



美味牛肝菌 PPO 酶学特性及其抑制机理

资璐熙, 向仕聪, 徐柠檬, 李为兰, 秦 粉, 郭 磊

(西南林业大学 生命科学学院, 昆明 650224)

摘 要 以美味牛肝菌为原料,对 PPO 进行分离纯化后研究其酶学特性,在此基础上,采用动力学模型和 Lineweaver-Burk 作图法对 PPO 热失活动力学和抑制剂作用机理进行分析。结果表明:美味牛肝菌 PPO 酶促反应产物在 407 nm 处有最大吸收峰,与邻苯二酚亲和力最强,酶促反应动力学参数 $K_m = 9.41 \text{ mmol/L}$, $V_{\max} = 196.08 \text{ U/min}$,PPO 最适底物为 50 mmol/L 邻苯二酚,最适 pH 为 6.8,最适反应温度和时间分别为 45 °C、7 min。PPO 在 90 °C 下酶失活最快,其动力学参数为 $k = 2.5045 \text{ min}^{-1}$ 、 $D = 0.9420 \text{ min}$ 、 $T_{1/2} = 0.2768 \text{ min}$;70 °C~90 °C 下美味牛肝菌 PPO 失活活化能 $E_a = 130.283 \text{ kJ/mol}$ 。偏重亚硫酸钠的抑制类型属于非竞争性抑制,抗坏血酸和 L-半胱氨酸的抑制类型属于竞争性抑制。热处理和添加抑制剂能有效抑制 PPO 酶活力,研究结果为美味牛肝菌采收后储藏及加工过程中的品质控制提供了一定的参考依据。

关键词 美味牛肝菌;多酚氧化酶;酶学特性;分子对接;热失活;抑制剂机理

多酚氧化酶(polyphenol oxidase,PPO)是一类广泛分布于果蔬细胞内的铜结合金属蛋白酶,当细胞膜结构完整性遭到破坏后,PPO 与酚类底物接触,催化酚类物质氧化为邻醌,这些酚类底物最终被聚合成棕色色素,从而导致褐变或黑色化^[1]。在高温条件下,PPO 因 α -螺旋含量减少、二级结构改变以及 PPO 分子的折叠或展开导致其失去活性^[2]。另外,多个研究表明,添加偏重亚硫酸钠、柠檬酸、L-半胱氨酸、抗坏血酸能够有效抑制果蔬褐变的发生^[3-4]。

美味牛肝菌(*Boletus edulis* Bull.;Fr.)又名大脚菇,是中国一种重要的珍稀野生食用菌,其菌体肥厚,味道浓郁鲜美,菌香四溢。美味牛肝菌富含维生素、膳食纤维、人体必需氨基酸、不饱和脂肪酸和矿物质等多种营养物质。此外,大量的研究表明,美味牛肝菌含有的多种生物活性成分使其具有免疫调节、抗氧化、抗炎、抗疲劳以及对便秘的干预等诸多功能^[5-7]。云南是中国主要的野生菌产地,2022 年出口量高达 5 801.609 t,占全国出口总量 67.87%,出口额 4 564 万美元,出口或转口到全球多个国家和地区。然而采收后的美

味牛肝菌极易发生褐变、组织软化和营养物质流失等一系列的品质劣变现象,造成大量经济损失和资源浪费。而多酚氧化酶是造成美味牛肝菌色泽和品质下降的一个主要因素。

近年来,国内外关于果蔬中 PPO 酶学特性及其抑制作用的研究深入而广泛,如芋头^[3]、松露^[8]、双孢蘑菇^[9]、杨梅^[10],但关于美味牛肝菌 PPO 的研究还鲜有报道。为研究美味牛肝菌 PPO 的酶学特性及抑制机理,本研究以美味牛肝菌为原材料,将 PPO 粗提液进行硫酸铵分级沉淀、透析、DEAE-SFF 阴离子交换柱层析以及 Superdex G-75 凝胶柱层析后得到纯化 PPO,探究 PPO 的酶学特性,建立 PPO 酶的热失活模型,并对偏重亚硫酸钠、柠檬酸、L-半胱氨酸、抗坏血酸 4 种抑制剂的抑制剂效果和作用机理进行分析,为解决美味牛肝菌采收和加工储藏过程中的酶促褐变及品质调控具有重要的理论和现实意义。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 材料与试剂 美味牛肝菌:2023 年 8 月

收稿日期:2023-11-21 修回日期:2024-01-11

基金项目:云南省科技厅农业联合专项(202101BD070001-054);云南省科技厅基础研究计划(202101AT070042);国家自然科学基金(32260639)。

第一作者:资璐熙,女,硕士研究生,研究方向为食用菌保鲜。E-mail: 2858772123@qq.com

通信作者:郭 磊,男,博士,副教授,研究方向为食用菌保鲜。E-mail: guoleigift.student@sina.com

购于云南木水花野生菌市场。

交联聚乙烯吡咯烷酮(crosslinked polyvinylpyrrolidone, PVPP)(天津市光复精细化工研究所);聚乙二醇辛基苯基醚(Trion-100)、DEAE 琼脂糖凝胶 FF(DEAE-SFF)、葡聚糖凝胶 G-75(Superdex G-75)、L-半胱氨酸(上海源叶生物科技有限公司);抗坏血酸、无水磷酸氢二钠、无水磷酸二氢钠、L-半胱氨酸、硫酸铵、氯化钠、邻苯二酚、间苯二酚、焦性没食子酸、苯酚、柠檬酸、偏重亚硫酸钠、间苯三酚(阿达玛斯试剂有限公司),以上试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备 TGL-1850 高速冷冻离心机(四川署科仪器有限公司);Evolution 300 紫外-可见分光光度计(赛默飞世尔科技公司);HH-2 数显电子恒温水浴锅(金坛市丹瑞电器厂);雷磁 PHS-3C pH 计(上海仪电科学仪器有限公司);BSA224S 电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 PPO 粗酶液的提取与纯化 PPO 粗酶液的提取参照崔晓颖等^[3]的方法并略加修改。将 100 g 新鲜无虫害且大小均一的美味牛肝菌洗净,于 4 °C 下预冷 2 h 后,加预冷磷酸盐缓冲液 PBS(0.1 mol/L, pH 6.8, 含 2% PVPP、1% Trion-100 及 0.01% 抗坏血酸),料液比为 1 : 3,冰浴匀浆 3 min 后于 4 °C 下浸提 1 h,4 °C 下离心 15 min(10 000 r/min),上清液即为美味牛肝菌 PPO 粗酶液。

硫酸铵分级沉淀 在 PPO 粗酶液中缓慢加入硫酸铵粉末并使其饱和度分别达到 30%、40%、50%、60%、70%、80%,搅拌至硫酸铵粉末完全溶解后,于 4 °C 下沉淀 1 h 后离心(4 °C、10 000 r/min、15 min),收集各饱和度下的沉淀,以最少量的 PBS(0.1 mol/L, pH 6.8)复溶后用于后续试验。

透析 将复溶液装入透析袋中,先用纯水透析 3 次,每 3 h 换水,再用 PBS(0.1 mol/L, pH 6.8)进行 24 h 脱盐透析,透析温度均为 4 °C。

DEAE-SFF 阴离子交换柱层析 将 PPO 粗酶液以 0.5 mL/min 的流速上样,再用 1 mol/L NaCl 溶液洗脱,洗脱流速为 0.5 mL/min,收集 5 mL/管并测其 PPO 酶活力,合并酶活力高的酶液备用。

Superdex G-75 凝胶柱层析 取上一步所得

酶液以 0.5 mL/min 的流速上样,再以含 0.2 mol/L NaCl 的 PBS 缓冲液(0.1 mol/L, pH 6.8)洗脱,洗脱流速为 0.5 mL/min,每管收集 5 mL 并按顺序标记,测定每管收集液的 PPO 酶活力,将酶活力高的酶液合并后作为最终纯化的 PPO 酶液。

1.2.2 PPO 酶活性的测定 用 0.1 mol/L、pH 6.8 的 PBS 缓冲液配制 50 mmol/L 的邻苯二酚作为 PPO 反应底物溶液,取 2.7 mL 底物溶液和 0.3 mL 美味牛肝菌 PPO 酶液混合后,在 407 nm 波长下测定吸光值,以 3 mL 底物溶液为空白对照组。以每分钟每毫升反应混合液在 407 nm 波长处吸光度变化 0.001 为 1 个酶活力单位。以处理组中最高酶活力为 100% 计算相对酶活力。

1.2.3 美味牛肝菌 PPO 酶学特性 PPO 最大吸收波长的测定 以苯酚、邻苯二酚、间苯二酚、邻苯三酚、间苯三酚为反应底物,分别取 2.7 mL (50 mmol/L)底物溶液与 0.3 mL 美味牛肝菌 PPO 酶液反应后,在 300~600 nm 进行全波长扫描,将得到的最佳吸收波长用于后续试验。

最适反应底物筛选及其浓度测定 分别配制浓度为 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 mmol/L 的苯酚、邻苯二酚、间苯二酚、邻苯三酚、间苯三酚底物溶液,测定不同底物及不同浓度对美味牛肝菌 PPO 酶活性的影响。根据 Michaelis-Menten 方程和 Lineweaver-Burk 作图法计算出 V_{max} 和 K_m 。

$$V = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]} + [S] \quad (1)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2)$$

$$V_{max} = \frac{1}{b} \quad (3)$$

$$K_m = \frac{a}{b} \quad (4)$$

式中:V 为反应速率(U/min);[S]为底物浓度(mol/L); V_{max} 为最大反应速率(U/min); K_m 为米氏常数(mol/L)。

最适 pH 的测定 以 50 mmol/L 的邻苯二酚为底物溶液,调整反应体系 pH 为 5.8~8.0, pH 衡量单位为 0.2。待反应底物溶液 pH 稳定后,迅速在 2.7 mL 底物溶液中加入 0.3 mL 美味牛肝菌 PPO 酶液,于 407 nm 处测量吸光值,确定 PPO 最适反应 pH。

最适反应温度的测定 以 50 mmol/L、pH 6.8 的邻苯二酚为底物溶液,反应温度分别设置为 20 ℃、25 ℃、30 ℃、35 ℃、40 ℃、45 ℃、50 ℃、55 ℃、60 ℃,在 407 nm 测吸光值。

反应时间对 PPO 的影响 以 50 mmol/L、pH 6.8 的邻苯二酚为底物溶液,分别将美味牛肝菌 PPO 酶液及底物溶液置于 45 ℃ 下保温 3 min 后混匀,立即在 407 nm 下测定吸光值,每隔 30 s 测定一次吸光值,直至吸光值趋于稳定。

PPO 热稳定性及热失活分析 分别将 PPO 酶液置于 70 ℃、75 ℃、80 ℃、85 ℃、90 ℃ 下水浴保温,每隔 30 s 取样后,与 50 mmol/L、pH 6.8 的邻苯二酚底物溶液在水浴 45 ℃ 下反应 7 min,4 ℃ 冰浴下冷却后测定 407 nm 处的吸光值。

酶的热失活动力学数据分析用一级动力学模型来描述,其公式(5)如下:

$$\frac{A}{A_0} = \exp(-kt) \quad (5)$$

式中: A_0 为初始 PPO 的酶活力, A 为经过处理后 PPO 的酶活力, k 为失活速率常数(min^{-1})。

D 值为初始 PPO 酶活性降低 90% 所需要的时间,其公式(6)如下:

$$D = \frac{\ln(10)}{k} \quad (6)$$

活化能 E_a 表示酶失活速率对温度的敏感度,根据阿伦尼乌斯定律来确定 PPO 酶失活的活化能 E_a ,其公式(7)如下:

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{RT} \quad (7)$$

式中: k_0 为阿伦尼乌斯常数(min^{-1}); k 为失活速率常数 (min^{-1}); E_a 为酶失活活化能 (kJ/mol); R 为气体常数 $8.314 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$; T 为绝对常数(K)。

1.2.4 抑制剂对 PPO 活性的影响及抑制机理分析 分别取 1 mL 不同浓度的抗坏血酸、柠檬酸、焦亚硫酸钠、L-半胱氨酸溶液,与 2.7 mL 邻苯二酚(50 mmol/L、pH 6.8)和 0.3 mL PPO 提取液混合,45 ℃ 水浴反应 7 min 后在 407 nm 处测定吸光值,考察不同抑制剂对 PPO 的抑制效果。

以 50 mmol/L、pH 6.8 的邻苯二酚为底物,分析不同抑制剂(偏重亚硫酸钠、抗坏血酸、L-半胱氨酸)对美味牛肝菌 PPO 活性的影响来探究抑制剂的作用机理。反应体系为 2.7 mL 邻苯二酚(50 mmol/L、pH 6.8)、0.1 mL 抑制剂和 0.3

mL PPO,反应温度 45 ℃,反应时间 7 min,407 nm 下测定吸光值并计算酶活力。参照 Lineweaver-Burk 作图法分析其抑制机理,按照公式(3)、(4)计算 V_{max} 和 K_m 值。

1.2.5 试验数据处理与统计分析 所有试验均重复 3 次,利用 Excel 2019 和 IBM SPSS Statistics 25 统计软件对试验数据进行统计分析,使用 Origin 2021 软件和 CorelDraw 2022 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 美味牛肝菌 PPO 最大吸收波长的确定

如图 1 所示,纯化后美味牛肝菌 PPO 的最大吸收波长为 407 nm,而双孢蘑菇^[11]、姬松茸^[12]和白色金针菇^[13]的 PPO 最大吸收波长分别为 420 nm、475 nm 和 410 nm,不同食用菌中 PPO 最大吸收波长存在一定的差异性,一方面可能是因为在 PPO 酶液中存在同工酶,另一方面可能是不同植物中酚类物质的种类及含量存在差异,影响了 PPO 的底物特异性。因此,PPO 的最大吸收波长随植物来源而变。

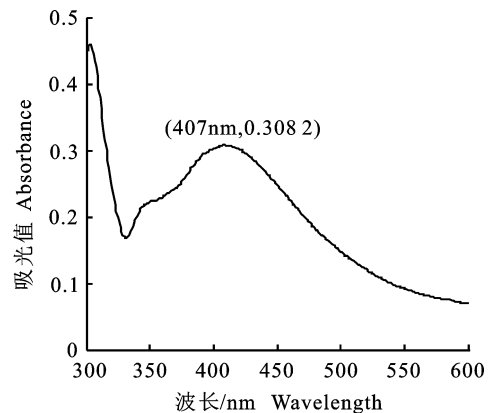


图 1 美味牛肝菌 PPO 与邻苯二酚反应产物的最大吸收波长

Fig. 1 Maximum absorption wavelength of PPO from *Boletus edulis* with catechol reaction products

2.2 PPO 底物的特异性

如图 2-a 所示,以邻苯二酚为底物反应时,美味牛肝菌 PPO 酶活力变化趋势最为显著。当邻苯二酚浓度在 10~30 mmol/L 时,随着底物浓度的增大,PPO 酶活力明显上升,当底物浓度高于 30 mmol/L 后,PPO 酶活力上升趋势缓慢,并在底物浓度为 50 mmol/L 时达到最大,为 166.03 U,继续增大底物浓度,PPO 酶活力不再增加,此时,PPO 与邻苯二酚结合达到饱和。另外,邻苯

三酚也能与 PPO 反应,但 PPO 酶活力低于邻苯二酚;以间苯二酚和间苯三酚为底物时,二者反应趋势基本一致,PPO 酶活力较低;苯酚与美味牛肝菌 PPO 的反应中,随着底物浓度的升高,PPO 酶活力变化很小,这可能是由于苯酚 OH 基的位置所致。因此,50 mmol/L 的邻苯二酚为美味牛肝菌 PPO 的最适底物。以邻苯二酚为底物,继续探讨美味牛肝菌 PPO 的酶促动力学,根据 Lineweaver-Burk 方程作图,得到线性回归方程 $y = 0.000\ 048x + 0.005\ 1$ ($R^2 = 0.991\ 2$),并计算得出米氏常数 $K_m = 9.41$ mmol/L,最大反应速率 $V_{max} = 196.08$ U/min。

2.3 最适 pH 的确定

pH 对美味牛肝菌 PPO 酶活力的影响如图 2-b 所示,PPO 相对酶活力在 pH 5.8~8.0 时呈现先增大后减小的趋势,最适 pH 为 6.8。在酸性条件下,PPO 的含辅助因子 Cu^{2+} 会被解离而使酶失活;而在碱性条件下, Cu^{2+} 能和溶液中的 OH 自由基发生反应并生成 $\text{Cu}(\text{OH})_2$,导致酶失活^[14],pH 可通过影响酶活性位点中质子基团的

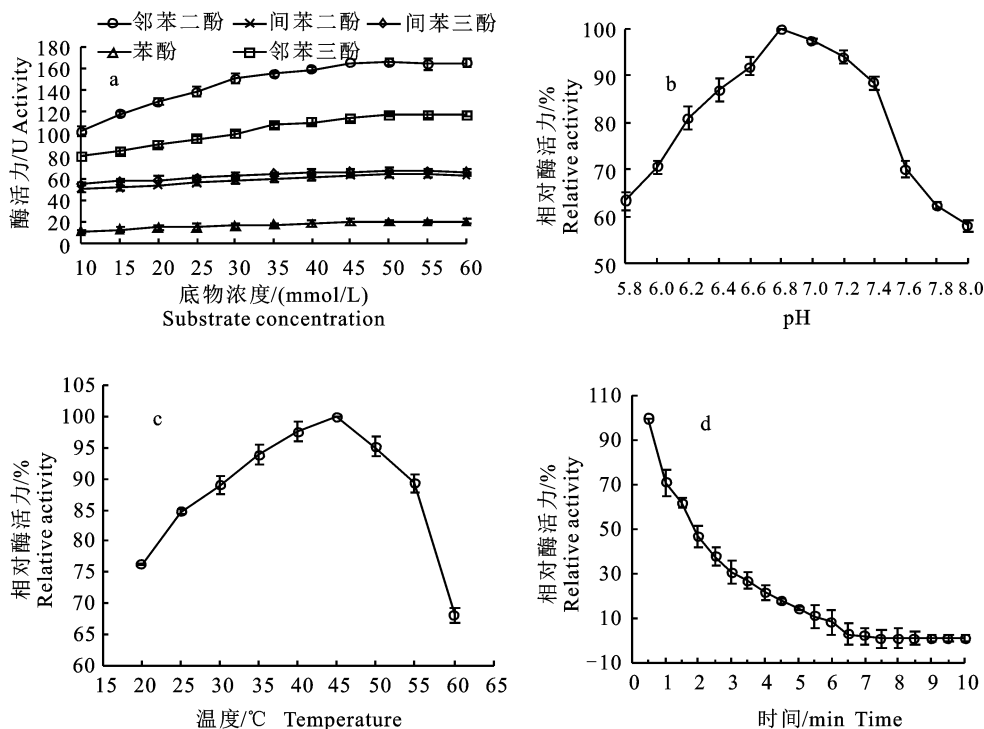
电离来影响酶活性^[15]。

2.4 最适反应温度的确定

如图 2-c 所示,美味牛肝菌 PPO 反应的最适温度为 45 °C。当温度为 20 °C~45 °C 时,PPO 相对酶活力随温度的升高而增大,低温下酶活性中心不易形成或暴露,同时,底物分子动能较低,随着温度的升高,底物分子动能增大,增加了有效反应分子数,使得 PPO 相对酶活力显著上升;继续升高反应温度,PPO 相对酶活力急剧下降,过高的温度破坏了 PPO 酶活性中心的稳定性,使蛋白质分子结构以及底物构象遭到破坏,造成 PPO 酶变性而失活。

2.5 反应时间对 PPO 活性的影响

由图 2-d 可知,将底物与 PPO 混匀后,两者迅速发生反应,尤其在反应后 2 min 内,相对酶活力变化量较高;随着时间的延长,相对酶活力变化量缓慢降低,直至反应时间为 7 min 后,相对酶活力变化量几乎为 0。因此,美味牛肝菌 PPO 的最适反应时间为 7 min。



a. 底物对美味牛肝菌 PPO 酶活力的影响; b. pH 对美味牛肝菌 PPO 酶活力的影响; c. 反应温度对美味牛肝菌 PPO 酶活力的影响; d. 反应时间对美味牛肝菌 PPO 酶活力的影响

a. Effect of substrate on enzymatic activity of PPO from *Boletus edulis*; b. Effect of pH on enzymatic activity of PPO from *Boletus edulis*; c. Effect of the temperature of the reaction on enzymatic activity of PPO from *Boletus edulis*; d. Effect of the temperature of the reaction on enzymatic activity of PPO from *Boletus edulis*

图 2 反应条件对美味牛肝菌 PPO 酶活力的影响

Fig. 2 Effect of reaction conditions on enzymatic activity of PPO from *Boletus edulis*

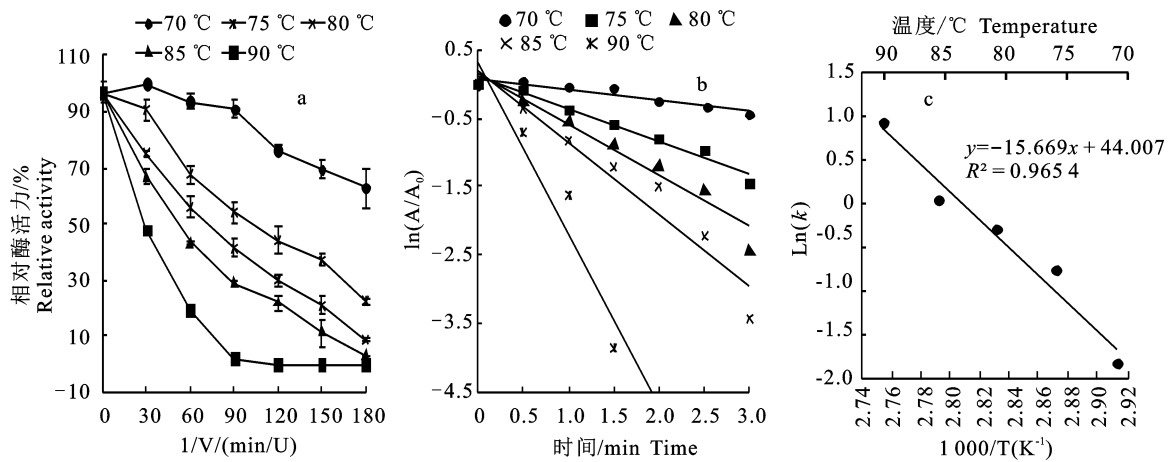
2.6 PPO 热稳定性分析及热失活模型的建立

图 3-a 显示,在升温过程中 PPO 均出现不同程度的失活。在 70 °C 时,PPO 相对酶活力在 30 s 内有较小的上升趋势,这可能是由于 70 °C 下处理 30 s 不足以造成酶的变性失活,反而起到激活酶活性的作用,但随着处理时间的延长,PPO 相对酶活力呈缓慢下降趋势;在 75 °C、80 °C 和 85 °C 下,PPO 相对酶活力变化趋势基本一致,PPO 相对酶活力随处理时间的延长而降低;而在 90 °C 高温下,相对酶活力在 90 s 内急剧下降,并降至为 0。

根据热稳定性结果,推测美味牛肝菌 PPO 热失活符合一级动力学模型,利用热处理时间与 $\ln(A/A_0)$ 作图,其结果如图 3-b 所示。在 70 °C、75 °C、80 °C、85 °C、90 °C 温度下,PPO 酶的热失活一级动力学方程相关系数(R^2)分别为 0.900 0、0.968 4、0.948 4、0.939 1 和 0.923 7,说明不同温度下热处理的美味牛肝菌 PPO 热失活曲线拟合良好,符合一级动力学模型,PPO 的热失活是温度和时间综合作用的结果。

美味牛肝菌 PPO 酶失活动力学参数如表 1 所示,随着热处理温度的逐渐升高,美味牛肝菌

PPO 酶的失活速率常数 k 逐渐增大,90 °C 条件下,PPO 酶的失活速率常数达到了 70 °C 条件下的 15.50 倍,说明美味牛肝菌 PPO 在高温下更敏感。 D 值和酶失活半衰期($T_{1/2}$)是常用的酶稳定性评价重要参数,75 °C 是 PPO 酶热失活的关键转折点,70 °C 下 D 值为 14.248 7 min,而在 75 °C 条件下 D 值显著降低,为 4.886 6 min,当温度升高至 90 °C 时, D 值仅为 0.919 4 min,PPO 酶失活效率显著提高。另外, $T_{1/2}$ 表示酶活力降低到初始酶活力一半所需要的时间,其变化趋势与 D 值相似,70 °C 条件下 $T_{1/2}$ 值为 4.289 3 min,而在 90 °C 下,仅为 0.276 8 min,时间缩短了 93.55%。将美味牛肝菌 PPO 热失活的 D 值和 $T_{1/2}$ 值与其他植物来源进行比较发现,双孢蘑菇在 70 °C 下热处理的 D 值和 $T_{1/2}$ 分别为 2.7 min 和 0.83 min,75 °C 下分别为 1.2 min 和 0.36 min^[16],表明美味牛肝菌 PPO 具有一定的热稳定性。根据阿伦尼乌斯定律对 $\ln k$ 和 $1/T$ 进行线性回归分析,结果如图 3-c 所示,Arrhenius 方程线性关系良好($R^2=0.965 4$),在 70 °C~90 °C 下美味牛肝菌 PPO 酶失活活化能 E_a 为 130.283 kJ/mol。



a. 美味牛肝菌 PPO 的热稳定性; b. 美味牛肝菌 PPO 失活的一级动力学模型; c. 美味牛肝菌 PPO 失活的阿伦尼乌斯图

a. Thermal stability of PPO from *Boletus edulis*; b. First-order kinetic model of enzymatic inactivation of PPO from *Boletus edulis*; c. The Arrhenius of enzyme inactivation of PPO from *Boletus edulis*

图 3 美味牛肝菌 PPO 的热稳定性及热失活动力学

Fig. 3 Thermal stability and thermal inactivation kinetics of PPO from *Boletus edulis*

2.7 抑制剂对 PPO 酶活性的抑制效果及抑制机理

如图 4-a 所示,4 种抑制剂均对美味牛肝菌 PPO 有一定的抑制作用,当抑制剂质量浓度为 0.1 mg/mL 时抑制效果明显,L-半胱氨酸抑制效果最好,PPO 相对酶活力仅为 11.51%,其次为偏

重亚硫酸钠和抗坏血酸,PPO 相对酶活力分别为 24.60% 和 27.78%,而柠檬酸的添加不能起到抑制美味牛肝菌 PPO 酶活力的作用。选择对美味牛肝菌 PPO 酶活力具有明显抑制效果的抑制剂偏重亚硫酸钠、抗坏血酸和 L-半胱氨酸继续进行

抑制机理探究。

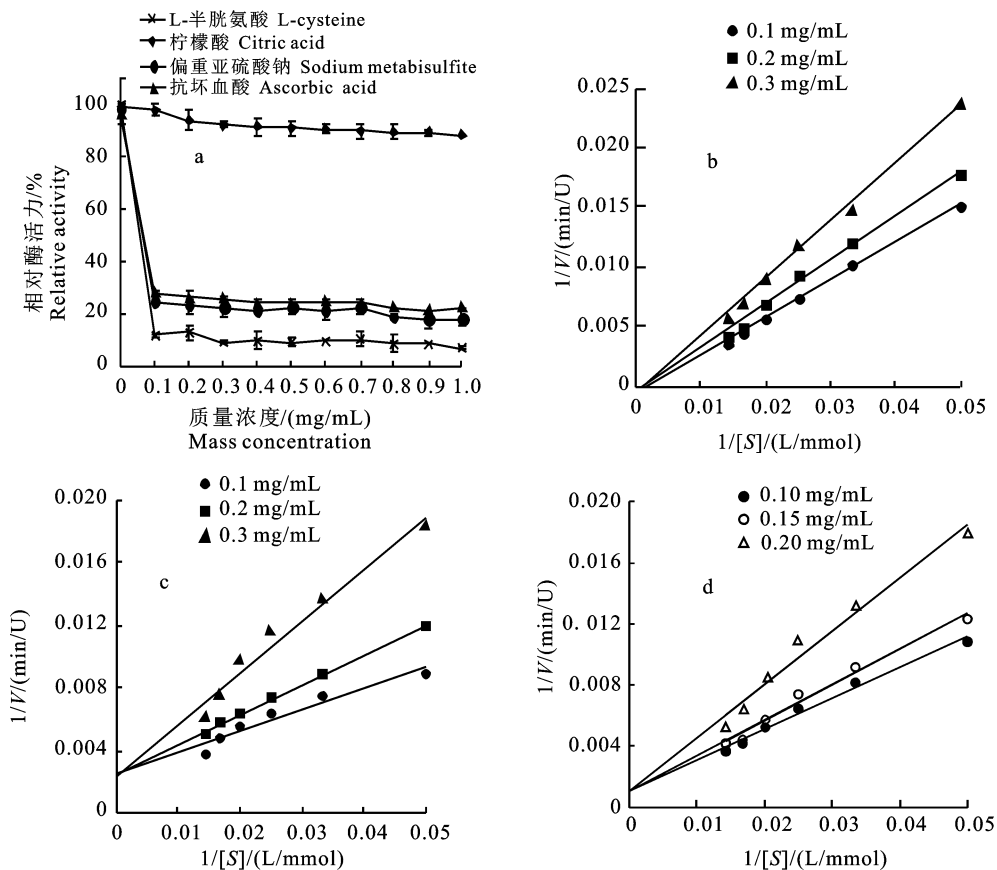
抑制剂会与酶分子上的某些必需基团反应,引起酶活力下降,甚至丧失,其作用方式取决于抑制剂种类和底物类型。抑制剂种类可分为竞争性抑制、非竞争性抑制、反竞争性抑制和混合性抑制,不同类型的抑制剂对酶促动力学有不同的影响^[17]。由图 4-b 和表 2 可知,随着偏重亚硫酸钠质量浓度的增加,其拟合直线的斜率逐渐增大,所得 3 条直线的交点位于 x 轴的正半轴上,酶促反应 K_m 值随抑制剂质量浓度的增大而增大, V_{max} 则随质量浓度的增大而减小,说明偏重亚硫酸钠的抑制机理为非竞争性抑制,偏重亚硫酸钠可能与酶或酶-底物复合物结合,最终形成酶-底物-抑制剂的复合物,使其催化活性降低。在非竞争性抑制中,抑制剂影响了酶的催化位点,使其失去催

化活性但又不影响其与底物的结合^[18]。由图 4-b、4-c 和表 2 可知,抗坏血酸和 L-半胱氨酸所得双倒数曲线均交于 y 轴正半轴上,2 种抑制剂拟合直线的斜率均随抑制剂质量浓度的增大而增大, K_m 值也表现为随抑制剂浓度的增大而增大,抗坏血酸和 L-半胱氨酸不会改变最大反应速率

表 1 美味牛肝菌 PPO 热失活动力学参数

Table 1 Kinetic parameters of thermal inactivation of PPO from *Boletus edulis*

| 温度/°C Temperature | k/min^{-1} | R^2 | D/min | $T_{1/2}/\text{min}$ |
|----------------------|---------------------|-------|----------------|----------------------|
| 70 | 0.161 6 | 0.900 | 14.248 7 | 4.289 3 |
| 75 | 0.471 2 | 0.968 | 4.886 6 | 1.471 0 |
| 80 | 0.746 0 | 0.948 | 3.086 6 | 0.929 2 |
| 85 | 1.047 7 | 0.939 | 2.197 8 | 0.661 6 |
| 90 | 2.504 5 | 0.924 | 0.919 4 | 0.276 8 |



a. 不同抑制剂对美味牛肝菌 PPO 酶活力的影响; b. 偏重亚硫酸钠对美味牛肝菌 PPO 抑制作用的 Lineweaver-Burk 曲线; c. 抗坏血酸对美味牛肝菌 PPO 抑制作用的 Lineweaver-Burk 曲线; d. L-半胱氨酸对美味牛肝菌 PPO 抑制作用的 Lineweaver-Burk 曲线

a. Effects of different inhibitors on the enzyme activity of PPO from *Boletus edulis*; b. Lineweaver-Burk curve with sodium metabisulfite inhibitory effect on PPO from *Boletus edulis*; c. Lineweaver-Burk curve with ascorbic acid inhibitory effect on PPO from *Boletus edulis*; d. Lineweaver-Burk curve with L-cysteine inhibitory effect on PPO from *Boletus edulis*

图 4 抑制剂对美味牛肝菌 PPO 酶活力的影响

Fig. 4 Effect of inhibitors on enzymatic activity of PPO from *Boletus edulis*

表 2 偏重亚硫酸钠作用下的酶促动力学参数

Table 2 Enzymatic kinetic parameters under action of sodium metabisulfite

| 抑制剂 Inhibitor | 质量浓度/(mg/mL) Mass concentration | K_m /(mmol/L) | V_{max} /(U/min) | R^2 |
|-----------------------------|------------------------------------|-----------------|--------------------|---------|
| 偏重亚硫酸钠 Sodium metabisulfite | 0.1 | 407.197 2 | 1 267.105 9 | 0.998 6 |
| | 0.2 | 436.329 2 | 1 147.842 1 | 0.992 2 |
| | 0.3 | 488.554 5 | 909.090 9 | 0.996 0 |
| 抗坏血酸 Ascorbic acid | 0.1 | 52.953 3 | 389.105 1 | 0.934 1 |
| | 0.2 | 73.501 9 | 389.105 1 | 0.997 3 |
| | 0.3 | 127.809 3 | 389.105 1 | 0.971 8 |
| L-半胱氨酸 L-cysteine | 0.1 | 188.841 1 | 934.579 4 | 0.985 4 |
| | 0.15 | 218.046 7 | 934.579 4 | 0.983 2 |
| | 0.2 | 325.196 3 | 934.579 4 | 0.972 6 |

V_{max} ,其值分别为 389.105 1、934.579 4 U/min。因此判断抗坏血酸和 L-半胱氨酸属于竞争性抑制,可与底物竞争 PPO 活性中心结合。抗坏血酸除了可以与 PPO 活性位点相互作用外,其作为还原剂,可将体系中生成的醌类物质及其衍生物还原成酚类物质,并降低体系中的含氧量^[19];L-半胱氨酸对 PPO 酶有直接抑制作用,可能是由于 L-半胱氨酸中的 SH 基团通过取代组氨酸残基与 PPO 活性中心的铜离子结合,另外,L-半胱氨酸能与醌类物质发生加成反应,生成无色稳定的化合物,从而阻止黑色素的形成^[20]。

3 讨论

作为“牛肝菌之王”的美味牛肝菌,高值化加工利用是未来的发展趋势,新鲜美味牛肝菌采收后极易发生酶促褐变,降低其营养价值和商业价值,在酶促褐变的控制中,降低 PPO 酶活力是一个重要措施。

3.1 底物对 PPO 酶活力的影响

PPO 酶活力受多种因素的影响,如底物种类和浓度、pH、反应温度及时间。在本研究中,美味牛肝菌 PPO 的最适底物为 50 mmol/L 邻苯二酚,Jhonatam 等^[21]的研究也表明李子 PPO 对邻苯二酚具有更高的亲和力,这与本试验结果是一致的;而在 Paul 等^[22]对葵花籽 PPO 的研究中,PPO 则对邻苯三酚具有更高的亲和力。植物 PPO 对不同酚类底物的酶活性不同,原因是底物的侧链、羟基的数量以及在苯环中的位置影响了与 PPO 的结合^[2]。

3.2 pH 对 PPO 酶活力的影响

在不同 pH 下 PPO 酶活力符合抛物线规律,

在最佳 pH 下酶活力最高,研究 PPO 在不同 pH 下的酶活力以控制其催化作用。美味牛肝菌 PPO 最适 pH 为 6.8,这与大多数研究结果是一致的。研究表明,大多数植物在中性 pH 附近具有最高的 PPO 酶活力,一般在 pH 4~8 时,碱性环境下酶活性较低。如史密斯苹果中 PPO 的最适 pH 为 7.0^[23],双孢蘑菇的最适 pH 为 6.8^[11],以及白玉菇的最适 pH 为 6.5^[24],而这些 PPO 的最适 pH 又存在差异,这可能与植物来源、底物的离子强度以及酶的纯度有关^[15]。

3.3 温度对 PPO 酶活力的影响

温度在 PPO 活性中也起着至关重要的作用,较高的温度会破坏 PPO 的三维结构,降低其催化活性,同时,受温度变化影响的溶解氧浓度也影响了酶促褐变的速率^[25]。不同植物 PPO 最适反应温度存在一定差异,这不仅与底物、物种以及同工酶的形式有关,还与其生长环境的温度有关^[14]。据报道,马铃薯 PPO 最适反应温度为 35 °C^[19],双孢菇最适反应温度为 20 °C^[26],而本研究中美味牛肝菌 PPO 最适温度为 45 °C,因此,美味牛肝菌 PPO 具有一定的耐热性,45 °C 才能有效激活 PPO 活性,可通过低温储藏来抑制美味牛肝菌的 PPO 活性,抑制美味牛肝菌的褐变。

热处理技术是一种常用的抑制 PPO 活力的物理方法,在高温作用下,PPO 分子的折叠或展开打乱其三级结构从而使酶失去活性。本研究中美味牛肝菌 PPO 在 90 °C 高温下 90 s 基本失活,何兴兴等^[11]的研究也发现,热处理后蘑菇 PPO 二级结构发生改变,当温度升高至 80 °C 会降低 β -螺旋含量,造成 PPO 酶天然结构的破坏。另外,Murtaza 等^[27]在苹果汁 PPO 的研究中也有类似

结果,在高温处理下,PPO 结构中出现 β -片段, β -螺旋含量减少,导致 PPO 的变性和失活。因此,热处理可能会因二级结构改变而造成 PPO 结构解体,活性位点的结构修饰和变形在 PPO 酶的失活和激活中起到了重要作用^[28]。在酶的失活过程中,酶可通过多种方式稳定底物的过渡态来降低反应的活化能,一般情况下,活化能的大小与目标耐热性呈正相关关系^[29]。本研究中 70 °C ~ 90 °C 下美味牛肝菌 PPO 酶失活活化能 E_a 为 130.283 kJ/mol,Rayan 等^[30]研究得出石榴 PPO 的热失活活化能为 112.97 kJ/mol,这与美味牛肝菌 PPO 差异较小;而 Xu 等^[31]的研究得出,草莓汁 PPO 失活活化能为 77.25 kJ/mol,同样温度下采用热超声处理,不同超声处理下 PPO 酶失活活化能分别降至 73.65、62.86 和 60.17 kJ/mol。PPO 酶失活活化能存在较大差异,原因可能是酶失活是一个多机制的变化过程,且每个反应机制都有其相应的温度,在温度效应大于时间效应阶段,失活过程需要更高的活化能;在时间效应大于温度效应阶段,蛋白质二、三级结构被破坏,更多的酶蛋白处于打开状态,酶失活需要的活化能较小^[32]。

3.4 抑制剂对 PPO 酶活力的影响

添加化学抑制剂可通过还原、螯合、络合和酸化等作用来达到抑制 PPO 酶活力的效果^[33]。本研究在对美味牛肝菌 PPO 酶活力的抑制中发现,偏重亚硫酸钠的抑制类型属于非竞争性抑制,抗坏血酸和 L-半胱氨酸的抑制类型属于竞争性抑制。崔晓颖等^[3]在抑制剂对芋头多酚氧化酶抑制作用的研究中得出,抗坏血酸和 L-半胱氨酸的抑制类型分别属于反竞争性抑制和竞争性抑制。

目前,抑制 PPO 酶促褐变的方法越来越多,但单一方法会存在一定的局限性,研究美味牛肝菌 PPO 的酶学特性,PPO 活性位点,热失活模型和抑制剂作用机理,可为 PPO 酶活力的抑制提供新思路,进而采用多技术协同化应用,进一步充分提高美味牛肝菌在加工和储藏中的品质。

4 结论

综合以上分析,在美味牛肝菌采后贮藏中可通过调节温度、喷淋与浸泡偏重亚硫酸钠、抗坏血酸、L-半胱氨酸抑制剂来进行保鲜,在加工过程中,还可通过调节 pH 来抑制酶促褐变,研究结果为美味牛肝菌的采收及加工储藏过程中的品质提

升提供了理论参考。

参考文献 Reference:

- [1] HE Y, YEO I K X, GUO C X, *et al.* Elucidating the inhibitory mechanism on polyphenol oxidase from mushroom and melanosis formation by slightly acid electrolysed water[J]. *Food Chemistry*, 2023, 404: 134580.
- [2] 王富海. 丽江雪桃中两种形态多酚氧化酶的酶学性质和钝化效果的研究[D]. 昆明:昆明理工大学, 2021.
- [3] 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.
- [4] ZHOU X Y, XIAO Y J, MENG X H, *et al.* Full inhibition of Whangkeumbae pear polyphenol oxidase enzymatic browning reaction by L-cysteine [J]. *Food Chemistry*, 2018, 266: 1-8.
- [5] JERZY F. Nutritional and other trace elements and their associations in raw king bolete mushrooms, *Boletus edulis* [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19(1): 417.
- [6] 王 彤, 姜 明, 郭慧阳. 美味牛肝菌药用价值及产品开发现状[J]. *中国食用菌*, 2021, 40(6): 1-5.
- [7] YU Q N, GUO M J, ZHANG B, *et al.* Analysis of nutritional composition in 23 kinds of edible fungi[J]. *Journal of Food Quality*, 2020, 1: 8821315.
- [8] 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.
- [9] OSCAR Y. B, BIBIANA N, MARCELA G, *et al.* Ohmic heating blanching of *Agaricus bisporus* mushroom: Effects on polyphenol oxidase inactivation kinetics, color, and texture[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2022, 80: 103105.
- [10] CAO X M, CAI C F, WANG Y L, *et al.* The inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in bayberry juice during thermal and ultrasound treatments[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2018, 45: 169-178.
- [11] 何兴兴, 雷 静, 关文强. 可溶态和膜结合态双孢蘑菇多酚氧化酶的分离纯化及酶特性分析[J]. *食品科学*, 2023, 44(10): 173-180.
- [12] ZHOU L, LIU W, ZOU L Q, *et al.* Aggregation and conformational change of mushroom (*Agaricus bisporus*) polyphenol oxidase subjected to thermal treatment [J]. *Food Chemistry*, 2017, 214: 423-431.
- [13] 郎 艳. 白色金针菇褐变的相关生理生化变化及酶褐变机理的研究[D]. 山西晋中:山西农业大学, 2014.
- [14] HUANG J, GAO X G, SU L L, *et al.* Purification, characterization and inactivation kinetics of polyphenol oxidase extracted from *Cistanche deserticola* [J]. *Planta*, 2023, 85: 257.
- [15] OLUTOSIN S I, OMOWUMI F A, DAVID A O, *et al.* Bi-

- ochemical properties of purified polyphenol oxidase from bitter leaf (*Vernonia amygdalina*) [J]. *Heliyon*, 2023, 9(6): e17365.
- [16] CHENG X F, ZHANG M, ADHIKARI B. The inactivation kinetics of polyphenol oxidase in mushroom (*Agaricus bisporus*) during thermal and thermosonic treatments [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2013, 20(2): 674-679.
- [17] FAN X T. Chemical inhibition of polyphenol oxidase and cut surface browning of fresh-cut apples [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 1: 2061413.
- [18] DOGAN S, TURAN P, DOGAN M, et al. Inhibition kinetics of polyphenol oxidase by glutamic acid [J]. *European Food Research and Technology*, 2007, 225: 67-73.
- [19] RASMUSSEN C B, 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(15): 130454.
- [20] JIA S, JIANG S, CHEN Y, et al. Comparison of inhibitory effects of cinnamic acid, β -cyclodextrin, L-cysteine, and ascorbic acid on soluble and membrane-bound polyphenol oxidase in peach fruit [J]. *Foods*, 2023, 12(1): 167.
- [21] JHONATAM O C, ORLANDA J F F. Heat stability and effect of pH on enzyme activity of polyphenol oxidase in buriti (*Mauritia flexuosa* Linnaeus f.) fruit extract [J]. *Food Chemistry*, 2017, 233: 159-163.
- [22] PAUL B, GOWDA L R. Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of field bean (*Dolichos lablab*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(9): 3839-3846.
- [23] HAN Q Y, LIU F, LI M, et al. Comparison of biochemical properties of membrane-bound and soluble polyphenol oxidase from Granny Smith apple (*Malus \times domestica* Borkh.) [J]. *Food Chemistry*, 2019, 289: 657-663.
- [24] 周春梅, 王欣, 王俊城, 等. 白玉菇多酚氧化酶的酶学特性 [J]. *食品与发酵工业*, 2010, 36(5): 5-8.
- [25] ZHANG S. Recent advances of polyphenol oxidases in plants [J]. *Molecules*, 2023, 28(5): 2158.
- [26] 王建. 双孢蘑菇 PPO 的提取、纯化及特性测定 [D]. 山东淄博: 山东理工大学; 2011.
- [27] MURTAZA Z, MUHAMMAD Z, IQBAL A, et al. Aggregation and conformational changes in native and thermally treated polyphenol oxidase from apple juice (*Malus domestica*) [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2018, 6: 1-10.
- [28] IQBAL A, MURTAZA A, HU W F, et al. Activation and inactivation mechanisms of polyphenol oxidase during thermal and non-thermal methods of food processing [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2019, 117: 170-182.
- [29] ZAWAWI N A F, HAZMI N A M, HOW M S, et al. Thermal, high pressure, and ultrasound inactivation of various fruit cultivars' polyphenol oxidase: kinetic inactivation models and estimation of treatment energy requirement [J]. *Applied Sciences*, 2022, 12(4): 1864.
- [30] RAYAN A, MORSY N. Thermal inactivation kinetics of peroxidase and polyphenol oxidase from pomegranate arils (*Punica granatum* L. cv. Wonderful) [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2020, 44(10): e13428.
- [31] XU B G, CHEN J N, AZAM S M R, et al. Flat dual-frequency sweeping ultrasound enhances the inactivation of polyphenol oxidase in strawberry juice [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2022, 16: 762-771.
- [32] 贺利锋, 王金鹏, 于博, 等. 蔬菜品质相关酶高温瞬时失活动力学 [J]. *农业工程学报*, 2009, 25(9): 339-344.
- [33] XU S, ZAN M, DONG T T, et al. Enzymatic browning and polyphenol oxidase control strategies [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2023, 81: 102921.

Enzymatic Characteristics and Inhibition Mechanism of PPO from *Boletus edulis*

ZI Luxi, XIANG Shicong, XU Ningmeng, LI Weilan, QIN Fen and GUO Lei

(School of Life Science, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract To investigate enzymatic characteristics of PPO, PPO from *Boletus edulis* was isolated and purified. Based on this study, the thermal inactivation kinetics and inhibition mechanism of PPO were analyzed using kinetic models and Lineweaver-Burk plot methods. The results showed that the enzymatic reaction product of PPO from *Boletus edulis* had the maximum absorption wavelength at 407 nm, PPO and catechol had the strongest affinity, and the kinetic parameters of the enzymatic reaction were $K_m = 9.41$ mmol/L, $V_{max} = 196.08$ U/min. The optimal substrate of PPO was 50 mmol/L catechol, the optimum pH was 6.8, the optimal reaction temperature and time were 45 °C and 7 min, respectively. The PPO enzyme inactivation was fastest at 90 °C, and the kinetic parameters were $k = 2.5045$ min⁻¹, $D = 0.9420$ min, $T_{1/2} = 0.2768$ min. The activation energy (E_a) for PPO inactivation between 70 °C to 90 °C was 130.283 kJ/mol. Sodium metabisulfite showed noncompetitive inhibition, while ascorbic acid and L-cysteine showed competitive inhibition. PPO activity can be effectively inhibited by heat treatment and the addition of inhibitors. These findings provide a reference for the quality control of *Boletus edulis* during postharvest storage and processing.

Key words *Boletus edulis*; Polyphenol oxidase (PPO); Enzymatic characteristics; Molecular docking; Thermal inactivation; Inhibitor mechanism

Received 2023-11-21

Returned 2024-01-11

Foundation item Joint Special Project for Agricultural of Yunnan Provincial Science and Technology Department (No. 202101BD070001-054); the Basic Research Project of Yunnan Provincial Department of Science and Technology (No. 202101AT070042); the National Natural Science Foundation of China (No. 32260639).

First author ZI Luxi, female, master student. Research area: preservation of edible mushrooms. E-mail: 2858772123@qq.com

Corresponding author GUO Lei, male, Ph. D, associate professor. Research area: preservation of edible mushrooms. E-mail: guoleigift.student@sina.com

(责任编辑:潘学燕 Responsible editor: PAN Xueyan)