

枸杞过氧化物酶的提取工艺优化及其酶学特性研究

高倩玲, 胡龄文, 陈鸿平*, 刘友平, 陈林, 胡媛

成都中医药大学药学院 西南特色中药资源国家重点实验室, 成都 611137

摘要: 枸杞为常用“药食同源”中药材, 在加工、贮藏、运输等过程中易发生褐变, 严重影响枸杞的外观和质量。前期研究发现枸杞中具有较高的过氧化物酶(peroxidase, POD) 活性, 而过氧化物酶在植物的酶促褐变中发挥着重要作用。为更好地控制枸杞酶促褐变的发生, 本研究采用响应面法对枸杞过氧化物酶提取工艺进行优化, 对枸杞过氧化物酶的性质进行了研究。结果显示枸杞过氧化物酶最佳提取工艺为料液比 1:3, 浸提时间 5 h, 缓冲液 pH 为 6.0, 枸杞过氧化物酶活力为 (5148.59 ± 50.00) U, 与模型预测值接近, 拟合性好, 表明所得响应面模型可以很好地预测和分析枸杞过氧化物酶提取工艺条件。枸杞过氧化物酶最适温度为 50 °C, 最适 pH 为 6.0, 金属离子 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 和柠檬酸对枸杞过氧化物酶起激活作用, 抗坏血酸和亚硫酸能抑制枸杞过氧化物酶活性; 该酶酶促反应动力学符合米氏方程, 过氧化氢浓度一定时, 酶对愈创木酚的 $K_m = 21.52$ mmol/L, $V_{\max} = 115.47$ U/mL; 愈创木酚浓度一定时, 酶对 H_2O_2 的 $K_m = 1.41$ mmol/L, $V_{\max} = 148.81$ U/mL。本研究可为后续枸杞加工过程中褐变的控制提供参考。

关键词: 枸杞; 过氧化物酶; 提取; 响应面法; 酶学特性

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)5-0819-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.5.010

Optimization of extraction process of peroxidase from wolfberry and its enzymatic characteristics

GAO Qian-ling, HU Ling-wen, CHEN Hong-ping*, LIU You-ping, CHEN Lin, HU Yuan

State Key Laboratory of Southwest Characteristic Traditional Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Wolfberry is a commonly used Chinese medicinal material with “medicine and food homology”, which is prone to browning during processing, storage, and transportation, resulting in seriously affects the appearance and quality of Chinese wolfberry. Our previous study found that wolfberry has high peroxidase activities, and peroxidase (POD) plays an essential part in the enzymatic browning of plants. In order to better control the occurrence of enzymatic browning of wolfberry, the extraction process of peroxidase from wolfberry was optimized by response surface method, and the properties of POD from wolfberry were studied. The results showed that the optimal extraction process of POD was as follows: the solid-liquid ratio was 1:3, the extraction time was 5 h, and the buffer pH was 6.0, the enzyme activity of POD was (5148.59 ± 50.00) U, which was similar to the predicted value. The extraction conditions of POD could be predicted and analyzed by the response surface model. The optimum temperature and pH were 50 °C and 6.0. The effects of different metal ions on the PPO were studied, and the result showed that Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} and citric acid could activate the activity of POD; ascorbic acid and sulfite could inhibit the activity of POD. The kinetics of enzymatic reaction was fit to Michaelis-Menten equation, and the K_m value of the enzyme to guaiacol was 21.52 mmol/L and the V_{\max} was 115.47 U/mL. The K_m value of H_2O_2 was 1.41 mmol/L and the V_{\max} was 148.81 U/mL. This study can provide a reference for the control of browning in the subsequent processing of wolfberry.

Key words: wolfberry; peroxidase; extraction; response surface methodology; enzymatic characteristics

收稿日期: 2022-09-30

接受日期: 2022-12-20

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(81403098)

* 通信作者 Tel: 86-013982283303; E-mail: chen_hongping@126.com

枸杞是茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实, 富含枸杞多糖、多酚、类胡萝卜素

等^[1],具有滋补肝肾,益精明目等功效^[2],是传统的药食两用大宗药材。随着研究的不断深入,发现枸杞鲜果富含丰富的维生素 C、 β 胡萝卜素等,对枸杞鲜果的需求量逐年上升,但枸杞鲜果皮薄多汁,在贮藏加工过程中易受到损伤,发生褐变,导致品质下降,极大限制了枸杞产业的发展。研究表明枸杞的褐变主要为酶促褐变和非酶促褐变^[3],目前国内外对枸杞酶促褐变的机理和防褐变研究主要集中于多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)及其提取、分离纯化及酶学特性的研究上^[4-6],对枸杞过氧化物酶(peroxidase, POD)的研究多集中于枸杞的生长、环境胁迫等方面^[7-10]。相关文献报道 POD 和 PPO 是引起大多数植物发生酶促褐变的关键酶^[11,12],课题组前期研究发现枸杞具有较高的过氧化物酶活性。

POD 是在自然界中广泛分布的一类氧化还原酶,广泛存在于动植物和微生物体内,它既能去除酚类化合物,也能去除过氧化物^[13]。POD 能催化过氧化物对酚类物质的氧化,导致组织褐变。Finger 等^[14]发现 POD 在 H_2O_2 存在条件下能催化二元酚生成醌。Richard-forget^[15]研究发现, PPO 存在条件下, POD 可以加快酚类物质的氧化, PPO 在催化氧化过程中会产生 H_2O_2 , 而 POD 又以 H_2O_2 为底物生成醌类化合物,两种酶在酶促褐变过程中起协同作用。近年来由于 POD 被认为参与了藕片、卷心莴苣和马铃薯等植物的酶促褐变^[16-18],受到了广泛的关注。Wang 等^[19]研究表明促干护色剂在枸杞干制过程中抑制 POD 的活性,从而抑制枸杞的酶促褐变反应。由此看出, POD 在酶促褐变中起着重要作用,但目前对枸杞 POD 提取和酶学特性方面的研究尚未见报道。

为研究枸杞过氧化物酶的性质。本实验以宁夏枸杞为研究对象,用响应面法对枸杞 POD 的匀浆提取工艺进行优化,得到最优提取工艺后,研究温度、pH 值、金属离子、抑制剂以及底物浓度等因素对枸杞 POD 酶活力的影响,以期对枸杞 POD 作用机制和加工贮藏过程中褐变的控制提供理论依据,提高枸杞品质。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜枸杞于 2021 年 11 月购自固原市金轮元药材种植有限公司,经成都中医药大学药学院陈鸿平教授鉴定为茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的新鲜成熟果实。

试剂:聚乙烯吡咯烷酮(PVPP, >98.0%, Solarbio)、苯甲基磺酰氟(PMSF, Solarbio)、三羟甲基氨基甲烷(Tris base, Servicebio)、愈创木酚(化学纯, 国药集团化学试剂有限公司)、甘氨酸(>99.0%, Solarbio)、抗坏血酸(>99%, 美仑生物)、柠檬酸(分析纯,成都市科龙化工试剂厂)

过氧化氢、亚硫酸钠、氯化钠(NaCl)、氯化钙($CaCl_2$)、硫酸钾(K_2SO_4)、硫酸锌($ZnSO_4$)、硫酸铜($CuSO_4$)、硫酸锰($MnSO_4$)、磷酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、无水乙酸钠、盐酸、醋酸均分析纯,购于成都市科隆化学品有限公司。

仪器:安捷伦 Agilent 8435 紫外-分光光度计(美国 Agilent 公司);TG18.5 高速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);RP211D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司);UPT-I-10T 型优普系列超纯水机(成都超纯科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 粗酶液的制备

取新鲜枸杞,加入预冷的磷酸盐缓冲溶液(0.1 mol/L)匀浆 60 s,其中含有 PMSF(1 mmol/L)、1% PVPP。在 4 °C 条件下浸提一定时间,匀浆液通过四层纱布过滤后,滤液以 10 000 r/min 离心 10 min,上清液即为 POD 粗酶液,备用。

1.2.2 POD 酶活性测定

在试管中加入 3 mL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液,再加入 1 mL 25 mmol/L 愈创木酚,1 mL 25 mmol/L H_2O_2 ,混合均匀后再加入 0.5 mL POD 粗酶液,在 470 nm 吸光度下测定其吸光度值。一个酶单位(U)定义为吸光度值每分钟变化 0.01 所需的酶量。

1.2.3 单因素实验设计

在因素选取时考虑到过氧化物酶有很好的温度稳定性,以及提取过程的简便性,本文选择料液比、浸提时间和缓冲液 pH 进行单因素考察。基于粗酶液的制备,以料液比(1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6)、浸提时间(0、1、2、3、4、5、6、7 h)、缓冲溶液 pH(2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0)为试验因素,以 POD 总酶活力为指标,分别做单因素试验,考察各因素对枸杞 POD 酶活性的影响。

1.2.4 响应面优化实验设计

在单因素考察结果上固定料液比(A)、浸提时间(B)、缓冲溶液 pH(C)三个单因素进行响应面优化实验,以 POD 总酶活性作响应值进行响应面 Box-

Behnken(BBD)分析,确定 POD 提取最优条件组合。响应面实验因素与水平设计见表 1。

表 1 响应面设计因子水平表

Table 1 Factors and levels in the response surface analysis

水平 Level	因素 Factor		
	A 料液比 Solid-liquid ratio(g/mL)	B 浸提时间 Extraction time(h)	C 缓冲溶液 pH Buffer pH
-1	1:2	4	5.0
0	1:3	5	6.0
1	1:4	6	7.0

1.2.5 枸杞 POD 酶学特性研究

1.2.5.1 枸杞 POD 最适温度及温度稳定性

取 25 mmol/L 愈创木酚和 25 mmol/L H_2O_2 各 1 mL 于试管中,再加入 3 mL 磷酸盐缓冲溶液,混合均匀后再加入 0.5 mL POD 粗酶液,分别置于 30、40、50、60、70、80 $^{\circ}C$ 水浴锅中保温 30 min,在 470 nm 吸光度下测定其吸光度值。以酶活最高者为 100%,计算 POD 酶的相对活性,确定最适温度。

将粗酶液放置在不同温度条件下(30 ~ 80 $^{\circ}C$),在 40、80、120、160、200、240 min 取样测定酶活力。以未处理的酶溶液作为对照,相对酶活为 100%。

1.2.5.2 枸杞 POD 最适 pH 及 pH 稳定性

取 25 mmol/L 愈创木酚和 25 mmol/L H_2O_2 各 1 mL 于试管中,再分别加入 pH 为 2、3、4、5、6、7、8、9、10 的缓冲液 3 mL,混合均匀后再加入 0.5 mL POD 粗酶液,在 470 nm 吸光度下测定其吸光度值。以酶活最高者为 100%,计算 POD 酶的相对活性,确定最适 pH。

用不同 pH 值(2 ~ 10)的缓冲溶液稀释酶液,在 40、80、120、160、200、240 min 取样测定酶活性。以未处理的酶溶液作为对照,相对酶活为 100%。

1.2.5.3 金属离子及抑制剂对枸杞 POD 酶活性的影响

将不同浓度的抑制剂(柠檬酸、抗坏血酸、亚硫酸钠)及金属离子(Na^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+})加入到酶活测定反应体系中,使反应体系中各种化合物的浓度分别为 0.1、1、10 mmol/L,混匀后,放置 1 h,测定酶活力,以不添加化合物为对照,计算相对酶活,测定不同化合物对 POD 酶的激活及抑制作用。

1.2.5.4 枸杞 POD 酶催化动力学分析

在酶活测定反应体系中,固定过氧化氢浓度为 25 mmol/L,愈创木酚浓度为 0.5、1、2、4、8、10、15、25 mmol/L,在 470 nm 处测定不同愈创木酚浓度对 POD 酶促反应速度;固定愈创木酚浓度为 25 mmol/L,过氧化氢浓度为 0.5、1、2、4、8、10、15、25 mmol/L,在 470 nm 处测定不同过氧化氢浓度对 POD 酶促反应速度。分别以过氧化氢浓度和愈创木酚浓度的倒数为横坐标,以反应速度的倒数为纵坐标,得到 POD 对过氧化氢和愈创木酚的最大反应速率 V_{max} 和表观 K_m 值。

1.2.6 数据处理

采用 Origin (Version 9.4) 作图, Design-Expert (Version 8.0.6) 进行响应面分析, SPSS (Version 26.0) 进行统计学分析, $P < 0.05$ 认为有统计学显著性差异, $P < 0.01$ 认为有统计学极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 料液比对枸杞 POD 酶活力的影响

由图 1 可知,随着料液比的增加,POD 酶活力明显增加,当料液比为 1:3 时,POD 酶活力达到最大值,之后随着料液比的增加其酶活力有所降低后基本保持不变。当料液比较低时,POD 无法完全溶出,提取不完全造成 POD 酶活力偏低,随着料液比的增加,POD 溶出增加,酶活力随之增加,当料液比达到一定比例时,POD 溶出量不再增加,继续提高料液比反而会导致 POD 酶活力降低。本研究选择料液比 1:3 作后续优化。

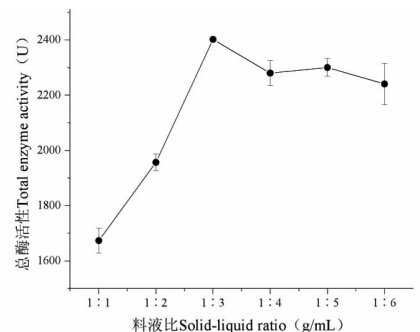


图 1 料液比对 POD 酶活力的影响

Fig. 1 Effect of solid-liquid ratio on activity of POD

2.1.2 浸提时间对枸杞 POD 酶活力的影响

由图 2 可知,随着浸提时间的增加,POD 酶活力先增加,当达到一定时间后开始逐渐降低,当浸提时间达到 5 h 时,POD 酶活力达到最大值。这可能是在 POD 提取过程中,随着时间的增加,POD 溶解

于提取液中的增多,POD 酶活力也相应升高,浸提时间大于 5 h 时,随着浸提时间的增加,由于酶蛋白在溶液中构象不稳定,以及枸杞中酚类物质等溶出,易导致酶活力降低。本研究选择浸提时间 5 h 做后续优化。

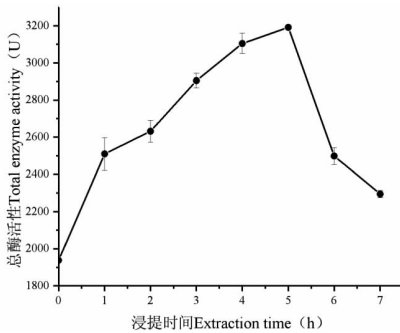


图 2 浸提时间对 POD 酶活力的影响

Fig. 2 Effect of extraction time on activity of POD

2.1.3 缓冲液 pH 对枸杞 POD 酶活力的影响

由图 3 可知,缓冲液 pH 达到 6.0 时,POD 酶活力达最大值,过高或过低的缓冲液 pH 均使 POD 酶

活力显著降低。可能原因酸性和碱性的环境对 POD 构象有一定影响,导致酶的结构改变从而使酶活性丧失。本研究选择缓冲液 pH 为 6.0 作后续优化。

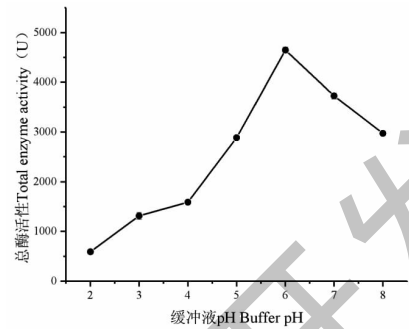


图 3 缓冲液 pH 对 POD 酶活力的影响

Fig. 3 Effect of buffer pH on activity of POD

2.2 响应面试验结果分析

选取料液比、浸提时间与缓冲溶液 pH 作为单因素,选取总酶活性为响应值,进行响应面优化实验,Box-Behnken 实验设计与结果见表 2。

表 2 响应面实验设计方案与结果

Table 2 Design and results of response surface

试验号 Test number	A 料液比 Solid-liquid ratio (g/mL)	B 浸提时间 Extraction time (h)	C 缓冲溶液 pH Buffer pH	总酶活性 Total enzyme activity (U)
1	1:2	4	6	2 389.04
2	1:4	4	6	2 000.64
3	1:2	6	6	1 784.19
4	1:4	6	6	3 845.12
5	1:2	5	5	2 128.32
6	1:4	5	5	2 407.36
7	1:2	5	7	3 237.11
8	1:4	5	7	4 685.89
9	1:3	4	5	1 524.58
10	1:3	6	5	2 044.08
11	1:3	4	7	3 147.36
12	1:3	6	7	3 569.58
13	1:3	5	6	4 839.66
14	1:3	5	6	4 728.44
15	1:3	5	6	4 825.4
16	1:3	5	6	4 949.96
17	1:3	5	6	4 687.84

2.2.1 回归方程模型与方差分析

采用 Design-Expert 8.0.6 对数据进行回归拟合

分析,得回归模型方程为: $Y = 4\ 806.26 + 425.04A + 272.67B + 816.95C + 612.33AB + 292.44AC -$

24. 32BC-879. 12A²-1 422. 39B²-812. 47C²。

根据表 3 结果分析,回归模型总回归系数 $R^2 = 0.997 6$,且模型 $P < 0.01$,实验模型达到极显著水平,模型方差失拟项 $P = 0.654 4 > 0.05$,说明该模

型拟合度良好,可用于预测 3 种因素不同组合情况下枸杞 POD 的酶活性,模型变量 A 、 B 、 C 、 AB 、 AC 、 A^2 、 B^2 、 C^2 对响应值均达极显著水平($P < 0.01$)。

表 3 模型的方差分析

Table 3 ANOVA of mathematic model

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F	P	显著性 Significance
模型 Model	2.533E+007	9	2.814E+006	323.87	<0.000 1	*
A	1.445E+006	1	1.445E+006	166.32	<0.000 1	**
B	5.948E+005	1	5.948E+005	68.45	<0.000 1	**
C	5.339E+006	1	5.339E+006	614.42	<0.000 1	**
AB	1.500E+006	1	1.500E+006	172.59	<0.000 1	**
AC	3.421E+005	1	3.421E+005	39.37	0.000 4	**
BC	2365.85	1	2365.85	0.27	0.617 9	
A ²	3.254E+006	1	3.254E+006	374.47	<0.000 1	**
B ²	8.519E+006	1	8.519E+006	980.31	<0.000 1	**
C ²	2.779E+006	1	2.779E+006	319.84	<0.000 1	**
残差 Residual	60 829.07	7	8 689.87			
失拟 Lack of fit	18 618.23	3	6 206.08	0.59	0.654 4	
误差 Pure error	42 210.84	4	10 552.71			
总和 Cor total	2.539E+007	16				

$R^2 = 0.997 6$

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2.2 响应面分析

通过 Design-Expert 8.0.6 对数据进行拟合得到响应面图,响应面的三维图与等高线图可以看出 2 个变量之间的相互作用,如图 4 所示,模型中因素 AB 和因素 AC 之间的交互作用较显著。随着料液比(A)与浸提时间(B)的增加,POD 酶活力呈现先增加后减小的趋势,等高线图呈椭圆形,表明两变量相交对 POD 酶活性影响显著,可能是因为料液比影响 POD 的质量浓度,浸提时间的变化会影响 POD 的溶出率,两者相互作用改变了 POD 总酶活力;随着料液比(A)与缓冲液 pH(C)的增加,等高线图呈椭圆形,表明两变量相交对 POD 酶活性影响显著,可能是料液比对酶浓度的影响随着 pH 值的变化而变化,进而影响 POD 总酶活力;浸提时间(B)和缓冲液 pH(C)对 POD 总酶活力有影响,但二者交互作用却不显著,可能是浸提时间对酶浓度的影响和缓冲液 pH 对酶活力的影响的差异不显著。

2.2.3 回归模型验证实验

根据回归模拟方程分析计算,得到 POD 预测最

优提取工艺条件为:料液比 1:3,浸提时间 5.0 h,缓冲液 pH 为 6.0,在此条件下 POD 酶活力预测值为 5 148.59 U,为验证回归模型可信性,采取上述最佳操作条件进行提取实验,考虑到实际操作的可行性,将最优提取工艺修正为:料液比 1:3,浸提时间 5 h,缓冲液 pH 为 6.0,在该条件下测定 POD 酶活力平均值达(5 148.59 ± 50.00) U,与预测值接近,表明该实验回归模型可靠,可以很好地反映最优的 POD 提取工艺条件。

2.3 枸杞 POD 酶学特性

2.3.1 温度对枸杞 POD 酶活性的影响

不同温度下 POD 酶活力变化如图 5A 所示。在温度低于 50 °C 时,酶活力随着温度的升高而上升;50 °C 时酶活力达到最大值,随着温度的继续升高,酶活力开始呈下降趋势,在 80 °C 时,该酶丧失大部分活性,这说明 POD 的最适温度为 50 °C,厚朴 POD 的最适温度为 80 °C 不同^[20],可能是由于品种的不同。枸杞不同酶之间的酶学性质略有不同,Dincer^[5]研究发现枸杞 PPO 最适温度为 35 °C,Zhu^[7]研

究发现红果枸杞 PPO 最适温度为 36 ~ 40 ℃, 黄果枸杞 PPO 最适温度为 36 ℃, 说明枸杞 POD 比 PPO

更耐热。

POD 在不同温度下稳定性如图 5B 所示。POD

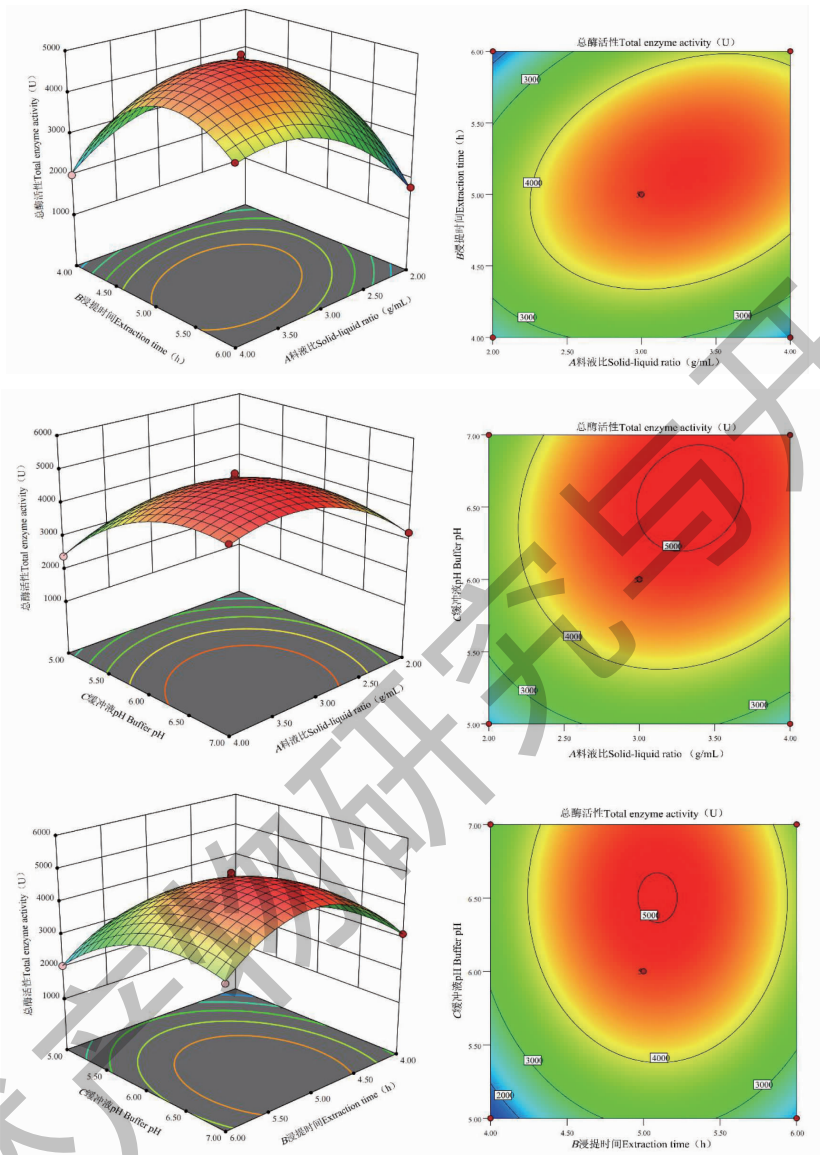


图 4 料液比、浸提时间和缓冲液 pH 的交互作用

Fig. 4 Interaction of solid-liquid ratio, extraction time and buffer pH

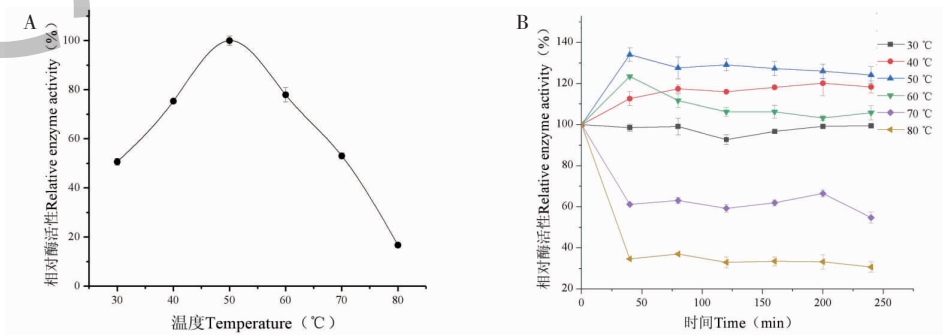


图 5 枸杞 POD 最适温度 (A) 及稳定性考察 (B)

Fig. 5 Optimum temperature (A) and stability (B) of POD in wolfberry

在 30 ~ 60 °C 的温度范围内,温度对 POD 酶活力影响较小,热稳定性较好,70 °C 时,POD 活性略有下降,在 60% 左右维持稳定,80 °C 时,POD 活性下降到 30%。

2.3.2 pH 对枸杞 POD 酶活性的影响

pH 是决定酶活力的重要因素。如图 6a 所示。pH 在 2.0 ~ 10.0 范围内,POD 酶活力在 pH 为 6.0 时,存在一个明显的峰值,pH 值小于 6 时,随着缓冲液 pH 值的增加,POD 酶活力上升,pH 值大于 6 时,随着缓冲液 pH 值的增加,POD 酶活力下降。因此

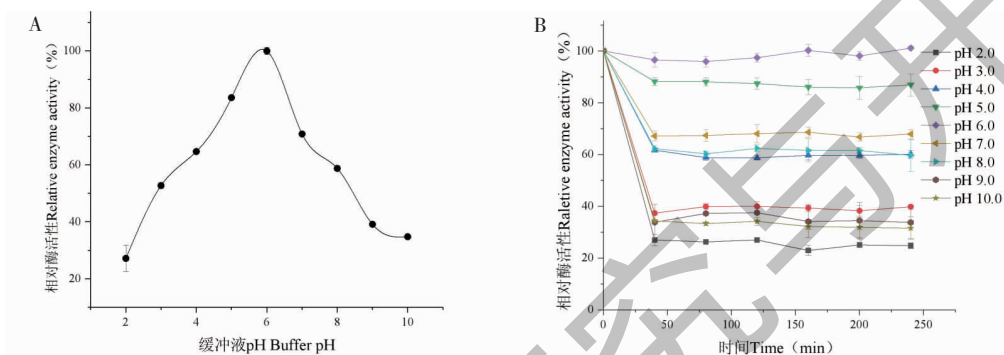


图 6 枸杞 POD 最适 pH(A) 及稳定性考察 (B)

Fig. 6 Optimum pH (A) and stability (B) of POD in wolfberry

2.3.3 金属离子及抑制剂对枸杞 POD 酶活性的影响

从表 4 中可以看出金属离子 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 对枸杞 POD 有一定激活作用,其中 Ca^{2+} 在较高浓度条件下对 POD 起到激活作用,这一结果与 $\text{Sui}^{[22]}$ 研究曹州木瓜一致,提示在枸杞贮藏加工过程中应避免与 Ca^{2+} 接触。 Cu^{2+} 在低浓度条件下起到激活作用。 Mn^{2+} 对酶的作用不明显。抑制剂

POD 最适 pH 为 6.0。与其他文献相比,厚朴^[20] 和深山含笑^[21] 的最适 pH 分别为 6.0 和 4.5,说明不同品种间 POD 的最适 pH 略有不同。

POD 在不同 pH 下稳定性如图 6b 所示。POD 在 pH 为 4.0 ~ 8.0 范围内较稳定,在 pH 4.0 ~ 8.0 的缓冲溶液中放置 4 h 后其酶活力保持在 60% 以上,在 pH 为 3.0 和 9.0 ~ 10.0 的缓冲溶液中放置 4 h 后,POD 酶活力保持在 30% 以上,在 pH 2.0 的缓冲溶液放置 4 h 后,70% 以上的 POD 酶活性被抑制。

柠檬酸对 POD 有激活的作用,抗坏血酸和亚硫酸钠在高浓度条件下对 POD 有抑制作用,当抗坏血酸为 10 mmol/L 时,枸杞 POD 的相对酶活为 22.27%。表明抗坏血酸能很好地抑制枸杞过氧化物酶活性。研究表明,抗坏血酸能抑制莲藕汁^[23]、曹州木瓜^[22] 等 POD 酶活性。因此可以考虑采用抗坏血酸作为枸杞采收贮藏加工处理中的抑制剂。

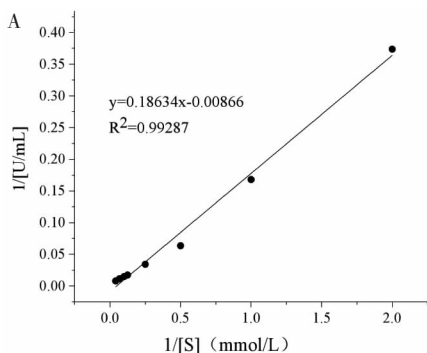
表 4 化合物对枸杞 POD 酶活力的影响

Table 4 Effects of various compounds on the activity of POD in wolfberry

金属离子及抑制剂 Metal ion and inhibitor	相对酶活 Relative enzyme activity (%)		
	0.1 mmol/L	1 mmol/L	10 mmol/L
空白对照 Control	100.00 ± 0.01		
柠檬酸 Citric acid	116.17 ± 0.03	119.21 ± 0.02	115.86 ± 0.03
抗坏血酸 Vitamin C	115.76 ± 0.01	118.20 ± 0.02	22.27 ± 0.01
亚硫酸钠 Sodium sulfite	115.28 ± 0.03	112.00 ± 0.01	71.52 ± 0.03
Na^+	113.79 ± 0.07	117.21 ± 0.02	117.14 ± 0.02
Ca^{2+}	119.63 ± 0.06	123.43 ± 0.01	123.64 ± 0.03
K^+	112.97 ± 0.01	111.45 ± 0.01	111.43 ± 0.05
Zn^{2+}	111.33 ± 0.02	110.67 ± 0.02	112.52 ± 0.00
Cu^{2+}	107.93 ± 0.06	107.56 ± 0.02	103.39 ± 0.02
Mn^{2+}	104.26 ± 0.04	102.94 ± 0.01	108.94 ± 0.01

2.3.4 枸杞 POD 动力学分析

酶的动力学参数是酶学中的一个重要指标。如图 7 所示,过氧化氢浓度一定时,酶对愈创木酚的 K_m 值为 21.52 mmol/L, V_{max} 值为 115.47 U/mL;愈



创木酚浓度一定时,酶对 H_2O_2 的 K_m 值为 1.41 mmol/L, V_{max} 值为 148.81 U/mL。可以看出 POD 对 H_2O_2 的亲和能力更好。

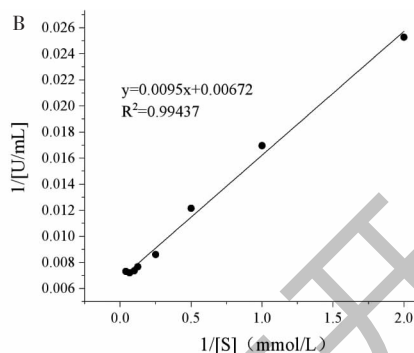


图 7 枸杞 POD 的双倒数曲线

Fig. 7 Lineweaver-Burk plot of POD in wolfberry

注:A:愈创木酚;B:过氧化氢。Note:A:Guaiacol; B:Hydrogen peroxide.

3 结论

本文首次以宁夏枸杞为原料,对 POD 的提取工艺进行优化,用匀浆浸提法提取枸杞中 POD,以酶总活力为评价指标,通过响应面确定最优的 POD 提取工艺为料液比 1:3,浸提时间 5.0 h,缓冲液 pH 为 6.0,在该条件下 POD 酶活力为 (5148.59 ± 50.00) U,说明响应面法可以较好地 POD 的提取进行优化。

对 POD 酶学特性研究发现,对 POD 酶学特性研究发现,温度和 pH 是影响酶活性的重要因素之一。POD 最适温度为 50 °C、最适 pH 为 6.0。POD 在 pH4.0 ~8.0 的范围内处理 4 h 后其酶活力仍保持在 60% 以上,在 30 ~60 °C 的温度范围内处理 4 h 后,POD 酶活力仍保持在 60% 左右,说明枸杞 POD 是一种耐酸碱且稳定性的酶。研究发现金属离子 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 以及抑制剂柠檬酸对 POD 有一定激活作用,其中 Ca^{2+} 对 POD 的激活作用最明显,提示在枸杞贮藏加工过程中应避免与 Ca^{2+} 接触。抗坏血酸和亚硫酸钠对该酶有明显的抑制作用,其中抗坏血酸抑制作用更好,表明抗坏血酸能很好地抑制枸杞 POD 酶活性。

综上,在枸杞加工贮藏等过程中,可根据 POD 性质采取一些措施,如:碱性试剂处理,低温贮藏,添加抗坏血酸抑制剂等来抑制 POD 的活性,延缓枸杞褐变,但枸杞褐变机理复杂,防褐变措施的可行性还需进行验证。本实验未对枸杞 POD 的结构进行研

究,下一步可对枸杞 POD 进行分离纯化研究,研究其结构特点,更好地了解枸杞 POD 的表征和失活行为。本研究结果有助于进一步揭示枸杞酶促褐变的机理,控制酶促褐变的发生,对提高枸杞品质具有实际意义,为开发出抑制枸杞酶促褐变的新工艺和新方法提供科学依据。

参考文献

- 1 Kulczynski B, Gramza-michalowska A. Goji berry (*Lycium barbarum*): composition and health effects-a review [J]. Pol J Food Nutr Sci, 2016, 66: 67-75.
- 2 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 260.
- 3 Guo XM, Zhang YS, Wang J, et al. Study on the browning of medlar wine during fermentation [J]. Food Sci Biotechnol (食品与生物技术学报), 2020, 39: 41-48.
- 4 Zhu JX, Kong DJ, Li M, et al. Study on enzymatic characteristics and influencing factors of polyphenol oxidase in two kinds of fresh fruits of *Lycium barbarum* L. in Ningxia [J]. Acta Phytophysiol Sin (植物生理学报), 2020, 56: 382-388.
- 5 Dincer B, Colak A, Aydin N, et al. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L., Rosaceae) [J]. Food Chem, 2002, 77: 1-7.
- 6 Ayaz FA, Demir O, Torun H, et al. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripe-

- ning[J]. Food Chem, 2008, 106: 291-298.
- 7 Zhang X, LI J, Feng LD, et al. Effects of three disease resistance inducers on leaf growth, disease resistance and related enzyme activities of *lycium barbaeum* [J]. J Yunnan Agric Univ(云南农业大学学报), 2022, 37: 413-421.
 - 8 Zhang JH, HE J, Zhang XY, et al. Effectiveness of potato glycoalkaloids in inducing resistance of *Lycium barbarum* to root rot and its effect on resistance-related enzymes [J]. J Gansu Agric Univ(甘肃农业大学学报), 2022, 57: 123-130.
 - 9 Fang WM, Gong SH, He BB, et al. Effects of NaCl stress on expression patterns of antioxidant enzymes and related genes in Ningxia *Lycium barbarum* tissue culture seedlings [J]. Jiangsu Agric Sci(江苏农业科学), 2021, 49: 57-62.
 - 10 Zhu JJ, Ma HJ, Zhang X, et al. Effects of potassium-solubilizing bacteria promoting the growth of *Lycium barbarum* seedlings under salt stress. [J]. J Appl Ecol, 2021, 32: 1289-1297.
 - 11 Zhang QA, Fang XH, Shen H, et al. Control of enzymatic browning by chemical inhibitors based on the activity of polyphenol oxidase from apricot kernel [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2014, 26: 264-267.
 - 12 Liu H, Zhou XL, Xing YG, et al. Influence of medium properties on the inactivation effect of polyphenol oxidase and peroxidase of mango by ultrasound [J]. J Chin Inst Food Sci Technol(中国食品学报), 2020, 20: 42-48.
 - 13 De Oliveira FK, Santos LO, Buffon JG. Mechanism of action, sources, and application of peroxidases [J]. Food Res Int, 2021, 143: 110266.
 - 14 Finger A. *In-vitro* studies on the effect of polyphenol oxidase and peroxidase on the formation of polyphenolic black tea constituents [J]. J Sci Food Agr, 1994, 66: 293-305.
 - 15 Richard-forget FC, Gaillard FA. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* cv. Williams) polyphenol oxidase and peroxidase: a possible involvement of peroxidase in enzymatic browning [J]. J Agric Food Chem, 1997, 45: 2472-2476.
 - 16 Ali S, Anjum MA, Nawaz A, et al. Effect of pre-storage ascorbic acid and *Aloe vera* gel coating application on enzymatic browning and quality of lotus root slices [J]. J Food Biochem, 2020, 44: e13146.
 - 17 Vanden Abeele C, Raes K, Sampers I. Effect of mild heat treatment on browning-related parameters in fresh-cut iceberg lettuce [J]. J Food Biochem, 2019, 43: e12906.
 - 18 Zhu Y, Du X, Zheng J, et al. The effect of ultrasonic on reducing anti-browning minimum effective concentration of purslane extract on fresh-cut potato slices during storage [J]. Food Chem, 2021, 343: 128401.
 - 19 Wang XY, Li T, Chang CG, et al. Study on the mechanism of drying promoting and color-protecting agent during the drying process of *Lycium barbarum* [J]. Food Ferment Ind(食品与发酵工业), 1-16 [2022-11-12]. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.032140.
 - 20 Hong J, Xiao Q, Zhao GH, et al. Purification and properties of peroxidase from the leaves of *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils and its function of removing bisphenol A [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2016, 28: 388-394.
 - 21 Zhao GH, Xiao Q, Hong J. Studies on functions of the removing bisphenol A by peroxidase from the leaves of *Michelia maudiae* Dunn [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31: 338-344.
 - 22 Sui YY, Dong HZ, Wang ZS, et al. Study on the enzymatic properties of caozhou papaya peroxidase [J]. J Chin Inst Food Sci Technol(中国食品学报), 2014, 14: 68-73.
 - 23 Li CY, Li J, Yan SL, et al. Effects of ascorbic acid treatment on enzymatic browning and quality characteristics of fresh lotus rhizome juice [J]. J Chin Inst Food Sci Technol(中国食品学报), 2021, 21: 151-158.