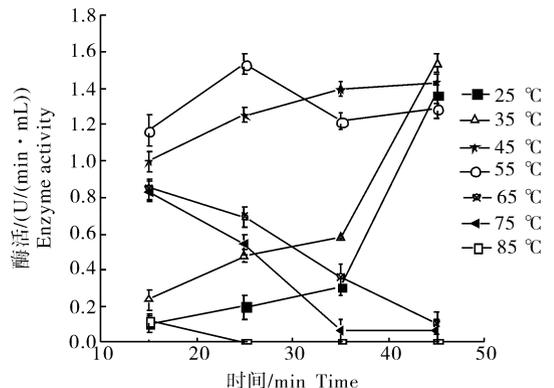


图 9 不同温度处理后的 PPO 残余活性

Fig.9 PPO residual activity at different temperatures

的残余活性高于 15 min, 在处理时间相同时, 高温处理下相比低温, PPO 整体残余活性较低。

2.4 PPO 结构表征

1) 圆二色谱分析。PPO 圆二色谱图结果如图 10 所示。PPO 在 197 nm 处出现正的圆二色峰, 在 203 nm 处出现负的圆二色峰, 有典型的 α -螺旋的双凹槽图形。根据 Young 式算法得出二级结构含量, 结果表明, α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲的含量分别为 50.61%、32.47%、10.83% 和 6.21%。

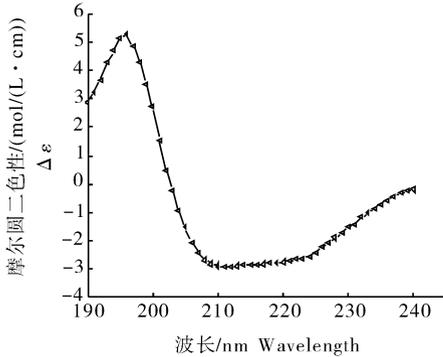


图 10 PPO 的圆二色谱图

Fig.10 CD spectra of PPO

2) 动态散射光谱分析。PPO 的粒径测量结果如图 11 所示。粒径集中分布在 255 nm 处, 对应光强最高达到 38.05%, 粒径分布范围为 190~396 nm, 且在 220~295 nm 范围内光强较高。从 PPO 粒径分布可知, 溶液状态下的蛋白呈现出天然的聚集状态, 可能由蛋白质单体分子在氢键、疏水相互作用和静电相互作用下而自发聚集, 形成稳定而均匀分布的胶体溶液。

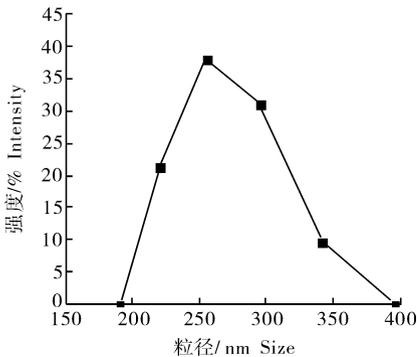


图 11 PPO 粒径分析结果

Fig.11 The analysis of PPO particle size distribution

3) 荧光光谱分析。PPO 荧光光谱如图 12 所示。PPO 最大发射波长在 352 nm 处, 相对荧光强度为 133.9。荧光基团处于极性环境中, 暴露于亲水环境中^[18]。

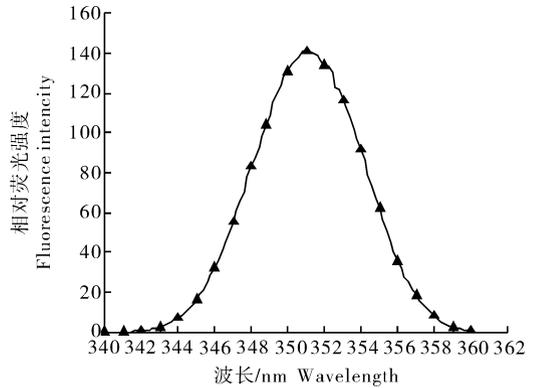


图 12 PPO 的荧光光谱图

Fig.12 Fluorescence spectra of PPO

3 讨论

本试验以红肉桃皮为原料提取桃皮中 PPO, 在 PPO 纯化过程中采用 DEAE Sepharose Fast Flow 柱, 该柱填料为弱阴离子交换柱, 对酸性蛋白质有较强的吸附力。在低盐或无盐的洗脱液中, 酸性蛋白质可以牢固地吸附于柱填料上, 而其他蛋白则可在洗脱过程中被除去。通过洗脱峰和电泳条带, 可知红肉桃皮中至少有 2 种同工酶, 与底物反应均显示活性, 以含量较高且活性较高的 PPO 为研究对象, 其最适底物为邻苯三酚。

PPO 在中性 pH 环境下活性最高, 在酸性环境下活性较稳定。碱性和酸性环境都不利于其与底物发生反应。大部分的蛋白质都是在中性环境中发挥最大的催化活力。已报道的 PPO 的最佳反应 pH 值在 5.5~7.5 之间^[19], 其最适温度为 45℃。PPO 在较高温度下会被激活, 同时在较低温度下, 活性较稳定。因此, 在红肉桃果加工过程中, 调节适当的糖酸比, 降低果汁中的 pH 值, 在较低温度下保存可避免果肉褐变。

蛋白质的二级结构主要有 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲, 其中常见的二级结构有 α -螺旋和 β -折叠^[13]。二级结构是通过骨架上的羰基和酰胺基团之间形成的氢键维持的, 氢键是稳定二级结构的主要作用力^[13]。圆二色谱(CD)的紫外区段(175~240 nm)主要生色团是肽链, 这一波长范围的 CD 谱包含了蛋白质大分子主链构象的信息。典型的 α -螺旋构象的 CD 谱在 222、208 nm 处呈负峰, 在 190 nm 附近有正峰。而典型的 β -折叠构象的 CD 谱, 在 217~218 nm 处有负峰, 在 195~198 nm 处有 1 个

强正峰。无规则卷曲构象的 CD 谱在 198 nm 附近有负峰,在 220 nm 处有 1 个小而宽的正峰。蛋白质的 CD 谱是这几种构象 CD 谱的综合显示^[13]。红肉桃皮中 PPO 的 α -螺旋含量较高。研究表明^[20],PPO 的活性中心多存在于 α -螺旋结构中。但也有报道番木瓜中 PPO α -螺旋和 β -折叠含量分别为 10% 和 30%^[21],可能由于 PPO 在不同物种中的构象不同导致。

蛋白质变性后,蛋白质分子的结构改变,聚集状态发生变化,空间改变。这一变化可以导致流体动力学半径的变化,光散射技术可以用来检测这一变化过程。粒径结果表明,PPO 处于聚集的状态中。PPO 分子间的作用力以及氢键的作用等结合力,共同构成了其聚集的空间结构。

蛋白质分子中发射荧光的氨基酸 Trp、Tyr 以及 Phe 由于其侧链生色基团的不同而有不同的荧光激发和发射光谱。因为 Phe 在绝大多数试验条件下不被激发,所以很少能观察到 Phe 的发射,因而蛋白质的内源荧光主要来自 Trp 和 Tyr 残基。在这些内源荧光团中,色氨酸的消光系数最高,可作为能量转移的受体。暴露于溶剂中的色氨酸的最大发射波长为 352 nm,埋藏于蛋白质内部的色氨酸的最大发射波长变化较大,从 307 nm 到 352 nm 都可。PPO 荧光结果表明,其荧光处于极性环境中,有利于酶促催化反应的发生。

参 考 文 献

[1] 王富荣,何华平,龚林忠,等.湖北地方红肉桃种质资源收集、评价及利用[J].湖北农业科学,2013,52(15):3562-3565.

[2] 俞明亮,马瑞娟,沈志军,等.红肉桃研究与利用进展[J].果树学报,2014,31(5):959-966.

[3] 段玉权,冯双庆,赵玉梅.中华寿桃贮藏期褐变研究[J].沈阳农业大学学报,2002,33(2):129-133.

[4] 阮卫红,邓放明,毕金峰,等.桃汁热处理过程中非酶褐变动力学研究[J].食品科学,2014,35(1):50-55.

[5] 周林燕,王永涛,刘凤霞,等.高压 CO₂ 处理保持非还原桃汁的品质[J].农业工程学报,2013,29(23):262-267.

[6] 王明忠,唐伟,侯仕宣.红肉猕猴桃新品种红华的选育[J].中国果树,2006(1):10-12.

[7] CEVALLOS-CASALS B A, BYRNE D, OKIE W R, et al. Selecting new peach and plum genotypes rich in phenolic compounds and enhanced functional properties[J]. Food chemistry, 2006,96(2):273-280.

[8] 章秋平,李疆,王力荣,等.红肉桃果实发育过程中色素和糖酸

含量的变化[J].果树学报,2008,25(3):312-315.

[9] 王露,孙双勋,邵焯丹,等.红肉桃花色苷的提取纯化及稳定性研究[J].食品工业科技,2014,35(24):113-117,122.

[10] 柳蕴芬,刘莉,段艳欣,等.光对红肉桃果肉红色形成的影响[J].中国农学通报,2010,26(13):308-311.

[11] VIZZOTTO M, PORTER W, BYME D, et al. Polyphenols of selected peach and plum genotypes reduce cell viability and inhibit proliferation of breast cancer cells while not affecting normal cells[J]. Food chemistry, 2014,164:363-370.

[12] CHENG X, HUANG X, LIU S, et al. Characterization of germin-like protein with polyphenol oxidase activity from *Satsuma mandarine* [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2014,449(3):313-318.

[13] HU W, ZHANG Y, WANG Y, et al. Aggregation and homogenization, surface charge and structural change, and inactivation of mushroom tyrosinase in an aqueous system by subcritical/supercritical carbon dioxide [J]. Langmuir, 2011, 27(3):909-916.

[14] MAME N, KNEMEYER J P, SAUER M, et al. Inter- and intramolecular fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan [J]. Bioconjugate chemistry, 2003,14(6):1133-1139.

[15] ZAINI N A M, OSMAN A, HAMID A A, et al. Purification and characterization of membrane-bound polyphenoloxidase (mPPO) from snake fruit [*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss] [J]. Food chemistry, 2013,136(2):407-414.

[16] MISHRA B B, GAUTAM S, SHARMA A. Purification and characterisation of polyphenol oxidase (PPO) from eggplant (*Solanum melongena*) [J]. Food chemistry, 2012, 134(4):1855-1861.

[17] NAVARRO J L, TARREGA A, SENTANDREU M A, et al. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from persimmon [J]. Food chemistry, 2014,157:283-289.

[18] HUANG N, CHENG X, HU W, et al. Inactivation, aggregation, secondary and tertiary structural changes of germin-like protein in *Satsuma mandarine* with high polyphenol oxidase activity induced by ultrasonic processing [J]. Biophysical chemistry, 2015,197:18-24.

[19] MAYER A M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review [J]. Phytochemistry, 2006, 67(21):2318-2331.

[20] BALTACIOGLU H, BAYMDAYMIRLI A, SEVERCAN M, et al. Effect of thermal treatment on secondary structure and conformational change of mushroom polyphenol oxidase (PPO) as food quality related enzyme: A FTIR study [J]. Food chemistry, 2015,187:263-269.

[21] LOOZE Y, BOUSSARD P, HUET J, et al. Purification and characterization of a wound-inducible thaumatin-like protein from the latex of *Carica papaya* [J]. Phytochemistry, 2009,70(8):970-978.

Property and characterization of polyphenol oxidase in red-fleshed peach skin

HUANG Xingjian CHENG Yuxin LIU Siyu XU Xiaoyun HU Wanfeng PAN Siyi

Colloge of Food Science and Technology/MOE Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The polyphenol oxidase in red-fleshed peach skin was extracted in Tris-HCl buffer and purified by ammonium sulfate precipitation and column chromatography. One pure single band was obtained using electrophoresis. According to the Michaelis-Menten constant, the optimal substrate of the PPO was pyrogallol. The optimal temperature and pH of the PPO at 420 nm was 45 °C and 7.0-7.5, respectively. PPO was more stable in neutral pH environment and below 55 °C. Circular dichroism (CD) spectrum, fluorescence spectroscopy, and dynamic light scattering were used to characterize the structures of the PPO. Result of CD spectrum showed that the secondary structure of PPO contained 50.61% α -helix, 32.47% β -folded, 10.83% β -corner and 6.21% random coil. Result of fluorescence spectroscopy showed that the maximum emission wavelength of PPO was 352 nm. The intensity of fluorescence was 133.9, indicating that the fluorophore was in a polar hydrophilic environment. Result of dynamic light scattering showed that the particle size distribution was concentrated at 255 nm, indicating that the PPO was in a gathering state.

Keywords red-fleshed peach skin; polyphenol oxidase; enzymatic browning; enzymological property; structural characterization

(责任编辑：陆文昌)