

鸡腿菇中多酚氧化酶性质及其抑制剂研究

沈莉, 朱凤妹, 杜彬, 张跃 (1. 河北科技师范学院化学系, 河北昌黎066600; 2. 河北科技师范学院食品工程系, 河北昌黎066600; 3. 河北科技师范学院分析测试中心, 河北昌黎066600)

摘要 [目的] 为鸡腿菇的保鲜提供理论依据。[方法] 从新鲜鸡腿菇中提取多酚氧化酶(PPO)的粗酶液, 研究pH值和温度对鸡腿菇PPO活性的影响, 分析其热稳定性, 并探讨亚硫酸氢钠、抗坏血酸和柠檬酸3种抑制剂对鸡腿菇PPO活性的抑制作用。[结果] 在强酸性和强碱性环境中,PPO都会失去活性。PPO酶活性随保温时间的延长呈降低趋势, 说明PPO是一种热敏感性酶。3种抑制剂对鸡腿菇PPO活性均有抑制作用, 其中NaHSO₃的抑制作用最强, 抗坏血酸和柠檬酸次之。[结论] 在鸡腿菇的加工过程中, 添加NaHSO₃能有效降低PPO活性和防止褐变的发生。
关键词 鸡腿菇; 多酚氧化酶; 性质; 抑制剂
中图分类号 S646.1⁺9 **文献标识码** A **文章编号** 0517 - 6611(2008)13 - 05402 - 02

Study on the Properties of Polyphenoloxidase from *Coprinus comatus* and Its Inhibitors
SHEN Li et al (Department of Chemistry, Hebei Normal University of Science and Technology, Changli, Hebei 066600)
Abstract [Objective] The aim of the research was to provide the theoretical basis for the fresh keeping of *Coprinus comatus*. [Method] The crude enzyme liquid of polyphenoloxidase (PPO) was extracted from fresh *C. comatus* to study the effects of pH and temperature on PPO activity in *C. comatus* and analyze its thermal stability And the inhibitions of 3 kinds of inhibitors (sodium sulfite, ascorbic acid and citric acid) on PPO activity in *C. comatus* were discussed. [Result] In strong acidic and strong alkaline circumstances, PPO lost its activity. The enzyme activity of PPO showed a decreasing trend with the prolonging of heat-preservation time, which indicated that PPO was a kind of thermal-susceptible enzyme. Three kinds of inhibitors all had inhibition on the activity of PPO from *C. comatus*. Among them, the inhibition of NaHSO₃ was strongest, followed by ascorbic acid and citric acid. [Conclusion] In the processing course of *C. comatus*, adding NaHSO₃ could effectively decrease PPO activity and prevent the occurrence of browning.
Key words *Coprinus comatus*; Polyphenoloxidase; Property; Inhibitor

鸡腿菇学名为毛头鬼伞(*Coprinus comatus*), 因其形如腿、味似鸡丝而得名, 是近年来人工开发生产的一种具有商业潜力的珍稀食用菌新品^[1]。随着食用价值和药用价值的不断研究与开发, 鸡腿菇将会越来越受到人们的青睐。鸡腿菇的子实体生长很快, 原基形成后3~5 d即达生理成熟, 成熟后的子实体保鲜期很短, 采收3 d内就会开伞、自溶、菌褶褐变, 商品价值下降, 失去食用价值。

多酚氧化酶是蘑菇和其他作物酶促褐变的主要酶类, 引起产品变黑甚至败坏, 导致品质下降, 多酚氧化酶与多酚类物质接触, 催化多酚类物质氧化成醌, 而醌又进一步聚合成黑色素, 严重影响了制品的营养价值、风味以及外观品质^[2-4]。因此, 笔者对鸡腿菇中的多酚氧化酶进行研究, 旨在为鸡腿菇的保鲜防褐变提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料。新鲜鸡腿菇, 市售。

1.1.2 试剂。邻苯二酚、亚硫酸氢钠、抗坏血酸、柠檬酸、磷酸等均为分析纯。

1.1.3 仪器。723型可见光分光光度仪(上海光谱仪器有限公司); A88型组织捣碎机, 研钵, XMTB型数显温控仪(天津市中换实验电炉有限公司); 800型低速离心机(常州市国华仪器厂); SHB III型循环水式多用真空泵, 布氏漏斗, JA2003电子天平(上海良平仪器仪表有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 粗酶液的制备。参照文献[5]的方法并略为改进。取样100 g, 将其转入组织捣碎匀浆机中。加入150 mL pH值为6.0, 0.05 mol/L的磷酸缓冲溶液, 匀浆20 min, 冰浴浸提20

min, 抽滤, 即为多酚氧化酶(PPO)的粗酶液。

1.2.2 PPO活性的测定。向1 cm比色皿中加入1.5 mL pH值为6.0的磷酸缓冲溶液, 0.5 mL 0.5 mol/L的邻苯二酚溶液, 0.5 mL PPO酶液, 混匀后于420 nm处比色, 加酶液同时开始计时, 每隔1 min记录1次吸光度, 连续记录3次。为保证试验的精确性重复上述试验3次, 将得到的数据进行分析取平均数。记录3 min内OD₄₂₀随时间的变化, 以最初直线的斜率(OD/t)计算酶活力, 活力单位为U。

1.2.3 酶活性与pH值关系。取pH值为3.0~8.0一系列磷酸缓冲液1.5 mL加入0.5 mol/L邻苯二酚0.5 mL, 加入酶液0.5 mL, 在420 nm下测定反应产物吸光度。

1.2.4 温度对PPO的影响。将加有1.5 mL, pH值为6.0磷酸缓冲液, 0.5 mL酶液, 取0.5 mL, 0.5 mol/L邻苯二酚的混合液置于水浴中, 分别加热至20、30、40、50、60、70、80、90、95后立即冷却测定其吸光度。

1.2.5 PPO热稳定性的研究。将加有1.5 mL, pH值为6.0磷酸缓冲液, 0.5 mL酶液, 0.5 mL, 0.5 mol/L邻苯二酚的混合液置于水浴中, 加热条件为在20、30、40、50、60、70、80、90、95下测定3、5、10、20、25 min。取出样液后立即冷却, 倒入比色皿中立即测定其吸光度。

1.2.6 抑制剂对鸡腿菇中PPO活性的影响。以0.5 mol/L的邻苯二酚为底物, pH值为6.0的磷酸盐作为缓冲溶液, 在温度25℃条件下, 以下列物质作为抑制剂: Vc(0~5 g/L), NaHSO₃(0~5 g/L), 柠檬酸(0~50 g/L)。在420 nm处进行比色, 测定PPO的活性。

2 结果与分析

2.1 PPO反应进程曲线 由图1可知, PPO能够快速催化氧化邻苯二酚, 反应现象十分明显, 在3 min内, 反应产物与反应时间呈良好的线性关系, 因此选择以3 min之内为基准, 即以3 min的反应产物量来表示酶的活力。

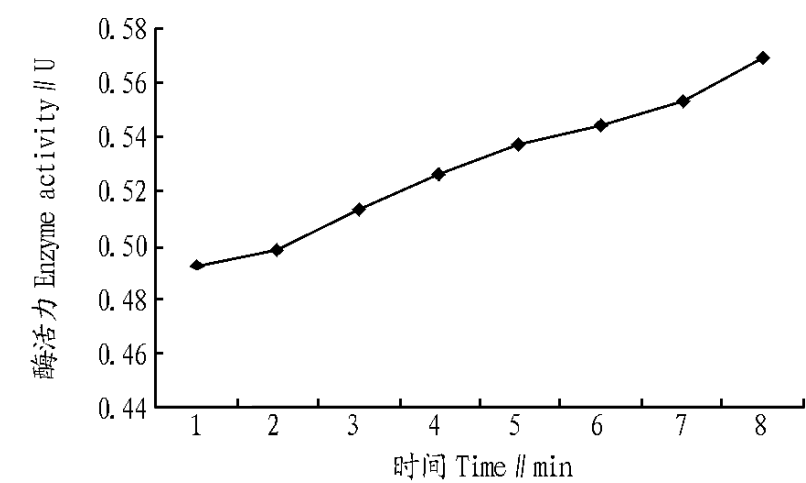


图1 PPO 反应曲线

Fig.1 The reaction curve of PPO

2.2 酶活力与pH 值关系 由于PPO 为含铜蛋白酶,其作用机制在于铜的氧化还原作用。由图2 可知,在强酸性环境下酶中的铜会解离出来,酶失去活性。在强碱性环境中酶蛋白质与铜解离成为不溶性氢氧化铜,多酚氧化酶变性失活。

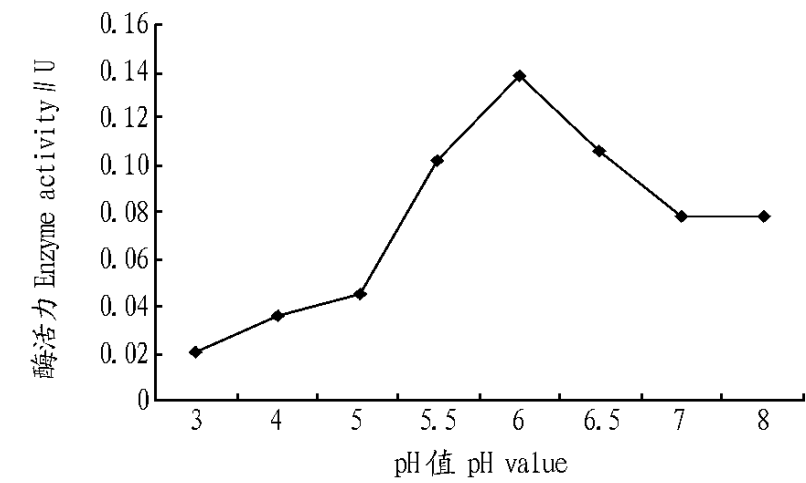


图2 酶活力和pH 值的关系

Fig.2 Relationship between PPO activity and pH

2.3 温度对PPO 的影响 图3 表明,鸡腿菇最合适的酶解温度为30℃,来源不同PPO 的最合适酶解温度虽然基本上是相同的,但温度对其的影响却有很大差异。在沸水浴中PPO 的活力变化很快,加热至95℃时,鸡腿菇酶活力下降到最低点,已经基本失活。

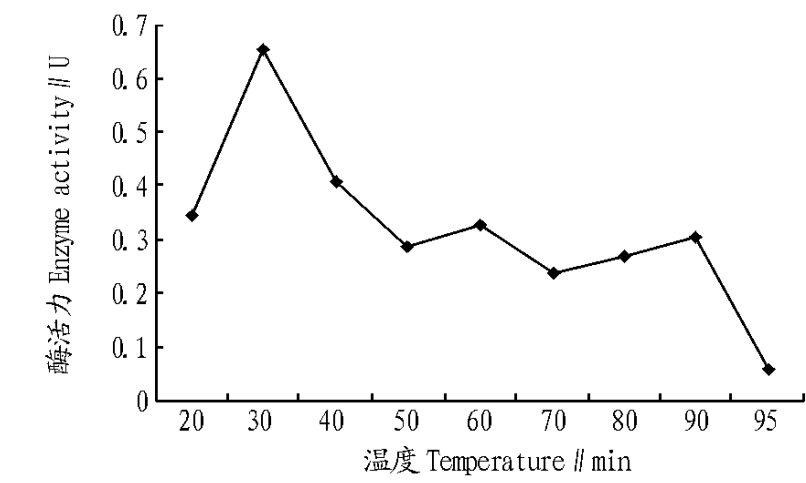


图3 温度对PPO 的影响

Fig.3 Effects of temperature on PPO activity

2.4 PPO 的热稳定性的研究 由图4 可知,在热水浴中PPO 的活力变化很快,随着保温时间持续,酶活性呈现降低的趋势,表明其是一种热敏感性酶。

2.5 抗坏血酸对鸡腿菇中PPO 活性的影响 由图5 可知,抗坏血酸能抑制鸡腿菇中PPO 的活性,随抗坏血酸浓度的升高,酶活性逐渐降低。这表明提高抗坏血酸的浓度能有效地抑制PPO 的活性。抗坏血酸能抑制PPO 活力可能是其将Cu²⁺ 还原成Cu⁺,同时抗坏血酸的存在能抑制醌类物质之间

相互作用而形成高分子聚合物和醌类物质与氨基酸或蛋白质形成大分子复合物的反应,从而抑制了醌进一步聚合成黑色素^[6]。

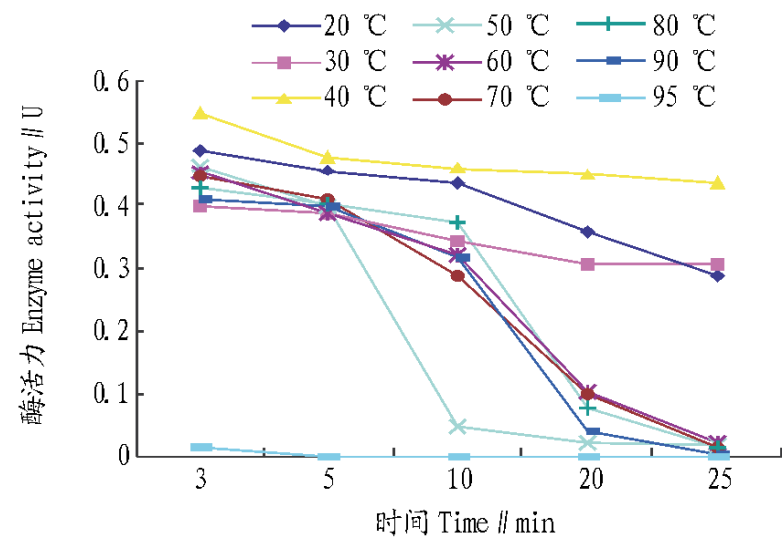


图4 PPO 的热稳定性

Fig.4 The thermal stability of PPO

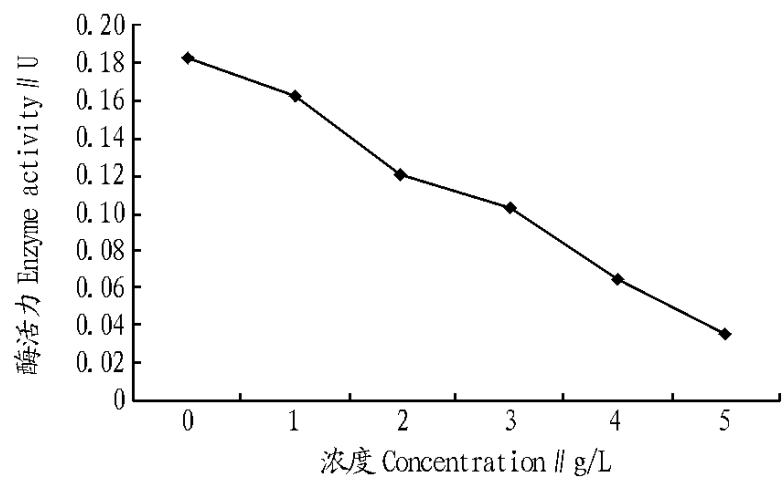


图5 抗坏血酸对PPO 活性的影响

Fig.5 Effects of ascorbic acid on PPO activity

2.6 NaHSO₃ 对鸡腿菇中的PPO 活性的影响 由图6 可以看出,随着NaHSO₃ 浓度增加,酶活力不断减小,当NaHSO₃ 浓度达到1 g/L 时,就可对酶活力产生显著影响。浓度再增加时,酶活力的变化趋势不明显。亚硫酸氢钠是防止果蔬酶促褐变的常用物质,主要通过不可逆地与醌生成无色的加成产物抑制褐变,与此同时降低了PPO 作用于一元酚和二羟基酚的活力。同时亚硫酸氢钠还有漂白和抑制微生物生长的作用^[6]。

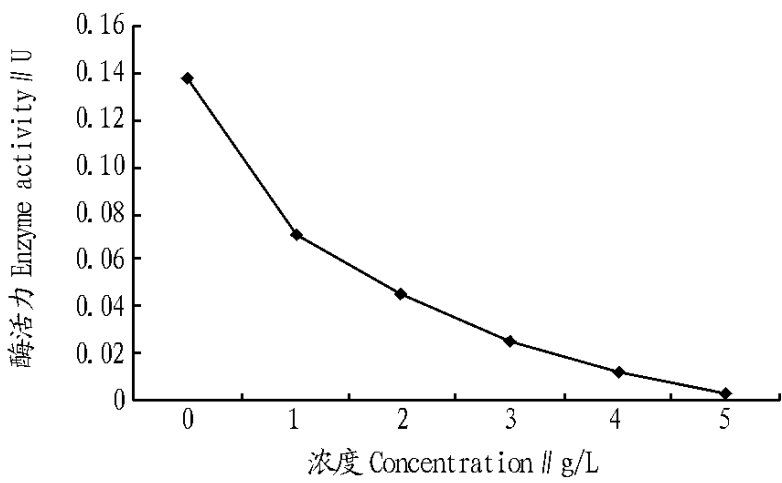


图6 NaHSO₃ 对PPO 活性的影响

Fig.6 Effects of NaHSO₃ on PPO activity

2.7 柠檬酸对鸡腿菇中的PPO 活性影响 由图7 可以看出,随着柠檬酸质量浓度的增加,酶活力不断减小,当柠檬酸浓度达到50 g/L 时,就可使酶活力下降至最低点。柠檬酸在低浓度时对酶活力有一定的促进作用,在高浓度时才有一定的抗褐变效果。原因可能是低浓度的柠檬酸对体系pH 影

表5 混播草种的土壤抗蚀性能

Table 5 Corrosion resistance performance of mixed sowing grass species

组合 Combination	腐殖质 厚度 Humus depth cm	采土体积 Soil volume cm ³	土中根 系鲜重 Fresh weight of root in soil g	土中根 系干重 Dry weight of root in soil g	完全崩解所 需要的时间 Time required for complete disintegration h
	0.6	100	0.55	0.28 b	947 a
	0.4	100	0.24	0.21 b	794 c
	0.7	100	0.67	0.34 a	991 a
	0.4	100	0.28	0.15 c	813 b

注:小写字母表示差异显著性达0.05 水平。
Nte :Dfferent lowercase stand for significart difference at 0.05 level .

根系的抗侵蚀作用。坡面植被层形成了抵抗降雨的缓冲区,可通过分流作用降低坡面侵蚀。植物茎叶的网络桥接延迟了雨水在植被层的下渗^[11]。草本植物作为护坡植被的先锋群落,其地上凋落的枝和贴近地表的叶构成了地表覆盖层,能有效减小雨滴对地面的冲击,增加地面粗糙率,减小地表径流流速,延长地表水入渗土壤时间,大大降低土壤侵蚀量。在单播试验中,黑麦草、高羊茅的盖度较大,0~40 cm 根系生物量显著大于盖度最低的三叶草和狗牙根,且差异主要体现在0~20 cm 土层,其土壤崩解时间也较三叶草和狗牙根短。这与龙忠富等在喀斯特地区的研究报道相似,土壤抗蚀性与其结构、有机质、根系多少和分布有关。草被植物根系量大而密集,土壤的抗蚀性能强。黑麦草播种3 个月后盖度达90 % 以上,5 个月后盖度达100 %,且根系主要分布在0~30 cm 土层内;1 年生黑麦草、多年生黑麦草茎叶吸水率分别为31 % 和30 %;百喜草草被土壤的渗透能力是裸地的2.1 倍^[12]。在混播试验中,出苗时间较单播推迟,但根系生物量明显高于各草种单播。组合 的覆盖度、根系生物量、土壤完全崩解所需要的时间均优于组合 ,可能一方面与狗牙根越冬困难有关,另一方面因混播草种兼容性较强,在空间资源的合理利用与分配上优势明显。张光辉等研究认为,植被保土作用

与其有效覆盖度呈正相关,而土壤侵蚀量随地被覆盖度增大呈指数下降趋势。当地被覆盖度达70 % 以上时可明显防止土壤侵蚀,低于35 % 时侵蚀作用剧烈^[13]。此外,植被覆盖层腐烂后不仅能增加腐殖质层厚度,而且可提高土壤的有机质含量,改善土壤的理化性质^[14]。而该研究混播试验中组合 对覆盖层腐殖质的贡献最大。有学者在黄土高原裸露坡面的生态恢复研究中指出,再生能力强、须根庞大、能快速形成密集的地上和地下根系的岷草能有效防止地表径流和土壤冲刷,在当地发挥了重要的生态安全作用^[15]。

参考文献

[1] 梁一民. 黄土丘陵区林草植被快速建造的理论和技术[J]. 水土保持学报,1999,5(3) :1 - 5 .
[2] 田卫军. 公路建设项目水土保持方案编制有关问题思考[J]. 水土保持通报,2000,20(3) :31 - 34 .
[3] 潘树林,王丽,辜彬. 论边坡的生态恢复[J]. 生态学杂志,2005,24(2) :217 - 221 .
[4] 龙富忠,唐成斌,钱晓刚,等. 几种草本植被保持水土效益的研究[J]. 水土保持研究,2004(4) :136 - 138 .
[5] 孙吉雄. 草坪学[M]. 北京: 中国农业出版社,1993 .
[6] 席嘉宾,杨中艺. 西安地区高等级公路边坡绿化草种的引种栽培试验[J]. 草业科学,1998(5) :53 - 58 .
[7] 夏汉平,敖惠修,刘世忠. 香根草生态工程应用于公路护坡的效益研究[J]. 草业科学,2002(1) :52 - 56 .
[8] 刘建宁,高洪文,王运琦,等. 山西太旧高速公路边坡绿化种草技术研究[J]. 中国草地,1999(6) :23 - 26 .
[9] 周培德,张俊云. 植被护坡工程技术[M]. 北京: 人民交通出版社,2003 .
[10] 席嘉宾. 高等级公路边坡草种绿化混播试验的研究[J]. 甘肃农业大学学报,1997(3) :271 - 275 .
[11] 李绍才,孙海龙,杨志荣,等. 岩土边坡喷播植草护坡工程的抗侵蚀效应[J]. 北京林业大学学报,2006,28(1) :43 - 47 .
[12] 龙忠富,唐成斌,刘秀峰,等. 喀斯特地区高等级公路边坡等侵蚀劣地草种筛选研究[J]. 公路,2006,11(11) :187 - 193 .
[13] 张光辉,梁一代. 植被盖度对水土保持功效影响的研究综述[J]. 水土保持研究,1996,3(2) :104 - 110 .
[14] CARROL C, HALHM M, BURNER P, et al . The effect of crop type , crop rotation, and tilage practice on runoff and soil loss on a Vertisol in central Qerland[J]. Aust J Soil Res,1997,35 :925 - 939 .
[15] 程积民. 优良水土保持牧草——岷草[J]. 水土保持学报,2000,14(4) :117 - 119 .

(上接第5403 页)

响有限,且较少的用量不能络合足够的铜辅基。而高浓度的柠檬酸可使体系pH 降低,使之远离最适pH 值而降低活性,同时还可络合铜辅基而达到抑制PPO 活性。因此单独使用柠檬酸并不理想,有人认为柠檬酸与亚硫酸氢钠同时使用能大大增强抑制褐变的效果。

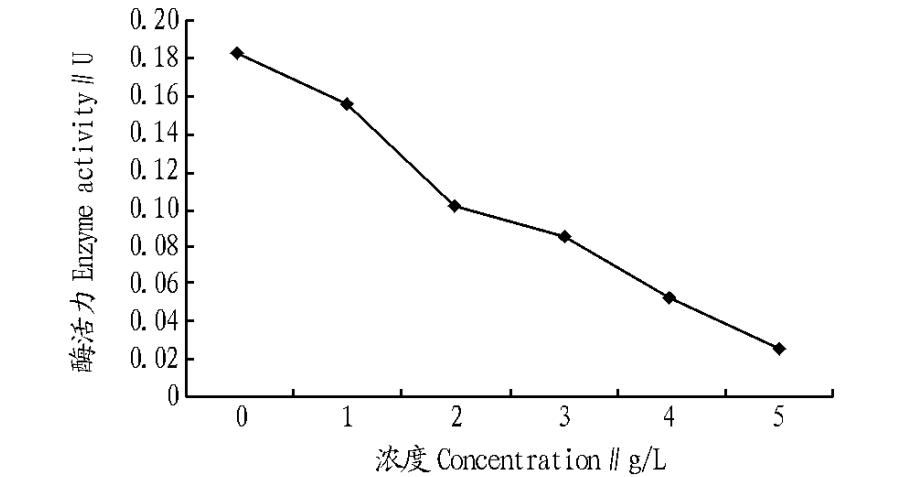


图7 柠檬酸对PPO 活性影响
Fig.7 Effects of citric acid on PPO

3 结论

以邻苯二酚为底物时,鸡腿菇中PPO 作用生成产物的吸收波长为420 nm,其中的PPO 对温度有一定的耐受力。5 min 后,PPO 基本失活;亚硫酸氢钠的抑制作用最明显,少量的亚硫酸氢钠就可有效地抑制PPO 活性,能有效防止鸡腿菇的褐变。在试验条件下,5 g/ L 的亚硫酸氢钠几乎可以完全抑制PPO。

参考文献

[1] 黄年来. 中国食用菌百科[M]. 北京: 农业出版社,1993 .
[2] 姜绍通,罗志刚,郑志. 甘薯加工过程酶促褐变及控制研究[J]. 农业工程学报,2001(2) :136 - 139 .
[3] 金玉来,钱建亚,肖冬青,等. 甘薯中的PPO 的研究[J]. 食品科学,1991(9) :4 - 9 .
[4] 陶月良,岳君正,林华. 板栗果实过氧化物酶与PPO 特性的研究[J]. 食品科学,2001(5) :64 - 67 .
[5] 于新,黄晓丹. 草菇PPO 及过氧化酶特性研究[J]. 仲恺农业技术学院学报,1998(3) :27 - 33 .
[6] 罗志刚,姜绍通,潘丽军,等. 抗坏血酸和亚硫酸钠在甘薯破碎中的抗褐变的研究[J]. 食品工业科技,2002(5) :52 - 53 .