

芒果中褐变相关酶的酶学性质及结构表征

胡婉峰 刘思宇 黄行健 单小飞 徐晓云 潘思轶 彭帮柱

华中农业大学食品科学技术学院/环境食品学教育部重点实验室, 武汉 430070

摘要 以芒果皮中的褐变相关酶为研究对象, 研究纯化后的芒果褐变相关酶的酶学性质及结构。试验采用榨汁、离心、抽滤、浓缩等方法, 从芒果皮中提取出粗蛋白, 经层析柱纯化, 得到纯度较高的 2 种同工酶 P1 和 P2。以邻苯二酚为底物, 采用分光光度法在 420 nm 下测定芒果皮中褐变相关酶的活性, 其中 P1 的最适温度为 55 ℃, 最适 pH 值为 7.0, 最适底物为邻苯二酚, 该酶的分子质量约为 100 ku。P2 活性极低。圆二色谱结果表明, 2 种酶分别含有 32.1% 和 19.2% 的 α -螺旋以及 43.4% 和 80.8% 的 β -折叠。荧光光谱结果表明, P1 最大发射波长在 358.4 nm 处, 相对荧光强度为 207.9。P2 最大发射波长在 356 nm 处, 相对荧光强度为 164.2, 两者的荧光基团均处于亲水环境中。2 种酶的粒径分布均较为集中, 粒径分别在 11.696 nm 与 8.721 nm 处, 强度最大, 分别达到 29.686% 与 25.369%。

关键词 芒果; 褐变相关酶; 酶促褐变; 酶学性质; 结构表征

中图分类号 TS 225.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)04-0106-07

芒果属漆树科芒果属, 常绿乔木, 素有“热带水果之王”的美称^[1]。芒果加工中, 果肉和果汁的色泽是衡量加工品质好坏的重要指标^[2-4]。引起果蔬酶促褐变的酶主要包括多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 和过氧化物酶 (peroxidase, POD) 等, 也有文献报道一些病程相关蛋白, 如类朊蛋白等也具有多酚氧化酶活性^[5]。多酚氧化酶属于氧化还原酶类, 催化果蔬原料中的内源性多酚物质氧化生成醌类化合物, 醌类化合物再经历一系列聚合反应产生黑色素, 严重影响制品的营养、风味及外观品质^[6-8]。在正常发育的植物组织中, 由于多酚类物质分布在细胞液泡内, 而大多数 PPO 定位于类囊体腔, 因此, 即使它们与氧同时存在也不会发生褐变。当植物体受到机械损伤, 植物的亚细胞结构被破坏, 从类囊体中释放的 PPO 与液泡中释放的酚类物质接触, 从而发生褐变反应^[9]。在加工过程中细胞壁的破碎以及在贮藏过程中细胞膜通透性的提高都会造成酶和底物之间的相互接触, 从而引起芒果的褐变。褐变一直是制约芒果深加工的关键因素, 因此, 控制芒果在加工、储藏过程中的酶促褐变, 提高芒果及其加工制

品的营养价值和外观品质是人们长期关注的问题^[10]。目前文献对芒果褐变相关酶的研究一般停留在性质层面, 且缺少对纯酶和同工酶的研究, 同时, 对于结构的研究尚属空白^[11-12]。本研究通过柱层析法纯化出芒果皮中 2 种引起褐变的同工酶, 采用分光光度计法, 考察 2 种同工酶的基本酶学性质, 并采用圆二色谱法、荧光光谱法、动态光散射法对其结构进行初步表征, 以探明褐变机理, 为芒果在加工贮藏过程中的褐变控制提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与设备

1) 材料。台农芒果购于农贸市场。磷酸氢二钠、硫酸铵、邻苯二酚、邻苯三酚、考马斯亮蓝 R250、甘氨酸和 TEMED, 国药集团化学试剂有限公司; 交联聚乙烯吡咯烷酮, 美国国际特品公司; 丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺和过硫酸铵, 武汉谷歌生物科技有限公司; 二硫苏糖醇 (DTT)、SDS、Tris, 上海源叶生物科技有限公司; 电泳分子量 Marker、DE-AE-Sephadex-Fast flow 和 Sephacryl S200, GE-

收稿日期: 2016-02-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31401507)

胡婉峰, 博士, 讲师. 研究方向: 食品贮藏及加工. E-mail: wanfenghu@mail.hzau.edu.cn

通信作者: 彭帮柱, 博士, 副教授. 研究方向: 果蔬贮藏及加工. E-mail: bzpeng@mail.hzau.edu.cn

Healthcare Amersham 公司。

2)设备。5804 R 离心分离机,德国 Eppendorf 公司;DYY-6C 型电泳仪电源,北京市六一仪器厂;Mini-PROTEAN4 型电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;HD-5 电脑紫外检测仪,上海青浦沪西仪器厂;BS-100A 自助部分收集器,上海青浦沪西仪器厂;85-2 型恒温磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限责任公司;HL-2S 恒流泵,上海沪西分析仪器厂有限公司;Nano-ZS 型动态散射光谱仪,马尔文仪器公司;F-4600 型荧光分光光度计,日本日立公司;J-1500 型 CD 光谱仪,日本 JASCO 仪器公司。

1.2 褐变相关蛋白的提取、分级及纯化

配制 0.5 mol/L、pH 7.0 的 Tris-HCl 提取缓冲液(含 20% 的 PVPP),称取适量芒果,按照料液体积比为 1:2 的比例混合榨汁,汁渣混合物于 4 °C 浸泡过夜。浸提液经过汁渣分离后,汁在 4 000 r/min、4 °C 下离心 15 min,取上清液,量取其体积,添加一定量(0.561 mL)的硫酸铵(饱和度 80%),静置 1~2 h,再次离心,取沉淀于提取缓冲液中复溶,并透析,用超滤器进行浓缩。经硫酸铵沉淀后透析的粗蛋白质溶液,加样于经 0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)平衡的 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱(2.6 cm×40 cm),采用 1 mol/L NaCl、pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液进行梯度洗脱,收集有活性的组分并浓缩,浓缩后的蛋白质溶液,加样于经 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)平衡的 Sephacryl S200 凝胶柱进行分子筛层析分离。以 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱,洗脱流速为 0.3 mL/min,收集活性组分,浓缩后备用,绘制 PPO 活性峰。

1.3 Native-PAGE 和 SDS-PAGE 电泳

分别取 30% 丙烯酰胺 5 mL、1 mol/L pH 为 8.8 的 Tris-HCl 2.5 mL、双蒸水 2.3 mL、10% SDS 100 μ L、10% 过硫酸铵 100 μ L 加 TEMED 5 μ L 配制为 15% 的分离胶。然后分别取 30% 的丙烯酰胺 1 mL、1.0 mol/L pH 为 6.8 的 Tris-HCl 1 mL、10% 的 SDS 溶液 80 μ L、10% 的过硫酸铵溶液(现用现配)60 μ L、加 TEMED 8 μ L 配制为 5% 的浓缩胶。配制 pH 为 8.3 的电极缓冲液(Tris 3.03 g、甘氨酸 14.42 g、SDS 1.0 g,定容至 100 mL,稀释 10 倍使用)。

SDS-PAGE:浓缩胶和分离胶质量分数分别为 5% 和 15%。样品的上样量为 20 μ L,在沸水中煮

5 min 后上样。变性 Marker 为 10 μ L。电流设定为恒流 15 mA。电泳完毕后,将凝胶于染色液(考马斯亮蓝 R250 1.0 g、甲醇 450 mL、冰醋酸 100 mL,定容至 600 mL)中染色 1 h,用脱色液(冰醋酸 100 mL、甲醇 250 mL,定容至 1 000 mL)脱色 10 h 至电泳带清晰,背景脱色干净后用凝胶成像系统成像,并进行数据采集及分析。

Native-PAGE:浓缩胶和分离胶质量分数分别为 5% 和 15%。样品的上样量为 20 μ L,非变性 Marker 为 10 μ L。电流设定为恒流 15 mA。电泳完毕后,分别采用邻苯二酚和考马斯亮蓝溶液染色,用凝胶成像系统成像。

1.4 褐变相关酶的酶学性质测定

1)浓度测定。采用 Bradford 法进行蛋白含量测定^[13]。

2)活性测定。可通过反应液的吸光值对时间的斜率计算出酶的活性^[14]。反应体系组成如下:缓冲液 pH 值为 7.0,浓度为 0.1 mol/L 邻苯二酚底物溶液 2.5 mL,酶液为 0.5 mL。在 420 nm 下测定反应液在 1 min 内吸光值的变化。一个活力单位(U)定义为在测定条件下 1 min 引起吸光值改变 0.001 所需的酶量^[5]。

3)最适底物的测定。配制浓度分别为 0.04、0.05、0.06、0.07、0.08 mol/L 的邻苯二酚和邻苯三酚溶液。分别将 0.5 mL 样品蛋白洗脱液和 2.5 mL 的底物溶液混合,分别测定不同底物在不同浓度下,不同底物与样品蛋白质的反应速率。测定 PPO 活性,计算每种底物反应的米氏常数 K_m 和最大反应速率 v_{max} 。根据米氏常数 K_m 可以得出蛋白质的最适作用底物。根据不同的底物浓度[S]对应的反应速度 v ,求出两者的倒数,参照 Lineweaver-Burk 作图法。以 $1/v$ 为纵坐标, $1/[S]$ 为横坐标,绘出的直线,外推至与坐标轴相交,纵坐标值即为 $1/v_{max}$,横截距即为 $1/K_m$,即 $K_m = -1/x$ ^[15]。

4)最适 pH 值测定。配制 0.1 mol/L 的柠檬酸缓冲溶液(pH 分别为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0),0.1 mol/L 的磷酸缓冲溶液(pH 分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5),0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液(pH 分别为 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)。取 0.3 mL 蛋白溶液样品,加入 0.3 mL 的 1 mol/L 的邻苯二酚溶液和 2.4 mL 不同 pH 的缓冲液进行混合,在 420 nm 下测定该混合溶液的吸光值,测定在不同 pH 条件下 PPO

的活性。

5) 最适温度测定。调节水浴锅的温度分别为 25、35、45、55、65、75、85 °C。根据得到的最适 pH 值为 7.0, 采用该 pH 值下相对应的缓冲液配制浓度为 1.0 mol/L 的邻苯二酚溶液。底物缓冲液在未添加底物之前, 先在各设定温度下预热 15 min, 取 2.2 mL 该加热的底物缓冲液于比色皿中, 然后快速加入 1.0 mol/L 的邻苯二酚溶液 0.3 mL, 使底物浓度稀释为 0.1 mol/L。迅速加入 0.5 mL 的样品蛋白质溶液, 分别测定蛋白质的最适反应温度, 测定 PPO 活性。

1.5 褐变相关蛋白的结构表征

1) 圆二色谱的测定^[16]。打开氮气, 让浮悬汞球的中心在 5 以内, 通氮气 5 min, 设置参数如下: 光栅扫描速度为 120 nm/min, 时间常数为 2 s, 带宽为 1 nm, 扫描范围 190 ~ 240 nm。在样品池内装上 2/3 的空白样液, 并在样品池中加入样品。所有试验在光电倍增管电压的线性范围内进行。每条谱线采集 3 遍, 试验中使用同 1 个样品池, 即 0.009 cm 光程的石英可拆样品池。数据采用圆二色谱仪自带的 YANG-US 分析酶的二级结构含量。

2) 粒径的测定。开启 Nano ZS 仪器, 等待 30 min 以稳定激光。启动 Zetasizer Nano 软件, 设置样品参数, 散射光为波长 532 nm 的激光, 激光反射角为 15°, 测定 0.023 mg/mL 蛋白溶液的粒度, 每组

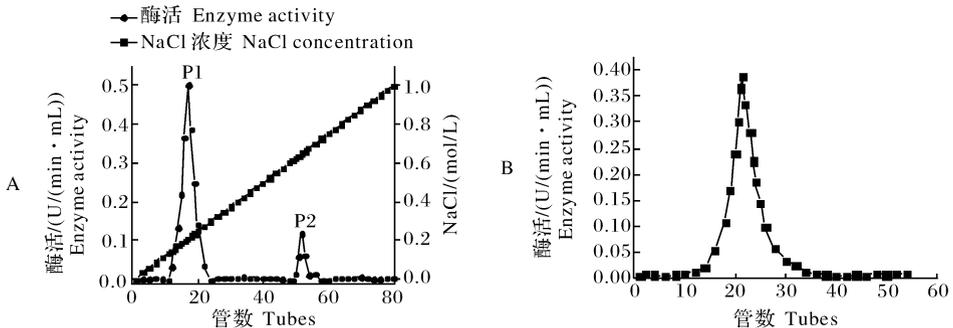
测量重复 3 次。

3) 荧光光谱的测定。配制质量浓度为 0.1 mg/mL 的蛋白质溶液, 进行荧光测定, 测定时 2 种酶分别先在 441.2、439.6 nm 发射波长下扫描得到其最大激发波长, 然后用最大激发波长对蛋白质进行扫描得到各发射光谱。激发光谱的操作条件为: 扫描范围为 200 ~ 600 nm, 扫描速度为 240 nm/min, 激发狭缝和发射狭缝宽均为 5.0 nm, 响应时间 0.1 s, 记录数据波长间隔为 0.2 nm, PMT 电压为 400 V^[17]。

2 结果与分析

2.1 褐变相关蛋白的纯化结果

经 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析柱与经 Sephacryl S200 凝胶柱的层析图谱结果如图 1 所示。采用 1 mol/L NaCl 的平衡缓冲液在梯度洗脱过程中主要出现 2 个酶活峰(图 1A), 其中第 1 个酶活峰 P1 较高, 第 2 个酶活峰 P2 较低, 说明存在 2 种褐变相关的同工酶。将上述 2 个活性峰收集后, 再分别用 Sephacryl S200 柱进行层析分离, 所得的洗脱曲线如图 1B 凝胶柱洗脱曲线。Sephacryl S200 柱为分子筛式的纯化柱, 能将蛋白质按照分子质量大小不同进行洗脱。P1 经洗脱后得到 1 个活性峰(图 1B), P2 经洗脱后没有得到显著峰, 说明该蛋白有活性但含量和活性均较低。



A: 阴离子交换层析 DEAE Sepharose Fast Flow; B: Sephacryl S200 柱层析 Sephacryl S200

图 1 蛋白质洗脱曲线

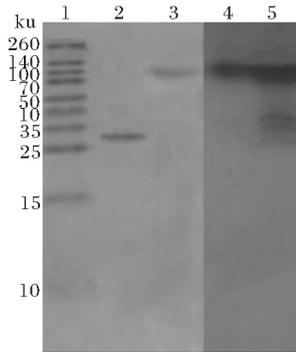
Fig.1 Protein elution profiles

2.2 SDS-PAGE 和 Native-PAGE 电泳结果

P1 和 P2 经浓缩后, 其电泳图谱结果如图 2 所示。因为 P2 活性和浓度均较低, 且其考马斯亮蓝染色和底物染色均未出现明显条带, 因此, 图 2 主要

为 P1 的电泳图谱。P1 在 Native-PAGE 电泳胶上呈现单一的蛋白条带(泳道 3), 经电泳迁移率比对待得知, 该酶可能为 1 个三聚体, 其分子质量约为 93 ku, 可能含有 3 个相同的亚基, 分子质量约为 31

ku。泳道 4 中, P1 经邻苯二酚染色, 呈现单一条带, 且条带位置和泳道 3 中的位置相同, 可确定 P1 为目标褐变相关酶。粗酶中的底物染色条带(泳道 5) 显示出 1 个分子质量较高的粗条带和 3 个分子质量极为接近的细条带, 这 3 个细条带可能为 P2 同工酶, 从图 2 中可以看出, P2 同工酶的蛋白含量较低, 且酶活性也较低, 表现为色带较浅。在后续纯化的过程中, 因 P2 含量和活性均较低, 因此, 很难大量富集, 且无法完全将 P2 进一步纯化。P1 亚基的分子质量比蛇果(38 ku)^[18]、茄子(58 ku)^[19]更低。



1: 标准蛋白分子质量 Marker SDS-Marker; 2: SDS-PAGE; 3: Native-PAGE; 4: 纯化蛋白的底物染色的条带 Purified protein stained by pyrogallol; 5: 粗蛋白的底物染色条带 Crude extract stained by pyrogallol.

图 2 褐变相关酶的电泳图谱

Fig.2 Electrophoresis patterns of browning-related enzyme

2.3 褐变相关酶的酶学性质

1) 最适底物分析。根据不同底物在不同浓度下对酶吸光值变化, 计算出不同条件下酶的反应速率。由图 3 可知, 无论是邻苯二酚, 抑或为邻苯三酚, 酶促反应速率与底物浓度都呈一定的正比关系。由 Lineweaver-Burk 方程 $1/v = K_m/v_{max} (1/S) + 1/v_{max}$, 以 $1/v$ 为纵坐标、 $1/S$ 为横坐标作图(图 4), 求得 K_m (邻苯二酚) = 10.32 mmol/L, K_m (邻苯三酚) = 89.91 mmol/L, 其中拟合直线分别为 $y = 0.30646x + 29.6720$ (邻苯二酚) 和 $y = 1.03873x + 18.4608$ (邻苯三酚)。 K_m 值反映酶与底物的亲和力, 说明达到反应速度一半时所需底物浓度, K_m 值越小, 酶对底物的亲和力就越大, 邻苯二酚的 K_m 值比邻苯三酚小, 说明邻苯二酚与酶的亲和力更大, 因此, 邻苯二酚为褐变相关酶的最适底物。

2) 最适反应 pH 值。为避免不同缓冲体系对蛋白质活性造成影响, 本试验中 3 组缓冲体系的 pH 值两两覆盖, 以保证测出的 PPO 活性不受缓冲体系

的干扰。PPO 在不同缓冲液、不同 pH 条件下的酶活性值测定结果如图 5 所示。由图 5 可知, P1 的最适 pH 值为 7.0, 增大或减小反应体系的 pH 值时, 芒果皮中的 P1 活性随之下降, 这说明过酸或过碱的环境会造成酶活的损失。大多数 PPO 的最适作用 pH 都在弱酸性或中性环境。PPO 通常为酸性蛋白质, 其等电点在较低 pH 值处, 因此, 在酸性环境下, PPO 处于等电点附近, 容易发生沉淀, 从而失

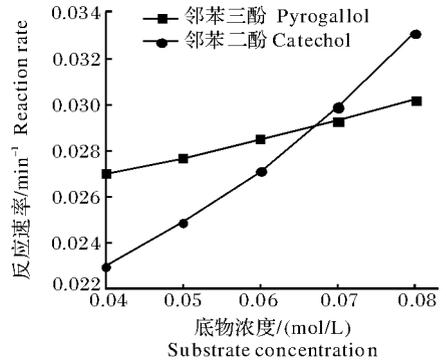


图 3 不同底物浓度与褐变相关酶活性的关系

Fig.3 Different substrate concentrations relationship with enzyme activity

■ $y = 0.30646x + 29.6720$ 邻苯二酚 Catechol
● $y = 1.03873x + 18.4608$ 邻苯三酚 Pyrogallol

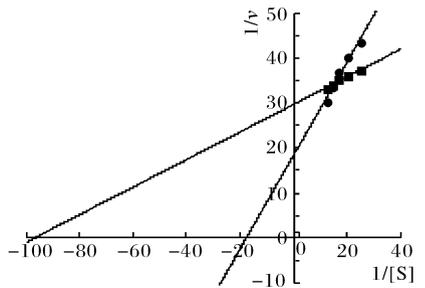


图 4 米氏常数的测定

Fig.4 Determination of the K_m

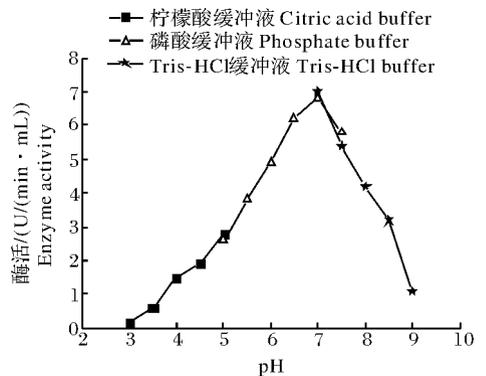


图 5 不同 pH 值下酶的反应活性

Fig.5 PPO activity at different pH value

去活性。在碱性环境中,底物容易快速发生自氧化,不利于 PPO 发挥氧化作用。

3)最适反应温度。样品分别在不同温度下处理 15 min,测定褐变相关酶活性值如图 6 所示。由图 6 可见,芒果皮中 P1 的最适温度为 55 ℃。在 45~65 ℃时 P1 具有较高的活性,当温度达到 85 ℃后,芒果 P1 活性很低。由此可见,温度对多酚氧化酶活性具有双重影响,在适宜的高温下,温度升高有利于 P1 优势催化构象的形成,能加快酶催化反应速度;然而,过高的温度会促使酶蛋白变性,因此,温度对 P1 的影响是以上 2 种反应的共同作用结果。

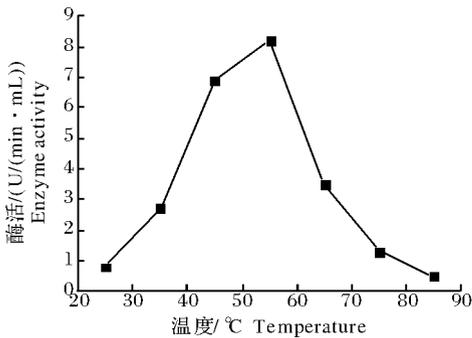


图 6 不同温度下酶的反应活性

Fig.6 PPO activity at different temperature

2.4 褐变相关蛋白的结构表征

1)圆二色谱分析。用 pH 为 7 的 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液与 0.062 mg/mL 蛋白质样品混合,以不含蛋白质的缓冲液作为空白对照。PPO 圆二色谱图结果如图 7 所示。P1 和 P2 分别在 197 nm 和 199 nm 处出现圆二色峰,P2 的峰值更高;P1 在 214 nm 处出现负的圆二色峰,而 P2 的负峰出现在 216 nm 处,有类似典型的 α -螺旋的双凹槽图形。根据 Young 式算法,得出二级结构含量。相比于 P1,P2 的 β -折叠含量更高,为 80.8%; α -螺旋的含量相对较少,为 19.2%。但 P1 的 α -螺旋含量(32.1%)

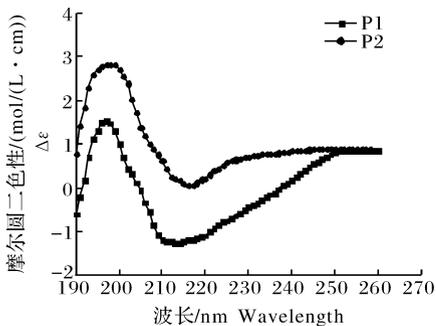


图 7 褐变相关酶的圆二色谱图

Fig.7 CD spectra of browning-related enzyme

也相对 β -折叠含量(43.4%)较少,P2 无 β -转角与无规卷曲。

2)动态散射光谱分析。从图 8 可以看出,2 种酶的粒径分布均较为集中,P1 的粒径在 11.696 nm 时,强度最大,达到 29.686%,其粒径分布范围较窄(8.721~21.037 nm);P2 的粒径在 8.721 nm 时,强度最大,达到 25.369%,其粒径分布范围较窄(5.615~18.166 nm)。从 P1 与 P2 的粒径分布可知,P1 与 P2 的粒径宽度基本相同,但 P2 比 P1 的粒径小,这一结果和图 2 中电泳图结果吻合,P2 比 P1 的分子质量小。

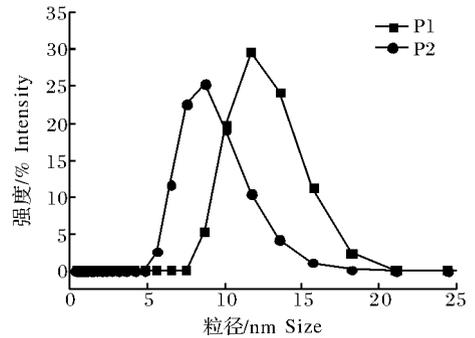


图 8 2 种褐变相关酶粒径分布图

Fig.8 Particle size distribution of the two enzymes

3)荧光光谱分析。PPO 荧光光谱图如图 9 所示。P1 的最大发射波长 λ_{\max} 为 358.4 nm,相对荧光强度为 207.9。P2 的最大发射波长 λ_{\max} 为 356 nm,相对荧光强度为 164.2。上述结果表明,2 种蛋白的 Trp 残基均暴露于亲水溶液环境中^[20]。

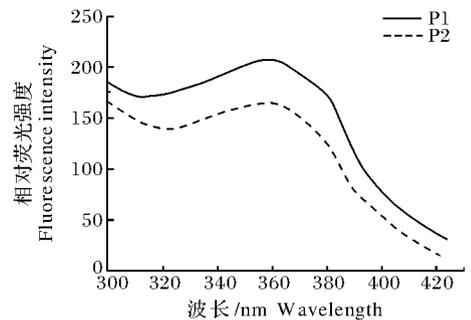


图 9 PPO 的荧光光谱图

Fig.9 Fluorescence spectra of PPO

3 讨论

本试验以芒果为原料,采用缓冲液提取,硫酸铵盐析沉淀,并通过柱层析进一步纯化出 2 种具有 PPO 活性的褐变相关酶,通过 SDS-PAGE 和 Native-PAGE 电泳鉴定,可知芒果皮中 P1 的活性较

高,且浓度也较高,而 P2 的蛋白浓度、活性均较低,在纯化的过程中,活性容易损失,所以考马斯亮蓝染色条带不清晰。当 P1 以邻苯二酚、邻苯三酚为底物时,其 K_m 分别为 10.32、89.91 mmol/L。这个结果表明,P1 最适作用底物为邻苯二酚。研究表明^[5],PPO 的最适作用底物为邻苯三酚,PPO 能催化氧化酚羟基为羰基,酚羟基的数目越多,PPO 活性越高。同时同一苯环中,相邻的酚羟基比相间或者相对的酚羟基表现出更高的活性。然而,我们的试验中,P1 的最适作用底物为邻苯二酚。最适作用底物的不同,可能与酶的构象相关。P1 的最佳反应 pH 值为 7.0,最适反应温度为 55 °C。蛋白质的二级结构主要有 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲,其中常见的二级结构有 α -螺旋和 β -折叠。蛋白质的 CD 谱是这几种构象 CD 谱的综合显示^[17]。从圆二色谱结果可知,P1 和 P2 分别含有 32.1% 和 19.2% 的 α -螺旋,43.4% 和 80.8% 的 β -折叠。一般而言,多酚氧化酶的活性中心一般存在于 α -螺旋中, α -螺旋含量越高,通常其活性更高。圆二色谱的结果和酶活结果一致,P2 的 α -螺旋含量较低,其活性也明显低于 P1。蛋白质的内源荧光主要来自 Trp 和 Tyr 残基。在这些内源荧光团中,Trp 的摩尔消光系数最高,可作为能量转移的受体。暴露于溶剂中的 Trp 的最大发射波长为 352 nm,埋藏于蛋白质内部的 Trp 的最大发射波长变化较大,从 307 nm 到 352 nm 都可。从荧光光谱结果可知,P1 最大发射波长 λ_{max} 为 358.4 nm 处,荧光强度为 207.9。P2 最大发射波长 λ_{max} 为 356 nm 处,相对荧光强度为 164.2,两者的荧光基团均处于极性亲水环境中。流体动力学半径可以通过光散射技术来检测。动态散射光谱分析表明,2 种同工酶的粒径分布较集中,分别在 11.696 nm 和 8.721 nm 处,光强最高,分别达到 29.686% 和 25.369%。

参 考 文 献

- [1] PARK Y K, SATO H H, ALMEIDA T D, et al. Polyphenol oxidase of mango (*Mangifera indica* var. Haden) [J]. Journal of food science, 1980, 45(6): 1619-1621.
- [2] NDIAYE C, XU S, WANG Z. Steam blanching effect on polyphenoloxidase, peroxidase and colour of mango (*Mangifera indica* L.) slices [J]. Food chemistry, 2009, 113(1): 92-95.
- [3] 赖必辉, 毕金峰, 庞杰, 等. 芒果加工技术研究进展 [J]. 食品与机械, 2011, 27(3): 152-155.
- [4] 杨杨, 范蓓, 申琳, 等. 芒果采后冷害发生及控制技术进展 [J]. 食品科学, 2014(7): 292-297.
- [5] CHENG X, HUANG X, LIU S, et al. Characterization of germ-in-like protein with polyphenol oxidase activity from *Satsuma mandarine* [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2014, 449(3): 313-318.
- [6] MAYER A M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review [J]. Phytochemistry, 2006, 67(21): 2318-2331.
- [7] 刘芳, 赵金红, 朱明慧, 等. 多酚氧化酶结构及褐变机理研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2015(6): 113-119.
- [8] 王曼玲, 胡中立, 周明全, 等. 植物多酚氧化酶的研究进展 [J]. 植物学通报, 2005(2): 215-222.
- [9] QUEIROZ C, DA-SILVA A J R, LOPES M L M, et al. Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) after processing [J]. Food chemistry, 2011, 125(1): 128-132.
- [10] POTT I, NEIDHART S, MUHLBAUER W, et al. Quality improvement of non-sulphited mango slices by drying at high temperatures [J]. Innovative food science and emerging technologies, 2005, 6(4): 412-419.
- [11] 汤凤霞, 魏好程, 曹禹. 芒果多酚氧化酶的特性及抑制研究 [J]. 食品科学, 2006(12): 156-160.
- [12] 王挥, 杨志伟, 潘莹瑛, 等. 芒果热处理对贮藏品质影响及机理研究 [J]. 食品科技, 2012(6): 57-60.
- [13] ASRYANTS R A, DUSZENKOVA I V, NAGRADOVA N K. Determination of sepharose-bound protein with coomassie brilliant blue G-250 [J]. Analytical biochemistry, 1985, 151(2): 571-574.
- [14] WEEMAES C A, LUDI KHUYZE L R, VAN DEN BROECK I, et al. Kinetics of combined pressure-temperature inactivation of avocado polyphenoloxidase [J]. Biotechnology and bioengineering, 1998, 60(3): 292-300.
- [15] MDLULI K M. Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra) [J]. Food Chemistry, 2005, 92(2): 311-323.
- [16] 黄行健, 程玉鑫, 刘思宇, 等. 红肉桃皮中多酚氧化酶的酶学特性及结构表征 [J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(3): 114-121.
- [17] HU W, ZHANG Y, WANG Y, et al. Aggregation and homogenization, surface charge and structural change, and inactivation of mushroom tyrosinase in an aqueous system by subcritical/supercritical carbon dioxide [J]. Langmuir, 2011, 27(3): 909-916.
- [18] 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.
- [19] MISHRA B B, GAUTAM S, SHARMA A. Purification and characterisation of polyphenol oxidase (PPO) from eggplant (*Solanum melongena*) [J]. Food chemistry, 2012, 134(4):

1855-1861.

[20] HUANG N, CHENG X, HU W, et al. Inactivation, aggregation, secondary and tertiary structural changes of germin-like pro-

tein in *Satsuma mandarine* with high polyphenol oxidase activity induced by ultrasonic processing[J]. *Biophysical chemistry*, 2015, 197: 18-24.

Enzymatic properties and structure characterization of browning-related enzymes in mango skin

HU Wanfeng LIU Siyu HUANG Xingjian SHAN Xiaofei
XU Xiaoyun PAN Siyi PENG Bangzhu

College of Food Science and Technology/MOE Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The browning related enzymes in mango skin were investigated. Crude proteins were extracted from mango juicing with centrifugation, filtration and concentration methods and purified by column chromatography. Two isoenzymes, P1 and P2, were purified. Using catechol as substrate, the activity of the enzyme was determined by spectrophotometry at 420 nm. The results showed that the optimal temperature, pH value, substrate for mango P1 was 55 °C, 7.0, and catechol, respectively. The molecular weight of P1 was 100 ku. The activity of P2 was very low. Results of circular dichroism showed that the content of α -helix and β -fold of the two enzyme was 32.1% and 19.2%, 43.4% and 80.8%, respectively. Result of fluorescence excitation spectra showed that the maximum emission wavelength of P1 and P2 was at 358.4 nm and 356 nm with the fluorescence intensity of 207.9 and 164.2. The particle size distribution of the two enzymes was more concentrated at 11.696 nm and 8.721 nm, reaching 29.686% and 25.369%.

Keywords mango; browning related enzyme; enzymatic browning; enzyme property; structural

(责任编辑:陆文昌)