时小雪, 闻彦兵, 齐祥明. 基于分子动力学模拟的乙醇/丙酮复合沉淀法优化苹果多酚氧化酶纯化工艺 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(3): 52−61. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024110430

SHI Xiaoxue, WEN Yanbing, QI Xiangming. Optimization of Apple Polyphenol Oxidase Purification Process Using Ethanol/Acetone Mixed Solvent Precipitation Guided by Molecular Dynamics Simulations[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(3): 52−61. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024110430

· 研究与探讨 ·

# 基于分子动力学模拟的乙醇/丙酮复合沉淀法优化苹果多酚氧化酶纯化工艺

时小雪[1,2,3,4], 闻彦兵[1,2,3,4], 齐祥明[1,2,3,4,*]

（1.中国海洋大学食品科学与工程学院, 海洋食品加工与安全控制全国重点实验室, 山东青岛 266404;
2.青岛海洋科技中心海洋药物与生物制品功能实验室, 山东青岛 266237;
3.青岛市食品生物技术重点实验室, 山东青岛 266404;
4.中国轻工业水产品生物加工重点实验室, 山东青岛 266404）

**摘　要:** 苹果多酚氧化酶（polyphenol oxidase，PPO）是引发果蔬酶促褐变的关键酶，其高效分离纯化对褐变抑制机制研究及工业化应用具有重要意义。针对传统单一沉淀剂用量大、酶活回收率低的问题，本研究旨在通过分子动力学模拟辅助设计复合沉淀体系，结合层析技术优化苹果 PPO 分离纯化工艺，以实现低成本、高效率的酶制备。首先通过分子动力学模拟预测单一沉淀剂（硫酸铵、乙醇、丙酮）及复合体系的沉淀效果，再进一步采用 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析与 Sephadex G-100 层析进行纯化。实验结果表明：乙醇/丙酮复合沉淀剂与苹果 PPO 的相互作用更优，50% 浓度乙醇/丙酮（以 1∶1 的比例混合）单级沉淀 PPO 可减少 33.33% 沉淀剂用量，同时获得了 89.85% 酶活回收率和 1.24 纯化倍数；层析后 PPO 比酶活达 156362.78 U/mg，纯化倍数达到 18.33。SDS-PAGE 电泳显示单一条带（分子量约为 28 kDa）。本研究基于分子动力学模拟提出的复合沉淀策略为 PPO 的提供了新思路，对果蔬加工中酶促褐变控制技术的开发具有参考价值。

**关键词:** 苹果, 多酚氧化酶, 硫酸铵沉淀, 有机溶剂沉淀, 复合沉淀剂, 分离纯化

**中图分类号:** TS255.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)03−0052−10

**DOI:** 10.13386/j.issn1002-0306.2024110430　　本文网刊:

# Optimization of Apple Polyphenol Oxidase Purification Process Using Ethanol/Acetone Mixed Solvent Precipitation Guided by Molecular Dynamics Simulations

**SHI Xiaoxue[1,2,3,4], WEN Yanbing[1,2,3,4], QI Xiangming[1,2,3,4,*]**

（1.State Key Laboratory of Marine Food Processing and Safety Control, College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266404, China;
2.Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, China;
3.Qingdao Key Laboratory of Food Biotechnology, Qingdao 266404, China;
4.Key Laboratory of Biological Processing of Aquatic Products, China National Light Industry, Qingdao 266404, China）

**Abstract:** Apple polyphenol oxidase (PPO), a key enzyme triggering enzymatic browning in fruits and vegetables, requires efficient purification for both mechanistic studies and industrial applications. To address the limitations of conventional single precipitants (e.g., high solvent consumption and low enzyme activity recovery), this study aimed to develop a cost-

**收稿日期:** 2024−12−02

**基金项目:** 山东省重点研发项目（2019JZZY010814）。

**作者简介:** 时小雪（2001−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品非热加工技术, E-mail: shixiaoxue9286@163.com。

*** 通信作者:** 齐祥明（1977−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 绿色食品生物技术, E-mail: qixm@ouc.edu.cn。

effective PPO purification strategy by integrating mixed solvent precipitation guided by molecular dynamics (MD) simulations with chromatographic techniques. First, MD simulations predicted the interaction mechanisms between PPO and precipitants (ammonium sulfate, ethanol, acetone, and ethanol/acetone mixtures). Further purification was then conducted using DEAE-Sepharose Fast Flow ion-exchange chromatography and Sephadex G-100 gel filtration. The experimental validation demonstrated that the ethanol/acetone mixed solvent precipitant exhibited superior binding affinity. Single-step mixed solvent precipitation (ratio of ethanol/acetone 1∶1, v/v) at 50% solvent concentration reduced precipitant usage by 33.33%, while achieving 89.85% enzyme activity recovery and a 1.24-fold purification. After chromatography, the PPO specific activity reached 156362.78 U/mg, with a purification fold of 18.33. SDS-PAGE analysis confirmed a single protein band at approximately 28 kDa. The mixed solvent precipitation approach proposed in this study based on MD provides a novel approach for PPO purification, offering critical implications for advancing enzymatic browning control technologies in fruit and vegetable processing industries.

**Key words**: apple; polyphenol oxidase; ammonium sulphate precipitation; organic solvent precipitation; mixed precipitant; separation and purification

多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)是催化果蔬原料酶促褐变的关键酶类[1],其通过催化酚类底物氧化的级联反应[2−4],直接影响果蔬制品的感官品质[5−7]和营养价值[8]。苹果作为全球第二大水果品类,其加工过程中的褐变控制研究尤为重要[4,9−10],且高度依赖于高纯度 PPO 样品的获取。苹果 PPO 的研究涉及酶学性质及其影响因素[11]等多方面,甚至包括其生理功能[12]、基因克隆等[13]。然而,现有研究多采用蘑菇 PPO 作为模型酶[14−15],这可能导致抑制策略开发的物种特异性偏差。这种局限性的根源在于苹果 PPO 分离纯化技术的不足,特别是粗提取阶段的技术瓶颈,已严重制约了其本征酶学特性的精准解析,因而阻碍了苹果褐变控制理论的研究和理性技术开发。

目前 PPO 粗提取主要采用硫酸铵沉淀[16]和有机溶剂沉淀[7,17−18]两种方法,这两种方法都面临着效率和活性的双重挑战。硫酸铵沉淀法虽被广泛应用,但需 60%~80% 的高饱和度,存在蛋白质构象扰动[19]、脱盐过程酶损失大等问题[11](单步酶活损失超 60%[10,20−21])。有机溶剂沉淀,如乙醇[22]和丙酮[18],虽能规避脱盐步骤,回收率可达 70%~100%[23−24]。然而,却要面临溶剂浓度高(往往高达 80%)、杂蛋白共沉淀严重等挑战。更为关键的是,现有技术缺乏对沉淀剂-酶相互作用机制的深入解析,严重依赖经验性试错优化。分子动力学(molecular dynamics, MD)模拟技术能预测蛋白质在不同条件下的构象和功能动态变化[25]、提供蛋白质微观结构的模拟信息[26−27],为优化沉淀 PPO 策略提供理论依据。然而,目前尚未有研究者采用 MD 模拟技术对乙醇、丙酮以及本研究首次提出的乙醇/丙酮复合沉淀策略进行系统评价和优化。本研究创新性地提出 MD 模拟指导的乙醇/丙酮复合沉淀策略,旨在突破传统分离纯化技术的局限,实现苹果 PPO 的高效分离纯化。

本研究采用 MD 模拟技术构建苹果 PPO-溶剂分子相互作用模型,通过溶剂可及表面积(solvent-accessible surface area, SASA)数据及亲疏水表面分析等指标,从分子机制层面系统评价沉淀方案的优劣。实验研究方面,首先比较硫酸铵、乙醇、丙酮单一沉淀剂对苹果 PPO 的沉淀效果,进而优化乙醇/丙酮复合沉淀策略。通过模拟与实验相结合,建立高效的苹果 PPO 粗提取工艺,为苹果酶促褐变抑制研究提供高质量的 PPO 样品,推动果蔬加工业更科学地、高效地解决酶促褐变问题。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料与仪器

苹果　山东省烟台市栖霞市红富士苹果 1 号种植基地,挑选新鲜、无腐烂变质、无机械损伤,色泽正常的为实验材料;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、硫酸铵、无水乙醇、丙酮、十二烷基硫酸钠、邻苯二酚、氯化钠　分析纯,国药集团化学试剂有限公司;交联聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpolypyrrolidone, PVPP)、DEAE 琼脂糖凝胶 FF(DEAE-sepharose fast flow)、葡聚糖 G-100(Sephadex G-100)凝胶、牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)、三羟甲基氨基甲烷(tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris)、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、抗坏血酸、考马斯亮蓝 G-250　北京索莱宝科技有限公司。

Z8-V82 榨汁机　九阳股份有限公司;Neo 1600R 高速冷冻离心机　上海力申科学仪器有限公司;HD-2 电脑紫外检测仪、HD-A 核酸蛋白检测仪　上海沪西分析仪器厂有限公司;Multiskan FC 酶标仪　赛默飞世尔科技公司。

### 1.2　实验方法

1.2.1　样品预处理　参考刘芳[28]的方法并略作修改。将苹果清洗、去皮后,切成小块,以料液比为 1∶1 加入 4 ℃ 预冷的 0.05 mol/L、pH6.80 的磷酸盐缓冲液中打浆 2 min,磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L、pH6.80)中添加 1 mmol/L PMSF、1 mmol/L EDTA、2%(w/v)PVPP, 0.07% 抗坏血酸。然后将匀浆通过两层 160 目的纱布过滤,所得滤液在 4 ℃ 下,

10000 r/min 离心 20 min。所得上清液即为 PPO 提取原液。

1.2.2 单一沉淀剂粗提取 PPO 效果对比

1.2.2.1 硫酸铵沉淀 参考 Han 等[10] 的方法，加入固体硫酸铵粉末到 PPO 提取原液中，使其分别达到 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 饱和度，4 ℃ 静置 30 min 后，10000 r/min 离心 15 min，分别收集上清液和沉淀，并用 5 mL 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液（pH6.80）将此沉淀物溶解。溶解后的沉淀物作为后续实验的粗酶液。收集粗酶液保存于 4 ℃ 冰箱供后续分析使用。分别测定不同饱和度硫酸铵沉淀所得上清液和沉淀溶解后粗酶液的酶活和蛋白浓度，并计算沉淀酶活回收率、蛋白回收率及纯化倍数。

1.2.2.2 冷丙酮沉淀 参考 Derardja 等[18] 的方法，将−20 ℃ 预冷的丙酮，加入到 PPO 提取原液中，使其分别达到 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 的浓度。−20 ℃ 静置 4 h 后，10000 r/min 离心 15 min，分别收集上清液和沉淀，将沉淀置于冰上在通风橱中挥发 15 min。并用 5 mL 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液（pH6.80）将此沉淀物溶解。溶解后的沉淀物作为后续实验的粗酶液。收集粗酶液保存于 4 ℃ 冰箱供后续分析使用。分别测定不同浓度丙酮沉淀所得上清液和沉淀溶解后粗酶液的酶活和蛋白浓度，并计算沉淀酶活回收率、蛋白回收率及纯化倍数。

1.2.2.3 冷乙醇沉淀 参考 Li 等[22] 的方法，将−20 ℃ 预冷的乙醇，加入到 PPO 提取原液中，使其分别达到 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 的浓度。−20 ℃ 静置 4 h 后，10000 r/min 离心 15 min，分别收集上清液和沉淀，将沉淀置于冰上在通风橱中挥发 15 min。并用 5 mL 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液（pH6.80）将此沉淀物溶解。溶解后的沉淀物作为后续实验的粗酶液。收集粗酶液保存于 4 ℃ 冰箱供后续分析使用。分别测定不同浓度乙醇沉淀所得上清液和沉淀溶解后粗酶液的酶活和蛋白浓度，并计算沉淀酶活回收率、蛋白回收率及纯化倍数。

1.2.3 分子对接和分子动力学模拟优化 PPO 提取策略 为比较不同沉淀剂使用策略在分子机制上的优劣性，使用 AutoDock 分别对 PPO+乙醇、PPO＋丙酮和 PPO+乙醇+丙酮三种体系进行分子对接，网格间距为 0.375 Å，基于 lamarkian 遗传算法获得结合能最低的体系。对接过程中使用的 PPO 的晶体结构（PDB Code: 6ELS）从蛋白质数据库 RCSB（https://www.rcsb.org）获取，乙醇（Pubchem CID: 702）和丙酮（Pubchem CID: 180）的分子结构从 NCBI Pubchem（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov）获得。

而后采用 GROMACS 2020.3 软件对上述对接模型进行分子动力学模拟。参考 Wen 等[29] 的方法并略作修改，使用 AMBER99sb.ff 力场分别对上述对接模型进行 MD 模拟（100 ns），总能量均值取从初始值到 100 ns 的平均值。复合物被封闭在适当大小的立体（TIP3P）水盒子的中心，以满足最小的空间约束。为了获得中性溶剂化体系，加入 6 个钠离子平衡体系电荷，并使用最快速下降算法在 50000 步中进行能量最小化，使用 Berendsen 恒温器和 Parrinello-Rahman 压力耦合方法在 288 K 和 1 bar 的压力下进行 100 ps 的 NVT 和 NPT 平衡。静电相互作用采用粒子网格（PME）方法计算，网格间距为 0.16 nm，模拟过程中的时间步长设置为 2 fs，使用截断距离 1 nm，以限制短程非键相互作用和范德华相互作用。模拟完成后，基于溶剂可及表面积（SASA）、均方根偏差（root mean square deviation, RMSD）、回转半径（radius of gyration, Rg）和总能量等指标进行分析，并使用开源版 PyMol 和 BIOVIA Discovery Studio 2019 绘图。

1.2.4 乙醇/丙酮复合沉淀实验验证 将−20 ℃ 预冷的乙醇和丙酮，以 0∶10、2∶8、4∶6、5∶5、6∶4、8∶2、10∶0 的比例，分别加入到 PPO 提取原液中，使其分别达到 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 的浓度。−20 ℃ 静置 4 h 后，10000 r/min 离心 15 min，分别收集上清液和沉淀，将沉淀置于冰上在通风橱中挥发 15 min。并用适量 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液（pH6.80）将此沉淀物溶解。溶解后的沉淀物作为后续实验的粗酶液。收集粗酶液保存于 4 ℃ 冰箱供后续分析及层析使用。分别测定不同比例乙醇/丙酮沉淀所得上清液和沉淀溶解后粗酶液的酶活和蛋白浓度，并计算每步沉淀后的酶活回收率、蛋白回收率以及纯化倍数。

1.2.5 层析纯化

1.2.5.1 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析 参考 Han 等[9] 的方法略作修改，装柱后（16 mm×650 mm），先用磷酸缓盐缓冲液（0.05 mol/L、pH6.80）平衡 4 个柱床体积后，取 1.2.4 所得的粗酶液 20 mL 上柱，静置 10 min 后用 pH6.80、0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液（含 0~1 mol/L 氯化钠）进行线性梯度洗脱，恒流泵速度设置为 0.3 mL/min，每管收集 3 mL；然后分别测定各管中 PPO 酶活性，收集活性较高的酶液，然后用 10 kDa 超滤管浓缩。将浓缩后的 PPO 酶液于 4 ℃ 冰箱中保存，后续利用 Sephadex G-100 色谱柱进一步纯化。

1.2.5.2 SephadexG-100 柱层析 装柱后（16 mm×200 mm），用磷酸盐缓冲液（0.05 mol/L、pH6.80）平衡 4 个柱床体积后，然后加入 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析后浓缩酶液 4 mL，用磷酸盐缓冲液（0.05 mol/L、pH6.80）洗脱，流速设为 0.3 mL/min，每管收集 3 mL；分别测定各管中 PPO 酶活性，收集活性较高的酶液，获得 PPO，−20 ℃ 冰箱保存备用。并对 PPO 的纯度和相对分子质量进行测定。

1.2.6　检测方法

1.2.6.1　酶活测定　参照 Han 等[9] 的方法略作修改。将 30 μL 1.2.2、1.2.4 及 1.2.5 节中获取的粗酶液或纯化酶液和 150 μL 邻苯二酚（20 mmol/L）溶液混匀，测定混合溶液在 420 nm 处的吸光度变化，空白对照为 30 μL 的磷酸盐缓冲液（0.05 mol/L、pH6.80）。以每分钟反应混合液在 420 nm 波长处吸光度变化 0.001 为 1 个酶活力单位（U），计算各酶液的酶活。酶的比活力（U/mg pro）为酶活与酶液蛋白含量的比值。酶活回收率的计算如式（1），纯化倍数的计算如式（2）所示。

$$酶活回收率(\%)=\frac{每一步的总酶活}{初始总酶活}\times 100 \quad 式（1）$$

$$纯化倍数=\frac{每一步的比活力}{初始比活力} \quad 式（2）$$

1.2.6.2　蛋白质含量的测定　采用 Bradford 法[30] 进行蛋白含量测定。以牛血清蛋白（BSA）标准品作为标准蛋白，绘制标准曲线。根据标准曲线计算样品中蛋白质的浓度。标准曲线方程：Y=2.2614X+0.6404（$R^2$=0.9915）。蛋白回收率的计算如式（3）所示。

$$蛋白回收率(\%)=\frac{每一步的总蛋白}{初始总蛋白}\times 100 \quad 式（3）$$

1.2.6.3　PPO 纯度测定　实验利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）变性凝胶电泳法检测经 DEAE-Sepharose FF 层析和 SephadexG-100 凝胶层析纯化后 PPO 的分子质量。配制体积分数为 5% 的浓缩胶和体积分数为 12% 的分离胶，10 μL 蛋白上样缓冲液加入 40 μL 1.2.5.2 所得 PPO 样品，混合均匀，沸水浴 10 min，之后吸取 Marker 5 μL 和样品 15 μL 注入凝胶孔道内，设定起始电压为 80 V，电泳一段时间至指示剂进入分离胶时，改变电压至 120 V 继续电泳，结束电泳后用考马斯亮蓝 R-250 染色。最后凝胶在脱色液脱色。脱色开始 1 h 换 1 次脱色液，连续换 3 次后，再脱色过夜。通过电泳凝胶上该样品泳道的条带情况判断该 PPO 样品是否达到电泳纯。

1.2.6.4　PPO 相对分子质量的测定　实验方法如 1.2.6.3 所述，最终通过 Marker 泳道和样品泳道的比对初步判断样品 PPO 的分子量。

### 1.3　数据处理

所有数据均为 3 次重复实验的平均值±标准差，实验数据采用 Origin 2022 软件作图。采用 SPSS 22.0 软件对组间和组内差异性进行分析，$P$<0.05 表示差异显著。

## 2　结果与分析

### 2.1　单一沉淀剂沉淀规律

2.1.1　硫酸铵作为沉淀剂　本研究首先系统评估了传统硫酸铵沉淀法对苹果 PPO 的纯化效能。图 1 显示，当硫酸铵饱和度低于 80% 时，PPO 酶活回收率始终低于 20%；饱和度提升至 80% 以上后，酶活回收率显著增至 57.93%±0.12%（$P$<0.05）。表 1 和图 1 数据结合显示，在饱和度达 80% 前，尽管蛋白回收率一直增加，纯化倍数却出现降低，提示此阶段增加的沉淀物以杂蛋白为主。因此，采用此法沉淀 PPO 时硫酸铵饱和度需超过 80%。

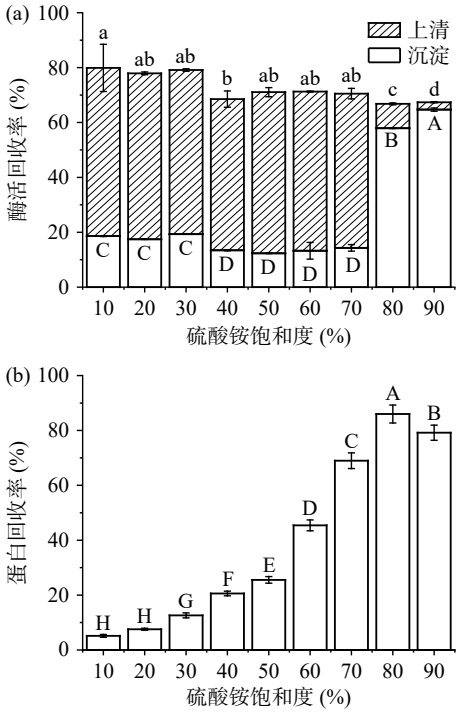



图 1　不同饱和度硫酸铵沉淀 PPO

Fig.1　Precipitation of PPO by ammonium sulphate at different saturation levels

注：（a）酶活回收率，（b）蛋白回收率；不同大写字母表示沉淀组差异显著（$P$<0.05），不同小写字母表示上清组差异显著（$P$<0.05），图 2 同。

表 1　不同饱和度硫酸铵沉淀后 PPO 纯化倍数

Table 1　Purification multiplicity of PPO after ammonium sulphate precipitation at different saturation levels

| 硫酸铵饱和度（%） | 纯化倍数 |
|---|---|
| 10 | 3.39±0.37$^{a}$ |
| 20 | 2.15±0.10$^{b}$ |
| 30 | 1.43±0.10$^{c}$ |
| 40 | 0.61±0.03$^{de}$ |
| 50 | 0.45±0.02$^{ef}$ |
| 60 | 0.27±0.07$^{f}$ |
| 70 | 0.19±0.01$^{f}$ |
| 80 | 0.61±0.01$^{de}$ |
| 90 | 0.76±0.03$^{d}$ |

注：同列不同小写字母表示差异显著（$P$<0.05），表2同。

上述实验结果与文献报道的苹果 PPO 硫酸铵沉淀工艺[10−11,21] 中饱和度的选择并不吻合（文献通常采用 50%~80% 饱和度），可部分解释相关研究中酶活回收率普遍低于 40% 的现象。分级沉淀策略虽被部分研究采用[10−11,18,31]，试图通过牺牲酶活回收率提高

纯化效果，但本实验表明，该方案将导致 PPO 大量流失。因为在硫酸铵饱和度低于 80% 时沉淀物中仍残留 12%~19% 的 PPO 酶活。

进一步分析发现，高饱和度硫酸铵（≥80%）沉淀虽可得到较高 PPO 酶活回收率，但引入的盐离子需透析处理，此过程酶活损失率极高[20]。上述局限性表明，硫酸铵沉淀法在规模化 PPO 制备中存在本质缺陷：为维持合理回收率（>60%），需同步承担高盐负荷与复杂后处理成本，难以满足大剂量制备对效率与经济性的双重需求。

2.1.2 乙醇或丙酮作为单一沉淀剂 结合上文结果及文献研究基础[18,22]，本实验进一步探索了乙醇或丙酮作为单一蛋白沉淀剂对苹果 PPO 的纯化效能。与硫酸铵沉淀法相比，这两种有机溶剂浓度 50% 以上时所得的酶活回收率均提高了 30% 以上。图 2、表 2 显示，当乙醇浓度增至 60% 时，PPO 开始大量沉淀，其酶活回收率可达 97.96%，纯化倍数为 1.23。丙酮沉淀效果稍差，其浓度增至 60% 时，PPO 沉淀也大量出现，酶活回收率达 93.44%，纯化倍数为 1.25。此时纯化倍数均仅略高于 1，伴随大量杂蛋白共沉淀。统计显示，丙酮和乙醇沉淀法在酶活回收率上有显著性差异（$P<0.05$），造成该差异的原因可能在于丙酮和乙醇与 PPO 分子相互作用的不同：乙醇在分子层面上对 PPO 疏水性的提升作用优于丙酮，使其具备了略强的沉淀能力与酶活保护效果。

表 2 不同浓度乙醇、丙酮沉淀后 PPO 纯化倍数

Table 2 Purification multiplicity of PPO after precipitation with different concentrations of ethanol and acetone

| 乙醇/丙酮浓度(%) | 纯化倍数(乙醇) | 纯化倍数(丙酮) |
|---|---|---|
| 10 | 0.30±0.02$^{e}$ | 0.52±0.05$^{e}$ |
| 20 | 0.39±0.07$^{de}$ | 0.41±0.01$^{f}$ |
| 30 | 0.51±0.03$^{d}$ | 0.39±0.02$^{f}$ |
| 40 | 0.69±0.07$^{c}$ | 0.73±0.04$^{d}$ |
| 50 | 1.09±0.05$^{b}$ | 0.84±0.03$^{c}$ |
| 60 | 1.23±0.06$^{a}$ | 1.25±0.05$^{a}$ |
| 70 | 1.14±0.07$^{ab}$ | 1.06±0.01$^{b}$ |
| 80 | 1.27±0.00$^{a}$ | 1.32±0.02$^{a}$ |

文献多采用 80% 冷丙酮沉淀 PPO[18,23−24]，酶活回收率在 70%~100% 之间，但未探索更低浓度沉淀的可行性。本研究结果显示，60% 的有机溶剂浓度同样可实现 90% 以上的酶活回收率，且溶剂用量大幅减少。具体而言，处理 1 L 粗酶液时，80% 浓度需 4 L 沉淀剂，而 60% 浓度仅需 1.5 L。

在有机溶剂沉淀工艺研究中，乙醇和丙酮的低浓度沉淀物中均保留近 20% 的酶活。因此，从维持高酶活回收率的角度考虑，有机溶剂分级沉淀策略仍不具备推荐价值。

## 2.2 乙醇/丙酮复合沉淀策略探析

从降低环境污染和成本的角度考虑，采用更低有机溶剂用量以实现更高酶活回收率的工艺策略具

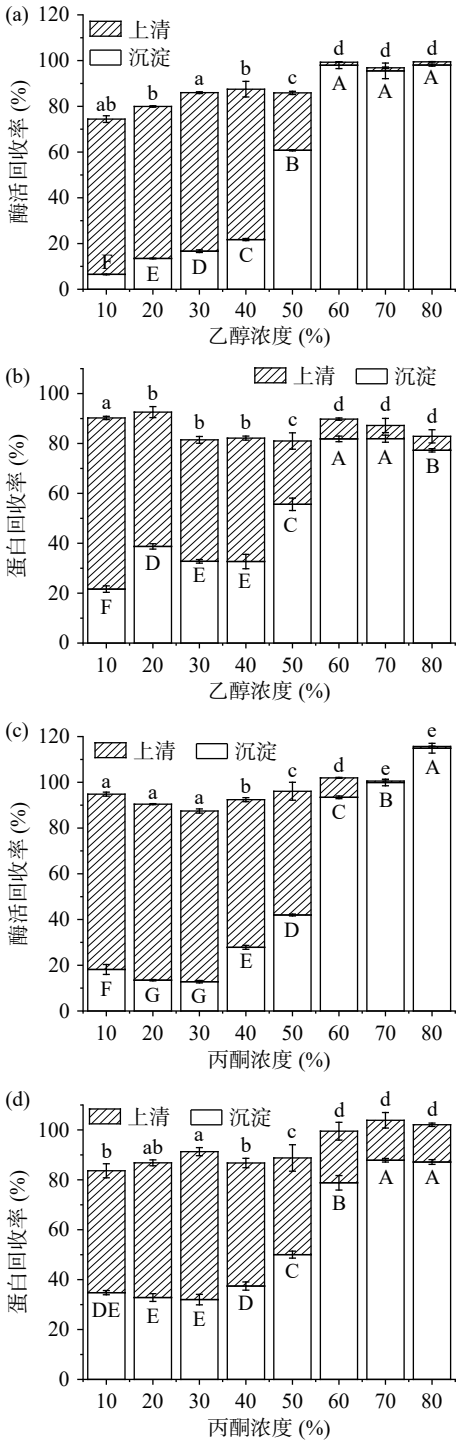



图 2 不同浓度乙醇、丙酮沉淀 PPO

Fig.2 Precipitation of PPO with different concentrations of ethanol and acetone

注：(a, c)酶活回收率，(b, d)蛋白回收率。

有重要探索价值。为此，本研究分别从分子动力学模拟计算和实验验证两个角度探索了乙醇/丙酮复合溶剂沉淀的工艺策略可行性。

2.2.1 分子对接和分子动力学模拟 通过分子动力学模拟，本研究首先预测了 PPO 在乙醇、丙酮以及乙醇/丙酮混合溶液中的疏水性变化（结果如图 3、表 3 所示）。

RMSD 显示模拟体系在 30 ns 左右达到平衡构

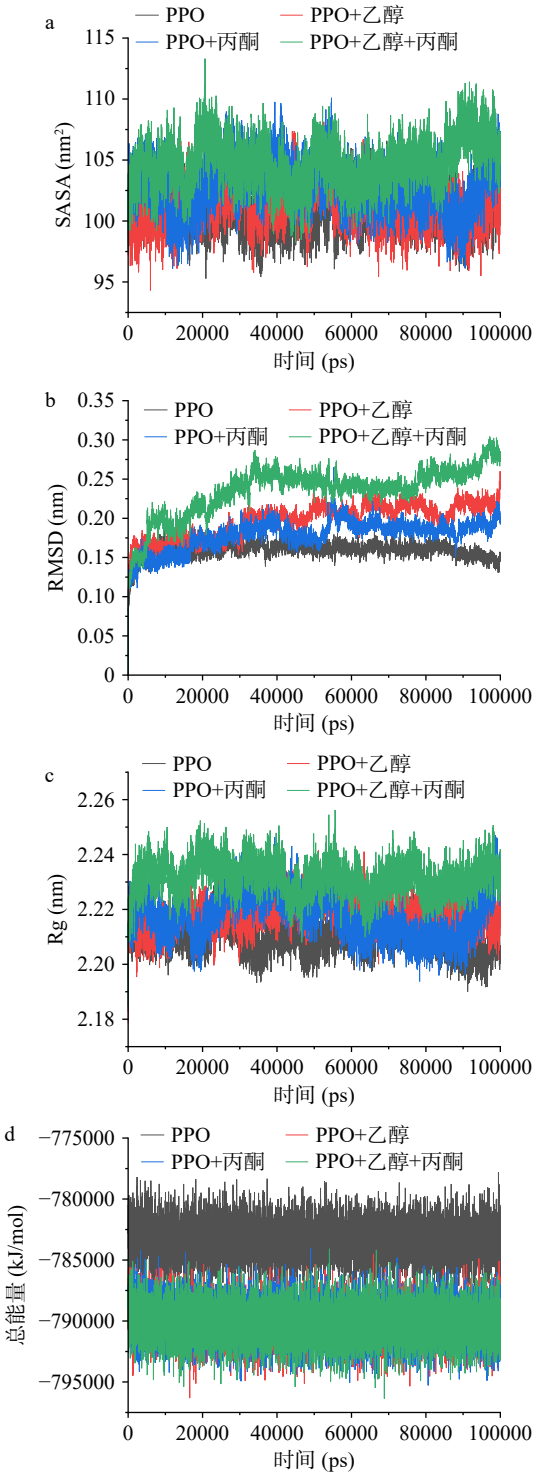



图 3　分子动力学模拟结果

Fig.3　Results of molecular dynamics simulation

注：(a)SASA，(b)RMSD，(c)Rg，(d)总能量。

象(图 3b)，表明 PPO-溶剂复合体系趋于稳定[32]。通过蛋白质亲疏水表面分析显示(图 4)，PPO 在与乙醇、丙酮单独结合以及乙醇/丙酮混合溶剂结合后，均呈现疏水区域增多和 SASA 增大的趋势。值得注意的是，乙醇和丙酮单独作用时主要表现为疏水区域疏水性的增强，而乙醇/丙酮复合体系在疏水性的增强的同时还增加了疏水区域的暴露面积(图 4c)。这一现象表明，混合溶剂体系通过协同作用诱导 PPO 分子疏水区域结构的暴露，其作用机制不同于单一溶剂对局部疏水性的简单增强效应。上述发现与经典疏水相互作用驱动蛋白质沉淀的理论相契合，因此，乙醇/丙酮复合溶剂沉淀策略的理论可行性存在，值得进一步实验验证。

单沉淀剂模拟结果显示，乙醇、丙酮单独与 PPO 对接时都优先选择与 Pro 237 结合。与丙酮结合体系相比，乙醇对 PPO 疏水性的提升作用较好(图 4a、b)。这与前文实验中乙醇沉淀效果略好的结果也能相互对应，进一步显示了分子动力学模拟结果可用于沉淀效果的预测。对同时对接了两种沉淀剂的 PPO 分子进行分子动力学模拟结果显示(如图 4c)，在乙醇/丙酮共同作用下，丙酮对接的位置并未发生变化，而乙醇被迫对接到其他地方，SASA 出现了进一步增加(图 3a)，据推测与此对接方式也有关。这进一步证实结合后 PPO 分子表面疏水性可能会增加，进而促其更快沉淀。

基于图 4 进行更进一步空间分析显示，苹果 PPO 酶的上部二级结构以 $\alpha$-螺旋为主，下部为 $\beta$-折叠所围成桶状结构，活性中心位于接近两部分中间的上部区域。结合文献数据推测[33−35]，$\beta$-折叠所围成的桶状结构应为 PPO 的跨膜区域，而桶中的通道应为底物达到内部活性中心所经过的区域。图 4 还显示，在结合了乙醇、丙酮或同时结合乙醇/丙酮后，PPO 疏水性变化较大的两个区域主要是上部远离活性中心的顶端和侧面。上部靠近活性中心的侧面以及下部 $\beta$-桶状结构，尤其是活性中心附近，均较好地维持了原状。据此推测，这样的表面疏水性变化对 PPO 活性的影响可能不大，这和单一有机溶剂沉淀的结果也能很好的吻合。

此外，一些蛋白结构数据也反映了结合有机溶剂后 PPO 的结构性质发生了一些变化。首先，相比于单独溶剂体系，复合溶剂体系中 PPO 的 RMSD 更

表 3　分子动力学模拟结果的定量数据

Table 3　Quantitative data from molecular dynamics simulation results

| 体系 | PPO | 乙醇 | 丙酮 | 乙醇/丙酮 |
|---|---|---|---|---|
| SASA均值(nm²) | 100.82±1.56 | 101.27±1.83 | 102.82±2.01 | 104.73±1.98 |
| RMSD均值(nm) | 0.16±0.01 | 0.20±0.02 | 0.18±0.02 | 0.24±0.03 |
| Rg均值(nm) | 2.21±0.01 | 2.22±0.01 | 2.22±0.01 | 2.23±0.01 |
| 总能量均值(kJ/mol) | −783332.69±1475.72 | −790115.77±1480.72 | −790002.56±1491.9 | −790176.99±1485.57 |

注：SASA(溶剂可及表面积)：表征蛋白质表面与溶剂接触的面积；RMSD(均方根偏差)：反映蛋白质构象相对于参考结构的偏离程度；Rg(回转半径)：描述蛋白质结构的紧凑性；总能量：系统所有能量贡献的综合体现，用于评估系统的稳定性、相互作用强度及动态行为。

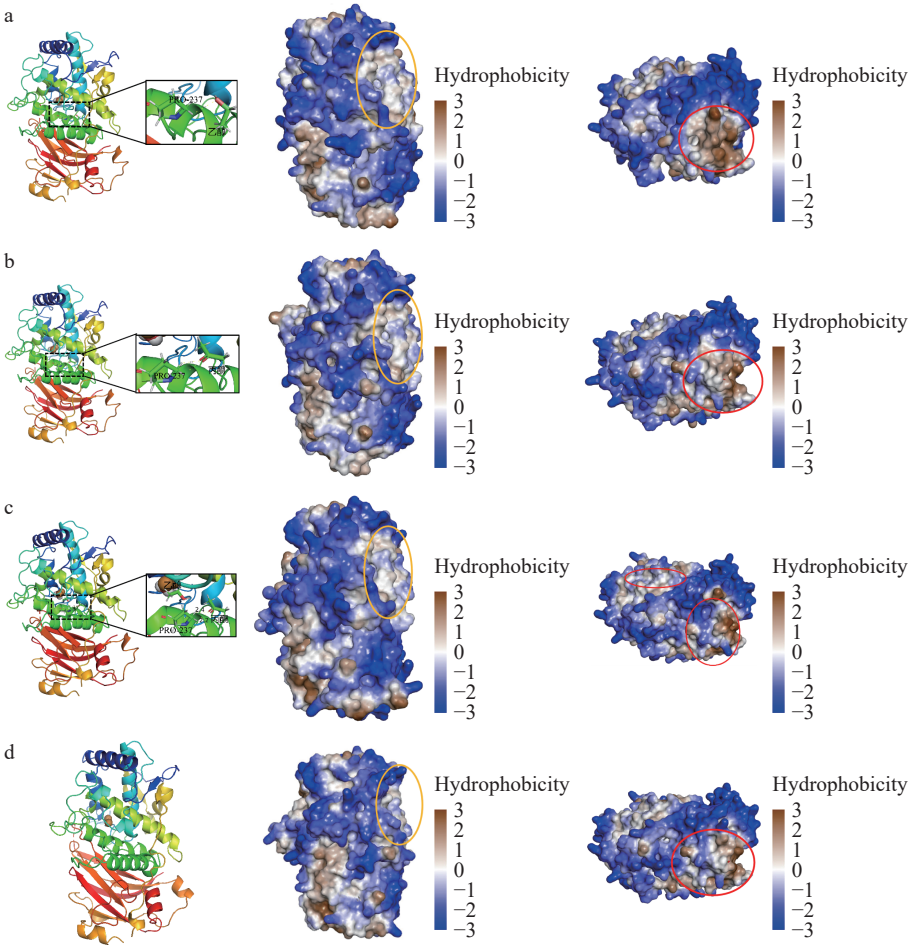



图 4　PPO 分子对接图像以及分子动力学模拟后 PPO 三级结构

Fig.4　Docking images of PPO molecules and tertiary structure of PPO after molecular dynamics simulation

注：(a)单结合乙醇，(b)单结合丙酮，(c)结合乙醇+丙酮，(d)单纯 PPO；负值(蓝色)亲水，正值(棕色)疏水。

高，表明复合溶剂具有更强的改变 PPO 构象的能力。PPO 分子的 Rg 呈相同的增加趋势(图 3c)，这表明 PPO 分子在结合了有机溶剂后将变得更加松散[32]，比表面积倾向于增加，这同样预示着蛋白有更高的沉淀可能性。通常，类似的变化均会得到蛋白结构趋于不稳定的推测[32]。然而在本研究对接后的分子动力学模拟的结果中，其总能量却是降低的(图 3d)，说明这种疏水性增加的结构变化趋势并未造成蛋白质构象的不稳定[36]。

2.2.2　乙醇/丙酮复合沉淀剂实验结果　结合上文的模拟结果，本研究进一步进行了乙醇/丙酮复合沉淀策略的探索，结果如图 5 所示。乙醇/丙酮复合溶剂浓度仅为 50% 时，PPO 即开始大量沉淀。图 5 和表 4 的数据进一步显示，两种溶剂的比例对 PPO 的沉淀效果有显著影响。乙醇/丙酮的比例为 1∶1，浓度为 50% 时，PPO 的酶活回收率和纯化倍数均为最高。

在 50% 有机溶剂浓度下，复合溶剂沉淀较单一乙醇或丙酮沉淀的酶活回收率提升约 30%。与 60% 的单一有机溶剂相比，本方案酶活回收率略低(89.85%)，但蛋白回收率也出现了降低(即 72.40%，去除到上清中的杂蛋白量有所增加)，纯化倍数提高，且有机溶剂用量减少 33.33%。

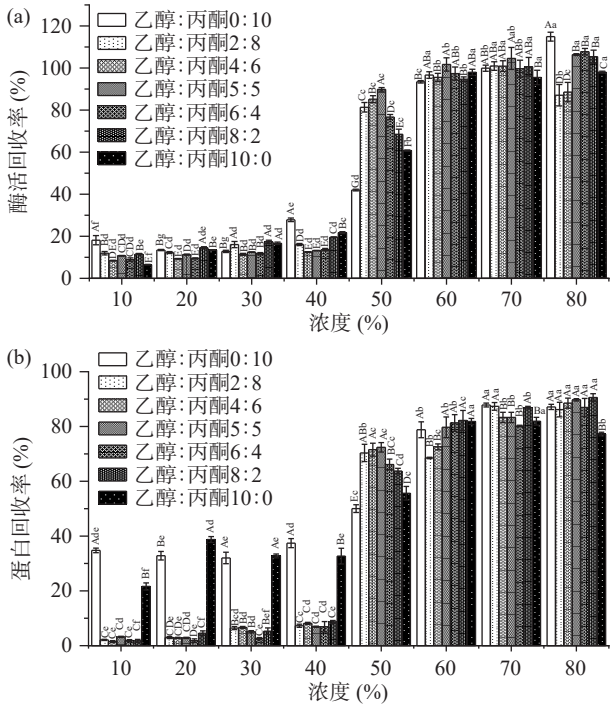



图 5　不同浓度和比例的乙醇/丙酮混合溶液沉淀 PPO

Fig.5　Precipitation of PPO by mixed ethanol/acetone solutions of different concentrations and ratios

注：(a)酶活回收率，(b)蛋白回收率；不同大写字母表示组间差异显著($P$<0.05)，不同小写字母表示组内差异显著($P$<0.05)。

表 4　50% 浓度下不同比例乙醇/丙酮混合溶液沉淀后 PPO 纯化倍数

Table 4　Purification multiplicity of PPO after precipitation from different proportions of ethanol/acetone mixture at 50% concentration

| 乙醇/丙酮比例 | 2∶8 | 4∶6 | 5∶5 | 6∶4 | 8∶2 |
|---|---|---|---|---|---|
| 纯化倍数 | 1.16±0.05$^{ab}$ | 1.19±0.05$^{ab}$ | 1.24±0.04$^{a}$ | 1.16±0.06$^{ab}$ | 1.07±0.02$^{b}$ |

注：同行不同小写字母表示差异显著（$P$<0.05）。

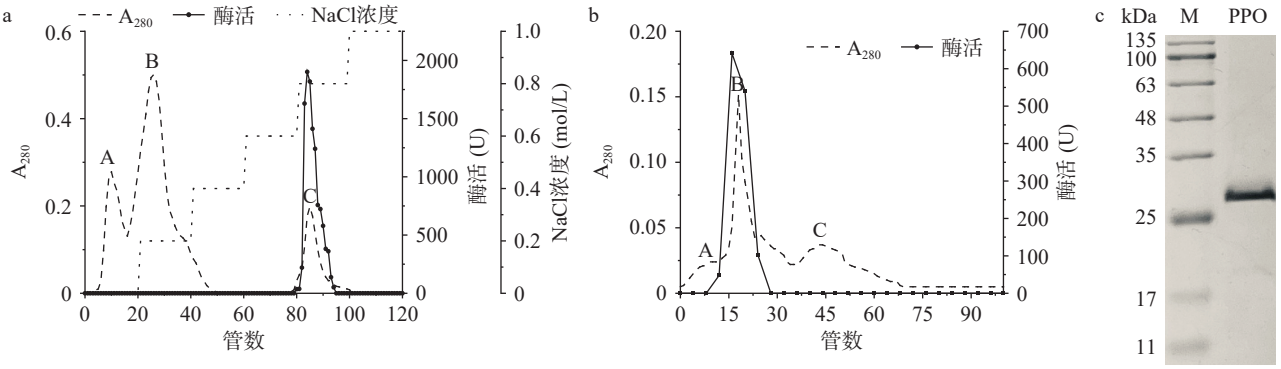



图 6　苹果 PPO 纯化步骤

Fig.6　Purification steps of apple PPO

注：(a)DEAE Sepharose Fast Flow 洗脱曲线，(b)Sephadex G-100 洗脱曲线，(c)PPO 的 SDS-PAGE 图。

表 5　苹果多酚氧化酶纯化步骤

Table 5　Purification steps of apple polyphenol oxidase

| 纯化步骤 | 蛋白(mg/mL) | 酶活(U/mL) | 比酶活(U/mg) | 纯化倍数 |
|---|---|---|---|---|
| 粗酶 | 0.10±1.79×10$^{-3}$ | 845.83±89.77 | 8530.21±742.35 | 1.00 |
| 乙醇/丙酮混合沉淀 | 0.12±2.24×10$^{-3}$ | 1535.83±127.04 | 12939.02±1242.15 | 1.52 |
| DEAE-Sepharose FF层析 | 0.10±2.67×10$^{-3}$ | 6577.50±173.55 | 66140.39±2245.57 | 7.75 |
| Sephadex G-100层析 | 0.17±1.79×10$^{-3}$ | 27000.00±212.13 | 156362.78±753.50 | 18.33 |

与文献 [23] 中 80% 浓度的有机溶剂沉淀 PPO 相比，本方法节省 75% 的有机溶剂用量。与前文提到的 60% 单一有机溶剂沉淀 PPO 相比，本方法节省 33.33% 的有机溶剂用量。

然而，乙醇/丙酮复合溶剂所得沉淀蛋白的纯化倍数也仅为 1.24，这表明其中的杂蛋白尚未得到有效去除，仍需通过层析进一步去除杂蛋白，获取可用于研究的 PPO 单条带样品。因此，针对乙醇/丙酮复合溶剂的沉淀物，后续继续结合离子交换和凝胶排阻层析继续进行纯化。

### 2.3　DEAE-Sepharose FF 离子交换层析和 Sephadex G-100 层析

本研究首先采用 DEAE-Sepharose FF 离子交换层析进行杂蛋白的去除。实验中以含有 0~1 mol/L 氯化钠的磷酸盐缓冲液（0.05 mol/L、pH6.80）进行梯度洗脱，在整个洗脱过程中发现三个蛋白峰（如图 6a 所示的 A、B、C 峰），其中 C 为酶活力峰。依据活力检测结果收集 C 峰，并使用 10 kDa 超滤管进行浓缩。如表 5 所示，得到的 PPO 酶液的比酶活为 66140.39 U/mg，纯化倍数为 7.75。

再利用 Sephadex G-100 层析对上述浓缩后的 PPO 酶液进一步层析，实验中以磷酸盐缓冲液（0.05 mol/L、pH6.80）进行洗脱，在整个洗脱过程中发现三个蛋白峰（如图 6b 所示的 A、B、C 峰），其中 B 为酶活力峰。依据活力检测结果收集 B 峰，使用 10 kDa 超滤管浓缩。如表 5 所示，PPO 酶液的比酶活达到 156362.78 U/mg，纯化倍数为 18.33。这一结果优于从蛇果[37] 中分离的 PPO（15.16 U/mg，纯化倍数为 14.1）以及澳洲青苹果[10] 中分离的 PPO（17500 U/mg，纯化倍数为 20.53）。

将经过层析纯化后的酶液进行 SDS-PAGE 电泳，结果如图 6c 所示。经纯化后，可得到较为纯净的单一条带，PPO 的分子量约为 28 kDa，这和文献报道的苹果 sPPO[9,11] 分子量接近（30~31 kDa）。

## 3　结论

本研究通过对比硫酸铵、乙醇、丙酮及乙醇/丙酮复合沉淀剂对苹果 PPO 的沉淀效果，结合分子动力学模拟的机理阐释，系统评估了乙醇/丙酮复合沉淀的可行性。结果表明，1∶1 比例的乙醇/丙酮复合沉淀剂在 50% 浓度下效果最佳，酶活回收率达 89.85%，纯化倍数为 1.24，沉淀剂用量较单一沉淀剂减少 33.33%。通过 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析和 Sephadex G-100 层析进一步纯化，获得比酶活为 156362.78 U/mg、纯化倍数为 18.33 的 PPO。SDS-PAGE 分析显示纯化后的 PPO 呈单一清晰条带，分子量约为 28 kDa，证实了纯化工艺的高效性。

本研究首次提出并验证了乙醇/丙酮复合沉淀剂的可行性，较以往单一沉淀剂工艺大幅提升了酶活回收率并降低了沉淀剂用量，为 PPO 的高效提取和分离纯化提供了新思路。该研究为果蔬加工业解决酶促褐变问题提供了技术支持，同时减少了有机溶剂用量，符合绿色化学趋势。复合沉淀剂提取蛋白工艺及该过程的分子机制阐释，均为本研究首次提出，该法在更多蛋白分离纯化策略的优化中是否具有普适性意义，仍待深入验证。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

## 参考文献


[1] FAN Xuetong. Chemical inhibition of polyphenol oxidase and cut surface browning of fresh-cut apples[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(27): 8737−8751.

[2] 崔晓颖, 彭新颜, 贺红军, 等. 芋头多酚氧化酶的分离纯化与酶学特性[J]. 食品科学, 2021, 42(12): 107−115. [CUI Xiaoying, PENG Xinyan, HE Hongjun, et al. Separation, purification and enzymatic characterization of polyphenol oxidase from taro[J]. Food Science, 2021, 42(12): 107−115.]

[3] SUI Xu, MENG Zan, DONG Tiantian, et al. Enzymatic browning and polyphenol oxidase control strategies[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2023, 81: 102921.

[4] LIU Bin, ZHOU Xianfang, GUAN Haiyan, et al. Purification and characterization of a dark red skin related dimeric polyphenol oxidase from Huaniu apples[J]. Foods, 2022, 11(12): 1790.

[5] MAKROO H A, SRIVASTAVA B, JABEEN A. Influence of mild electric field (MEF) on polyphenol oxidase and quality attributes of pineapple juice during ohmic heating[J]. LWT, 2022, 156: 113021.

[6] MUÑOZ-PINA S, DUCH-CALABUIG A, ROS-LIS J V, et al. A tetraazahydroxypyridinone derivative as inhibitor of apple juice enzymatic browning and oxidation[J]. LWT, 2022, 154: 112778.

[7] SAJJAD N, AHMAD M S, MAHMOOD R T, et al. Purification and characterization of novel isoforms of the polyphenol oxidase from *Malus domestica* fruit pulp[J]. PLoS One, 2023, 18(8): e0276041.

[8] LI Xuejin, LIU Ziyun, RAN Yalin, et al. Short-term high oxygen pre-stimulation inhibits browning of fresh-cut watercored Fuji apples[J]. Postharvest Biology and Technology, 2022, 191: 111959.

[9] HAN Qianyun, LIU Fang, LI Mo, et al. Comparison of biochemical properties of membrane-bound and soluble polyphenol oxidase from Granny Smith apple (*Malus*×*domestica* Borkh.)[J]. Food Chemistry, 2019, 289: 657−663.

[10] HAN Qianyun, LIU Fang, HAO Yanling, et al. Characterization of membrane-bound polyphenol oxidase from Granny Smith apple (*Malus*×*domestica* Borkh.)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 158: 977−984.

[11] LIU Fang, ZHAO Jinhong, GAN Zhilin, et al. Comparison of membrane-bound and soluble polyphenol oxidase in Fuji apple (*Malus domestica* Borkh. cv. Red Fuji)[J]. Food Chemistry, 2015, 173: 86−91.

[12] ZHA Zhuping, TANG Rui, WANG Chuang, et al. Riboflavin inhibits browning of fresh-cut apples by repressing phenolic metabolism and enhancing antioxidant system[J]. Postharvest Biology and Technology, 2022, 187: 111867.

[13] 陈桂, 李维, 张海洲, 等. 多酚氧化酶的提取及分离纯化研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(3): 330−332,337. [CHEN Gui, LI Wei, ZHANG Haizhou, et al. Progress in extraction and purification of polyphenol oxidase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(3): 330−332,337.]

[14] PANG Huiyun, JIA Yiming, ZHANG Zhi, et al. Mushroom polyphenol oxidase inactivation kinetics and structural changes during radiofrequency heating[J]. Food Bioscience, 2024, 62: 105136.

[15] PELLICER J A, NAVARRO P, GÓMEZ-LÓPEZ V M. Pulsed light inactivation of mushroom polyphenol oxidase: A fluorometric and spectrophotometric study[J]. Food and Bioprocess Technology, 2018, 11(3): 603−609.

[16] YU Kun, HE Wei, MA Xiaoli, et al. Purification and biochemical characterization of polyphenol oxidase extracted from wheat bran (Wan grano)[J]. Molecules, 2024, 29(6): 1334.

[17] BØJER RASMUSSEN C, ENGHILD J J, SCAVENIUS C. Identification of polyphenol oxidases in potato tuber (*Solanum tuberosum*) and purification and characterization of the major polyphenol oxidases[J]. Food Chemistry, 2021, 365: 130454.

[18] DERARDJA A E, PRETZLER M, BARKAT M, et al. Extraction, purification, and characterization of olive (*Olea europaea* L., cv. chemlal) polyphenol oxidase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(6): 3099−3112.

[19] BEAUCHAMP D L, KHAJEHPOUR M. Studying salt effects on protein stability using ribonuclease t1 as a model system[J]. Biophysical Chemistry, 2012, 161: 29−38.

[20] 王馨雨. 百合鳞茎多酚氧化酶的分离纯化及生化和结构性质研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2021. [WANG Xinyu. Isolation, purification, biochemical and structural properties of polyphenol oxidase from lily bulb(*Lilium lancifolium* Thunb)[D]. Changsha: Hunan University, 2021.]

[21] MARRUFO-HERNÁNDEZ N A, PALMA-OROZCO G, BELTRÁN H I, et al. Purification, partial biochemical characterization and inactivation of polyphenol oxidase from Mexican Golden Delicious apple (*Malus domestica*)[J]. Journal of Food Biochemistry, 2017, 41(3): e12356.

[22] LI Qingrong, LUO Jialing, ZHOU Zhonghua, et al. Simplified recovery of enzymes and nutrients in sweet potato wastewater and preparing health black tea and theaflavins with scrap tea[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 854−862.

[23] TAO Yiming, YAO Leyi, QIN Qiuyan, et al. Purification and characterization of polyphenol oxidase from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) bulbs[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(51): 12662−12669.

[24] KIM J J, KIM W Y. Purification and characterization of polyphenol oxidase from fresh ginseng[J]. Journal of Ginseng Research, 2013, 37(1): 117−123.

[25] 李镜浩, 梁展鸿, 肖更生, 等. 分子动力学模拟分析超高压对固液两态多酚氧化酶稳定性的影响[J]. 食品科学, 2024, 45(16): 33−44. [LI Jinghao, LIANG Zhanhong, XIAO Gengsheng, et al. Effect of ultra-high pressure on the stability of polyphenol oxidase in the solid and liquid states analyzed by molecular dynamics simulation[J]. Food Science, 2024, 45(16): 33−44.]

[26] 周亨乐. 基于计算机辅助技术对丽江雪桃多酚氧化酶抑制机理的研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2022. [ZHOU Hengle. Research on the mechanism of polyphenol oxidase inhibition in Lijiang snow peaches based on computer-aided technology[D]. Kun-

ming: Kunming University of Science and Technology, 2022.］

［27］ ZHOU Hengle, BIE Shenke, LI Zi, et al. Comparing the effect of HPP on the structure and stability of soluble and membrane-bound polyphenol oxidase from 'Lijiang snow' peach: Multispectroscopic and molecular dynamics simulation[J]. Foods, 2023, 12(9): 1820.

［28］ 刘芳. 苹果膜结合态多酚氧化酶分离纯化及性质研究[D]. 北京：中国农业大学, 2015.［LIU Fang. Purification and characters analysis of membrane-bound polyphenol oxidase from apples (*Malus domestica*)[D]. Beijing: China Agricultural University, 2015.］

［29］ WEN Yanbing, SUN Jing, JIA Hongxin, et al. Inactivation of polyphenol oxidase by low intensity DC field: Experiment and mechanism analysis via molecular dynamics simulation and molecular docking[J]. Food Research International, 2024, 188: 114325.

［30］ BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1−2): 248−254.

［31］ BENACEUR F, CHAIBI R, BERRABAH F, et al. Purification and characterization of latent polyphenol oxidase from truffles (*Terfezia arenaria*)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 145: 885−893.

［32］ GU Zhanghui, LAI Jiangli, HANG Jiahao, et al. Theoretical and experimental studies on the conformational changes of organic solvent-stable protease from *Bacillus sphaericus* DS11 in methanol/water mixtures[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 128: 603−609.

［33］ KAMPATSIKAS I, BIJELIC A, PRETZLER M, et al. A peptide-induced self-cleavage reaction initiates the activation of tyrosinase[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2019, 58(22): 7475−7479.

［34］ LAZARIDIS T. Structural determinants of transmembrane *β*-barrels[J]. Journal of Chemical Theory and Computation, 2005, 1(4): 716−722.

［35］ 刘芳, 韩倩云, 倪元颖. 膜结合态多酚氧化酶生物学信息分析[J]. 中国食品学报, 2019, 19(9): 237−244.［LIU Fang, HAN Qianyun, NI Yuanying. Bioinformatics information analysis of membrane-bound polyphenol oxidase[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(9): 237−244.］

［36］ MOHTASHAMI M, FOOLADI J, HADDAD-MASHADRIZEH A, et al. Molecular mechanism of enzyme tolerance against organic solvents: Insights from molecular dynamics simulation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 122: 914−923.

［37］ 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.