文章编号：1000-5773(2012)02-0235-06

超高压处理对毛栓菌多酚氧化酶的影响*

陈小强[1,2]，章银军[3]，张士康[1]，励建荣[2,6]，金建昌[4]，郑　娜[5]，杨秀芳[1]

(1.中华全国供销合作总社杭州茶叶研究院，浙江杭州　310016；
2.浙江工商大学食品与生物工程学院，浙江杭州　310035；
3.浙江工业大学生物与环境工程学院，浙江杭州 310014；
4.浙江树人大学生物与环境工程学院，浙江杭州　310015；
5.浙江大学化学工程联合国家重点实验室，浙江杭州　310027；
6.渤海大学，辽宁锦州　121013)

摘要：以茶多酚为底物，测定毛栓菌多酚氧化酶(Polyphenol Oxidase，PPO)活性的最适pH值为5.0、最适底物浓度为4 mg/mL，经100、300和500 MPa超高压处理10 min的PPO酶活分别是未处理的93%、87%和86%。圆二色谱和高效液相凝胶渗透色谱分析结果显示，100和300 MPa压力处理PPO的圆二色谱位于190～210 nm的正Cotton效应峰分别产生“褶皱”和“分蘖”；高效液相凝胶渗透色谱中的第一时间出峰组分(即最大分子量组分)的保留时间由6.678 min分别提前至1.514和2.296 min。500 MPa压力处理PPO的圆二色谱和高效液相凝胶渗透色谱与对照相比差异更加显著，其圆二色谱中只有一个正Cotton效应峰；其高效液相凝胶渗透色谱中主要组分的色谱峰面积减小(即280 nm的响应值降低)。不同压力处理的PPO的圆二色谱与高效液相凝胶渗透色谱图的差异程度具有对应关系。

关键词：超高压处理；多酚氧化酶；圆二色光谱；高效液相凝胶渗透色谱；毛栓菌
中图分类号：O521.9　　**文献标识码**：A

1　引　言

生物材料的超高压处理(Ultrahigh Pressure Processing，UHPP)是在密闭的高压容器内进行的，用水等作为传压媒介，对其施加100～1 000 MPa的压力。超高压处理能对生物大分子以及微生物产生显著影响，使生物大分子的理化特性和功能活性发生变化，如蛋白质变性、酶失活和淀粉糊化等[1-2]。

多酚氧化酶(Polyphenol Oxidase，PPO)是在生物体中广泛分布的一种氧化酶，食品中PPO的存在会使食品发生品质变化，如导致果蔬色泽发生变化。PPO直接以茶多酚为底物，可进行茶黄素体外氧化制备[3]。通过微生物发酵获得多酚氧化酶，得率高，成本低，易于商品化。超高压处理果蔬多酚氧化酶的研究集中在处理压力、保压时间、温度、pH值等因素对PPO的酶活性的影响研究，主要侧重于抑酶处理工艺的优化或各处理因素对酶活的影响。如超高压处理山药PPO的结果表明，550 MPa、40 ℃下处理10 min后，PPO的酶活性最弱[4]。超高压处理对梨汁酶活性影响的实验结果表明：在处理温度为50 ℃、保压时间为10 min和梨汁pH值为5的条件下，在200～300 MPa压力范围处理梨汁时，多酚氧化酶被激活，活性表现最高，500 MPa时酶的活性下降到75.3%[5]。

* **收稿日期**：2010-11-17；**修回日期**：2011-02-17
基金项目：科技部农业科技成果转化基金(2010GB24420685)；中华全国供销合作总社杭州茶叶研究院资助项目(2011YJ03)
作者简介：陈小强(1978—)，男，副研究员，主要从事天然产物研究. E-mail：biomed528@163.com
通讯作者：张士康(1965—)，男，博士，高级工程师，主要从事农副产品加工研究. E-mail：zsk6510@126.com
励建荣(1964—)，男，博士，教授，主要从事生鲜食品贮藏加工研究. E-Mail：lijianrong@mail.zjgsu.edu.cn
金建昌(1978—)，男，博士，讲师，主要从事天然产物研究. E-mail：jinjianchang2004@163.com

圆二色谱(CD)是研究蛋白质等生物大分子构象变化的灵敏技术。大分子的凝胶色谱行为,与其分子的空间结构和溶液构象紧密相关。本研究以一种毛栓菌发酵生产的多酚氧化酶为对象,研究超高压处理对其水溶液构象、凝胶渗透色谱(HPGPC)行为及酶活性的影响,为超高压处理对食品中功能生物大分子(如多酚氧化酶、过氧化物酶等品质酶)的作用机理研究提供分析技术手段。

2 实验部分

2.1 材料、试剂与仪器

多酚氧化酶(PPO)购自裕立宝公司,由毛栓菌(*Trametes Trogii*)发酵制得;茶多酚,TGP90A(总多酚含量 90%,其中儿茶素含量 65%),购自无锡太阳绿宝科技有限公司;其它试剂为国产分析纯。实验仪器设备包括:Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(HPLC),TSK-GEL G4000PWXL(7.8 mm×300 mm)凝胶色谱柱,HPP.L2-600/0.6 型超高压处理设备(天津华泰森淼生物工程技术有限公司生产),J-815 圆二色光谱仪,紫外可见分光光度计(SHIMADZU UV-2550)。

2.2 多酚氧化酶活性测定的最佳条件[2]

2.2.1 最适 pH 值

配制 pH 值为 4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、6.0、6.6、7.0、7.6、8.0 的磷酸缓冲溶液。按照 0.5 mL 0.03%粗酶液+0.5 mL 0.2%茶多酚溶液(TGP90A)+4 mL 不同 pH 值的磷酸缓冲溶液的体系,于 37 ℃水浴中加热 30 min,使用比色测定 416 nm 的吸光度值表示 PPO 的酶活性。

2.2.2 最适底物浓度

用 pH 值为 5.0 的磷酸缓冲液配制不同浓度的茶多酚(TGP90A)溶液:0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 和 10.0 mg/mL。按照上述反应体系,采用不同浓度茶多酚溶液作为反应底物,于37 ℃水浴中加热 30 min,用比色测定 416 nm 的吸光度值来表示 PPO 的酶活性。

2.3 超高压处理方法

配制 2 mg/mL 的 PPO 水溶液,按 20 毫升/袋的规格密封于铝箔袋,置于高压容器中,于 25 ℃下进行超高压处理,处理压力分别为 100、300 和 500 MPa ,保压时间为 10 min。将未经处理的酶液作为对照。按“2.2 节”所述的 PPO 最佳测定条件分析酶活性。

相对酶活性(%)=(超高压处理后 PPO 样品吸光度/对照 PPO 样品吸光度)×100

2.4 PPO 的圆二色光谱分析[6-7]

将上述超高压处理及对照酶液稀释至 0.4 mg/mL,对其进行圆二色谱(Circular Dichroism,CD)分析,CD 分析条件:用 J-815 圆二色光谱仪在室温条件下进行测定,波长范围为 190~250 nm,5 mm 石英池,扫描速度为 200 nm/min,带宽(Band Width)为 5.00 nm。每个样品扫描 3 次。

2.5 PPO 的高效液相凝胶渗透色谱分析

对经上述处理得到的样品及对照酶液进行高效液相凝胶渗透色谱(High Performance Gel Permeation Chromatography,HPGPC)分析。HPGPC 分析条件[8]:进样量10 μL;色谱柱 TSK-GEL G4000PWXL,柱温 40 ℃;流动相为 H_2O,流速 0.6 mL/min;检测波长 280 nm。

3 结果与讨论

3.1 毛栓菌多酚氧化酶活性测定最适条件

已报道多种果蔬 PPO 的最适 pH 值为酸性,且反应体系对 PPO 的活性有较大影响[3]。从图 1 可知,在 pH 值为 4.0~5.6 时,毛栓菌多酚氧化酶的活性较高,在 pH 值为 5.0 时,其活性达到最高值。pH5.6~pH8.0 时酶活性变化较大,在 pH6.5~pH7.0 时 PPO 活性降至最低值。

毛栓菌多酚氧化酶以不同浓度的茶多酚为底物的活性变化如图 2 所示,当底物浓度为 0.5~4.0 mg/mL 时,PPO 的酶活性呈快速上升趋势,在 4.0 mg/mL 达到最大值,其后随着茶多酚浓度的增加,其活性降低。

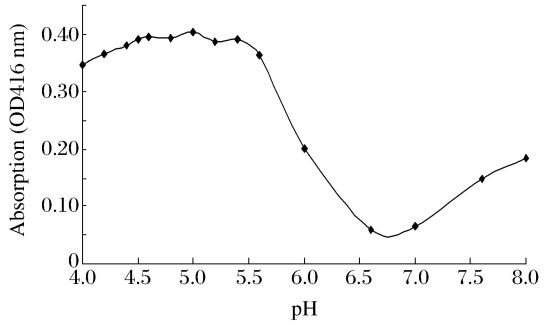


图 1 不同 pH 值条件下 PPO 活性的变化

Fig. 1 PPO activity under the conditions of different pH

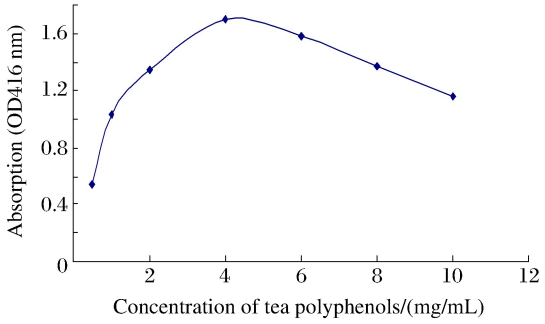


图 2 茶多酚浓度对 PPO 酶活性的影响

Fig. 2 Effect of different concentration of tea polyphenols on PPO activity

3.2 超高压处理对 PPO 活性的影响

由图 3 可知,超高压处理对毛栓菌多酚氧化酶活性具有钝化作用,100、300 和 500 MPa 压力下处理的 PPO 活性分别是对照的 93%、87%和 86%,处理压力增加,PPO 活性减小。将超高压处理后的样品置于−20 ℃保存 45 d,酶活性未恢复。

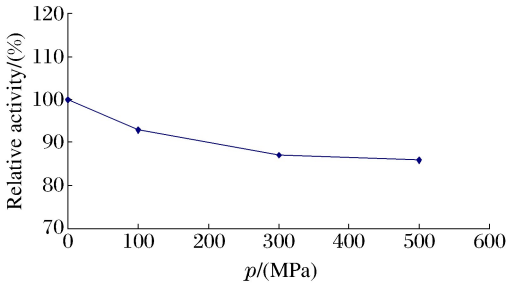


图 3 不同压力处理 10 min 对 PPO 酶活性的影响

Fig. 3 Effect on the activity of PPO at different treatment pressure for 10 min

3.3 圆二色光谱分析

PPO 的圆二色光谱(CD)见图 4,190～250 nm 为远紫外区,可反映蛋白质肽键的圆二色性,以此区域的 CD 信号作为光谱探针,分析超高压处理 PPO 水溶液的构象变化,信号强,灵敏度高[9]。

未处理 PPO 的 CD 谱见图 4(a),在 198 和 222 nm处分别存在一个显著的正 Cotton 和负 Cotton 效应峰,为酶蛋白二级结构 α-螺旋的特征效应峰[9];100 MPa 压力处理的 PPO 的 CD 谱于 200～216 nm 正 Cotton 效应区域出现“皱褶”(见图 4(b)),“皱褶”点位于 201、207、213 和 216 nm 处。300 MPa 压力处理的 PPO 的 CD 图谱在 196～200 nm 区域的正 Cotton 效应峰发生显著“分蘖”;分蘖点位于 196、198 和 200 nm 处,负 Cotton 效应峰区域变化不显著。PPO 经 500 MPa 压力处理,在远紫外区的 CD 谱中,正 Cotton 效应峰发生“红移”,峰区位于 195～235 nm(见图 4(b)),峰位产生更显著的“分蘖”小峰,“分蘖”峰位于 204、209、212 和 216 nm 处,原有的负 Cotton 效应峰消失。CD 图谱直观地表明了随着处理压力的增加,PPO 水溶液构象的变化程度加大。

3.4 高效液相凝胶渗透色谱分析

由 PPO 的高效液相凝胶渗透色谱(HPGPC)图(见图 5)可知,所用毛栓菌来源 PPO 为多组分混合物,由 6 个基本组分组成 ,在 HPGPC 图谱上的出峰时间依次为 6.678、8.680、11.991、12.531、17.216 和 18.850 min(图 5(a));对于大批量生产的商品化酶制品,多组分的混合物与其纯化工艺相关。与对照相比,100 和 300 MPa 压力处理的 PPO 的第一时间出峰组分(即最大分子量组分)的保留时间分别提前至 1.514 和 2.296 min,第一和第二时间出峰组分 280 nm 吸光度响应值均增大(图 5(a)、图 5(b)、图 5(c)),表明不超过 300 MPa 的压力仅影响 PPO 的水溶液分子构象;与对照及 100、300 MPa 处理的 PPO 的 HPGPC 相比,500 MPa 时的谱图发生显著变化,主要组分的色谱峰面积和峰高降低(280 nm 的响应值降低),表明水溶液中溶质(PPO 混合组分)减少,推断 500 MPa 压力使 PPO 混合物中的部分组分发生变性,其可溶性降低而损失,从而使 PPO 的溶液构象和凝胶色谱行为的变化程度更大。

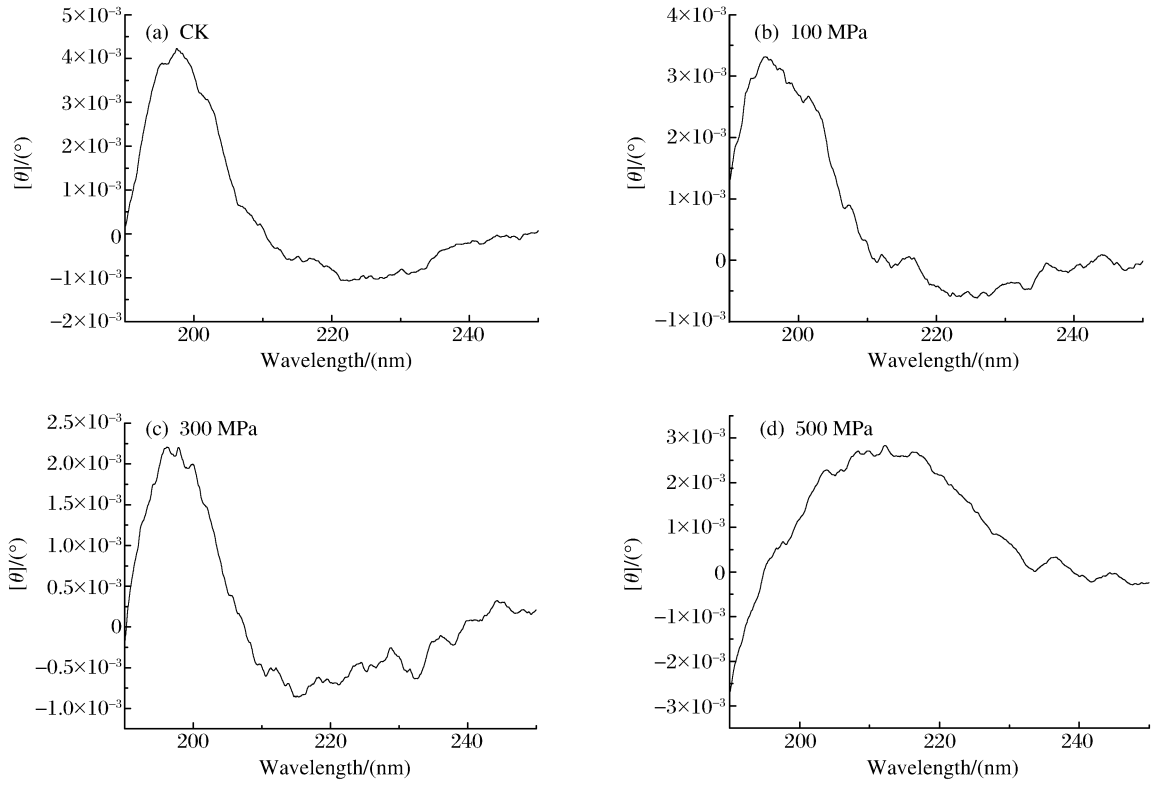


图 4 高压处理 PPO 的远紫外圆二色谱

Fig. 4 Far UV CD spectra of PPO processed by ultrahigh pressure

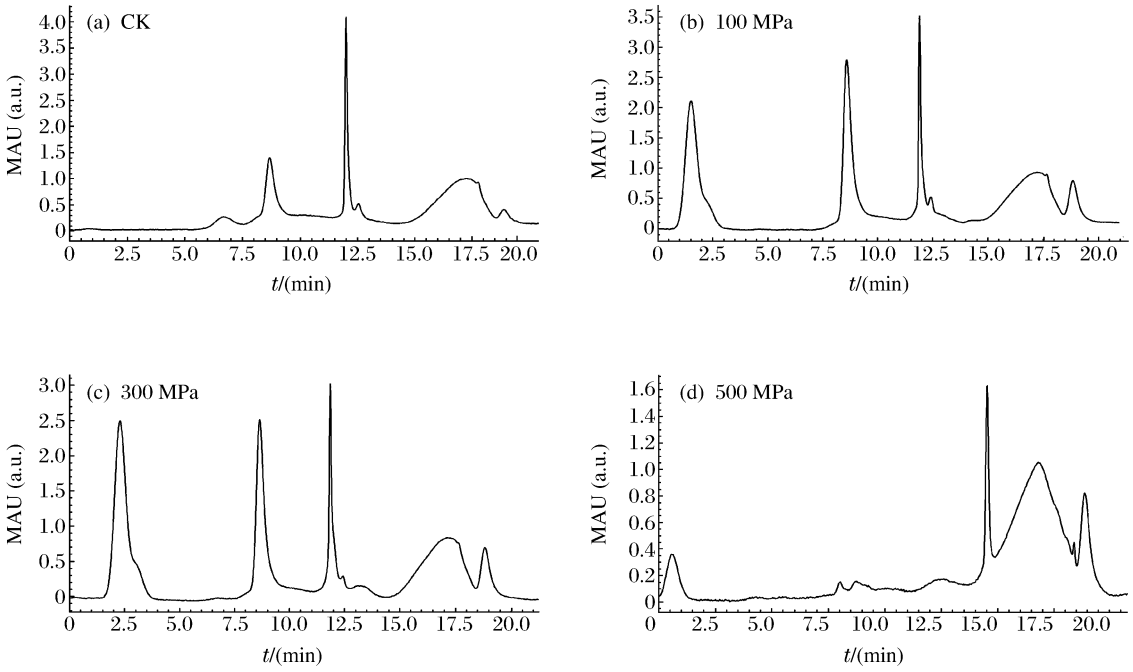


图 5 超高压处理 PPO 的高效液相凝胶渗透色谱(HPGPC)

Fig. 5 HPGPC chromatogram of PPO processed by UHPP

4 结　论

500 MPa 压力处理 PPO 的 CD 谱和 HPGPC 图谱相比 100 和 300 MPa 处理压力差异更显著，100、300 和 500 MPa 压力处理 PPO 的 CD 和 HPGPC 谱图差异程度具有对应关系。高压处理可使酶蛋白中维系大分子构象的氢键、疏水键和离子键等非共价键弱化，从而不同程度地改变酶活性中心的空间构象，进而影响 PPO 的酶活性。在远紫外区段(190～250 nm)，主要的生色团是肽键，这一波长范围的 CD 谱包含着蛋白质等生物大分子主链构象的信息，组分光度吸收信号的增加或者减少可能与酶蛋白空间构象变化、某些生色基团的暴露与隐藏相关。

References:

[1] Lin S Y, Kong B H. Influence of enzyme in food by UHP [J]. Food and Machinery, 1999, 73(5): 30-31. (in Chinese)
林淑英,孔保华. 超高压对食品中酶的影响 [J]. 食品与机械,1999,73(5):30-31.

[2] Chen X Q, Zhang Y J, Li X P, et al. Preliminary study on green tea juice extracted by ultrahigh pressure processing [J]. Transactions of the CSAE, 2009, 25(12): 335-338. (in Chinese)
陈小强,章银军,李学鹏,等. 超高压提取绿茶汁的初步研究 [J]. 农业工程学报,2009,25(12):335-338.

[3] Li S, Liu Z H, Huang J A, et al. Trogii enzymatic properties of polyphenol oxidase and enzymatic synthesis of theaflavins [J]. Journal of Tea Science, 2008, 28(5): 326-330. (in Chinese)
李　适,刘仲华,黄建安,等. 毛栓菌多酚氧化酶酶学性质及茶黄素的酶促合成研究 [J]. 茶叶科学,2008,28(5):326-330.

[4] Han Y B, Liu G L, Feng L, et al. Effect of high hydrostatic pressure and browning inhibitors on polyphenoloxidase activity in yam puree [J]. Food Science, 2005, 26(5): 111-115. (in Chinese)
韩永斌,刘桂林,冯　莉,等. 超高压和酶抑制剂对山药泥中多酚氧化酶活性的影响 [J]. 食品科学,2005,26(5):111-115.

[5] Zeng Q M, Pan J, Xie H M, et al. Effect of high pressure (HP) treatments on polyphenoloxidase (PPO) activity in pear juices [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 2004, 18(2): 144-148. (in Chinese)
曾庆梅,潘　见,谢慧明,等. 超高压处理对多酚氧化酶活性的影响 [J]. 高压物理学报,2004,18(2):144-148.

[6] Chen X Q, Ye Y, Cheng H, et al. Thermal effects on the stability and antioxidant activity of an acid polysaccharide conjugate derived from green tea [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(13): 5795-5798.

[7] Chen X Q, Ye Y, Cheng H, et al. Spectral analysis of crude tea polysaccharides extracted by different methods [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2009, 29(4): 1083-1087. (in Chinese)
陈小强,叶　阳,成　浩,等. 不同方法提制的茶叶粗多糖的光谱分析 [J]. 光谱学与光谱分析,2009,29(4):1083-1087.

[8] Chen X Q, Cheng H, Ye Y, et al. Physical and chemical components of tea and purification of polysaccharides [J]. Traditional and Herbal Drugs, 2008, 39(6): 828-830. (in Chinese)
陈小强,成　浩,叶　阳,等. 茶多糖纯化组分的理化分析 [J]. 中草药,2008,39(6):828-830.

[9] Shen X C, Liang H, He X W, et al. Circular dichroism spectra of protein conformation methods and development [J]. Chinese J Anal Chem, 2004, 32(3): 388-394. (in Chinese)
沈星灿,梁　宏,何锡文,等. 圆二色光谱分析蛋白质构象的方法及研究进展 [J]. 分析化学,2004,32(3):388-394.

[10] Nie X H, Zhang T, Li Y, et al. Conformation research of shorted glucagon-like peptide-1 [J]. Chem J Chinese Universities, 2010, 31(7): 1337-1341. (in Chinese)
聂新华,张　涛,李　元,等. 截短胰高血糖素样肽-1 的构象研究 [J]. 高等学校化学学报,2010,31(7):1337-1341.

Effect of High Pressure Processing on Polyphenol Oxidase from *Trametes Trogii*

CHEN Xiao-Qiang[1,2], ZHANG Yin-Jun[3], ZHANG Shi-Kang[1], LI Jian-Rong[2,6], JIN Jian-Chang[4], ZHENG Na[5], YANG Xiu-Fang[1]

(1. *Hangzhou Tea Research Institute, China COOP, Hangzhou* 310016, *China*;
2. *College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou* 310035, *China*;
3. *College of Biological and Envrionmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou* 310014, *China*;
4. *College of Biology and Environmental Engineering, Zhejiang Shuren University, Hangzhou* 310015, *China*;
5. *State Key Laboratory of Chemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou* 310027, *China*;
6. *Bohai University, Jinzhou* 121013, *China*)

Abstract: The activity of polyphenol oxidase (PPO) produced from *Trametes Trogii* was determined through using tea polyphenols as substrate. The pH value and the substrate concentration of strongest activity of PPO are 5.0 and 4 mg/mL, respectively. The activity of PPO processed by ultrahigh pressure of 100, 300 and 500 MPa for 10 min accounted for 93%, 87% and 86% of that of untreated one. The CD spectra of PPO processed by 100 and 300 MPa pressure respectively displayed folding shape and tillering shape of Cotton effect peak located in 190-210 nm, while the retention time of the first peak fraction (i. e., the maximum molecular weight fraction) of the two processed PPO on HPGPC profiles were advanced to 1.514 and 2.296 min, respectively from 6.678 min. Compared with control, CD spectrum and HPGPC of PPO treaded by 500 MPa showed more significant difference with only one positive Cotton effect peaks on CD spectra and reduced peak area of main components on HPGPC profiles (ie, the response value of 280 nm decreased). The disparity of CD and HPGPC of PPO treated by various UHPP showed the corresponding difference in the degree

Key words: ultrahigh pressure processing (UHPP); polyphenol oxidase (PPO); circular dichroism (CD); high performance gel permeation chromatography (HPGPC); *Trametes Trogii*