

# 金银花多酚氧化酶特异性与抑制剂动力学研究<sup>\*</sup>

罗磊 周燕燕 朱文学 杨彬 屈政 康新艳

(河南科技大学食品与生物工程学院, 洛阳 471023)

**摘要:** 对金银花多酚氧化酶底物特异性和不同抑制剂的抑制效应进行了动力学分析,结果表明:金银花多酚氧化酶的最适作用底物为绿原酸, $K_m$ 值为 0.005 9 mmol/L。维生素 C、4-己基间苯二酚、L-半胱氨酸对多酚氧化酶的抑制均属可逆抑制,其抑制类型分别属于混合性、竞争性、反竞争性,对游离酶的抑制常数  $K_i$  分别为 1.620、4.587、0 mmol/L,对酶-底物络合物的抑制常数  $K_{is}$  分别为 1.995、0.3.780 mmol/L;柠檬酸的抑制效应属不可逆抑制。维生素 C、4-己基间苯二酚、L-半胱氨酸、柠檬酸对金银花多酚氧化酶半抑制浓度分别为 0.062、0.053、0.140、0.048 mmol/L。

**关键词:** 金银花 多酚氧化酶 底物特异性 抑制剂 动力学

**中图分类号:** TS20 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2014)07-0202-07

## 引言

金银花是忍冬科植物忍冬 (*Lonicera japonica* Thunb) 的花蕾,是一种天然的药食同源原料<sup>[1-2]</sup>。金银花采摘后及其干燥过程中易发生外观劣变和药用品质的降低,前期研究结果证实,这是由金银花多酚氧化酶催化氧化绿原酸等酚类物质的酶促褐变造成的<sup>[3-4]</sup>。

酶促褐变是农产品采后和加工过程中品质劣变的重要原因,因此酶促褐变抑制剂的应用受到研究者的重视。Dogru 等研究显示儿茶酚为西芹多酚氧化酶(PPO)的最适底物,维生素 C 等还原性有机酸能将邻醌还原成二元酚,通过非竞争性可逆抑制限制褐色物质的产生<sup>[5]</sup>;Rosa 等研究表明巯基化合物能与醌中间物反应生成无色物质而阻断酶促褐变的进行,也可通过与 PPO 活性中心的铜形成稳定复合物直接抑制酶活性,其抑制效应属于可逆抑制<sup>[6]</sup>。

目前对于金银花 PPO 的研究较为少见,Liu 等<sup>[7]</sup>研究显示金银花多酚氧化酶对儿茶酚、绿原酸等二元酚的活性明显高于一元酚,其最适底物为儿茶酚,并报道了曲酸、叠氮钠和环庚三烯酚酮对金银花 PPO 活性有一定抑制效果,候爽爽<sup>[8]</sup>研究了亚硫酸氢钠和柠檬酸对金银花 PPO 的抑制作用,但是缺乏对抑制剂抑制机理方面的研究,因此,本文在对金银花多酚氧化酶底物特异性研究的前提下,选择维

生素 C、4-己基间苯二酚、L-半胱氨酸、柠檬酸作为金银花 PPO 抑制剂,对其抑制效应和抑制动力学进行研究,为减少储藏和加工过程中金银花及其产品褐变和功效成分损失提供依据。

## 1 试验方法

### 1.1 金银花 PPO 提纯

采用磷酸盐缓冲溶液(PBS)匀浆浸提金银花 PPO,硫酸铵沉淀及柱层析法对其进行纯化。

挑选新鲜无霉变虫蛀金银花 10 g,加入 pH 值为 8 的磷酸盐缓冲溶液 80 mL(内含 PVPP 1.6 g),匀浆 4 min,8 层纱布过滤,4℃ 下浸提 1 h;4℃ 下以 9 000 r/min 转速离心 15 min,收集上清液即为粗 PPO 液<sup>[9]</sup>。

向粗酶液中缓慢加入等体积饱和硫酸铵溶液,4℃ 静置 1 h,4℃ 下 9 000 r/min 离心 15 min,弃去溶有杂质蛋白和其他小分子物质的上清,收集沉淀用 PBS 溶解,溶解液 4℃ 下在 pH 值为 7、0.05 mol/L Tris-HCl 中透析 12 h,离心,收集上清,用于进一步 Sephadex G-100 凝胶柱层析。取 3 mL PPO 液加样于平衡的 Sephadex G-100 凝胶柱,用 0.05 mol/L、pH 值为 7 的 Tris-HCl 进行洗脱,流速 0.3 mL/min,每 3 mL 收集 1 管,检测各管的酶活性和 280 nm 的吸光度,层析柱分离持续至无蛋白峰出现为止<sup>[10]</sup>,合并收集酶活性峰,经 SDS-PAGE 检测酶液纯度后,用于底物特异性及抑制剂效应的研究。

收稿日期: 2014-03-07 修回日期: 2014-03-17

<sup>\*</sup> NSFC-河南人才培养联合基金资助项目(U1304330)

作者简介: 罗磊,副教授,主要从事天然活性物质研究,E-mail: 13623896431@139.com

1.2 酶活检测

25℃ 下,向 3 mL LPBS 中加入 5 mmol/L 绿原酸 1 mL,加入纯化 PPO 液 1 mL,摇匀迅速倒入 1 cm 比色皿中,420 nm 下测定吸光度,从酶液加入后开始计时,每 10 s 记录一次 OD 值,以 PBS 和绿原酸混合液为空白组,通过最初直线段的斜率计算酶活力<sup>[11-12]</sup>,计算公式为

U = \frac{\Delta AV\_r}{0.001 W V\_s T} \tag{1}

式中 U——酶活 T——反应时间  
ΔA——一定时间内吸光度的变化值  
V<sub>r</sub>——加样缓冲液总体积,mL  
V<sub>s</sub>——取样比色体积,mL  
W——取样质量

1.3 底物特异性

按 1.2 节酶活测定体系,选择多种不同底物:苯酚、邻苯二酚、连苯三酚、绿原酸。3 mL pH 值 6.8 磷酸盐缓冲液与 1 mL 底物混合后,加入 1 mL PPO 液,充分混匀,室温 420 nm 下测定 3 min 内反应体系吸光度随时间的变化,计算 PPO 活性,利用双倒数作图法<sup>[13]</sup>,以底物浓度的倒数为 x 轴,反应速率的倒数为 y 轴,作图得出金银花 PPO 与不同底物作用时的米氏方程、米氏常数(K<sub>m</sub>)和最大反应速率(V<sub>max</sub>),K<sub>m</sub>值可以反应酶与底物亲合力的大小,K<sub>m</sub>值越小,表示 PPO 与底物的亲合力越大。

1.4 抑制剂对金银花 PPO 的抑制效应

向 2 mL PBS 和 1 mL 5 mmol/L 绿原酸组成的反应体系中分别加入 1 mL 不同种类及不同浓度的抑制剂,分别为维生素 C (0.01、0.03、0.05、0.07、0.09 mmol/L)、4-己基间苯二酚(0.01、0.03、0.05、0.07、0.09 mmol/L)、L-半胱氨酸(0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 mmol/L)、柠檬酸(0.01、0.03、0.05、0.07、0.09 mmol/L),混合均匀后,加入 1 mL PPO 液,检测不同条件下 PPO 的活性,通过得到不同抑制剂对酶的半抑制浓度和迟滞时间<sup>[14-15]</sup>,分别判断其对金银花 PPO 的抑制效果。

1.5 抑制剂对金银花 PPO 的抑制作用机理

含 2 mL PBS 和 1 mL 5 mmol/L 绿原酸的混合溶液,在添加 1 mL 不同浓度维生素 C、4-己基间苯二酚、L-半胱氨酸及柠檬酸条件下(同 1.3 节),分别加入 1 mL 不同质量浓度的 PPO(2、4、6、8 mg/mL),测定酶活,分析在不同抑制剂存在条件下,酶浓度与酶活性的关系<sup>[13,16]</sup>,判断抑制剂对 PPO 的抑制作用机理。

1.6 抑制剂对金银花 PPO 的抑制类型和抑制常数

改变 PBS 和绿原酸混合溶液中绿原酸的浓度,

测定在加入 1 mL 不同浓度维生素 C、4-己基间苯二酚、L-半胱氨酸的条件下,绿原酸浓度对 PPO 活力的影响,通过 Lineweaver - Burk 双倒数作图,以绿原酸浓度的倒数为 X 轴,反应速率的倒数为 Y 轴,通过米氏方程得到米氏常数(K<sub>m</sub>)和最大反应速度(V<sub>max</sub>),判断不同抑制剂对 PPO 的抑制类型<sup>[17-18]</sup>;抑制常数的测定是通过米氏方程的斜率和纵轴截距对抑制剂浓度二次作图,所得两条直线的斜率分别为抑制剂对游离酶的抑制常数 K<sub>i</sub>和对酶-底物络合物的抑制常数 K<sub>is</sub><sup>[19-20]</sup>。

米氏方程为

\frac{1}{V} = \frac{K\_m}{V\_{max} S} + \frac{1}{V\_{max}} \tag{2}

式中 V——反应速率  
S——绿原酸浓度

2 结果与分析

2.1 底物特异性

经 Sephadex G - 100 型凝胶柱分离纯化所得酶液,进行 SDS - PAGE 型凝胶电泳纯度检验,所选分离胶质量分数为 12%,浓缩胶质量分数为 5%,电流调至 20 mA,电泳结果如图 1 所示,发现只有一条谱带,说明此酶已经达到电泳纯,可用于底物特异性及抑制剂效应的研究。

金银花 PPO 作用底物为苯酚、邻苯二酚、连苯三酚、绿原酸时,通过双倒数作图所得米氏方程、米氏常数及最大反应速率如表 1 所示。



图 1 PPO 的 SDS - PAGE 电泳图谱  
Fig.1 SDS-PAGE pattern of purified PPO

表 1 不同底物对金银花 PPO 的动力学参数  
Tab.1 Kinetic parameters of different substrate on honeysuckle PPO

| 底物   | 米氏方程                   | K <sub>m</sub> / (mmol·L <sup>-1</sup> ) | V <sub>max</sub> / (mmol·(L·min) <sup>-1</sup> ) |
|------|------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 苯酚   | y = 0.043 9x + 0.479 5 | 0.091 6                                  | 2.085 5                                          |
| 邻苯二酚 | y = 0.081 3x + 5.856 4 | 0.013 9                                  | 0.170 8                                          |
| 连苯三酚 | y = 0.333 6x + 4.672 3 | 0.071 4                                  | 0.214 0                                          |
| 绿原酸  | y = 0.001 3x + 0.220 3 | 0.005 9                                  | 4.539 3                                          |

由表 1 可知,当绿原酸作为底物时 K<sub>m</sub> 值最小为 0.005 9 mmol/L,这说明绿原酸为金银花 PPO 的最适作用底物,金银花 PPO 与绿原酸的亲和力最强,与金银花 PPO 亲和力由强到弱顺序为绿原酸、邻苯

二酚、连苯三酚、苯酚,可以推出金银花 PPO 对二元酚酶有较好的结合力,对一元酚和多元酚的结合力相对较弱,因此可得金银花 PPO 为二酚酶,最适底物为绿原酸。

2.2 不同抑制剂对金银花 PPO 的抑制效应

2.2.1 维生素 C

由图 2 可知,维生素 C 对金银花 PPO 的抑制效应随着浓度的增大而增大。而维生素 C 浓度与迟滞时间和酶稳态活力的关系也证实,随着浓度的增大,相对活力逐渐下降,迟滞时间逐渐延长,其半抑制浓度为 0.062 mmol/L。Anil Kumar 和

Barry G 等研究显示维生素 C 可以抑制樱桃 PPO 和芒果 PPO 活性,有效抑制樱桃和芒果果浆褐变现象<sup>[21-22]</sup>。

2.2.2 4-己基间苯二酚

由图 3 可知 4-己基间苯二酚对金银花 PPO 活性的发挥有一定抑制作用,随着其浓度的增加,迟滞时间延长,相对活力持续下降,当 4-己基间苯二酚浓度为 0.05 mmol/L 时,迟滞时间为 120 s,活力下降 50%,即半抑制浓度为 0.053 mmol/L。Iyidogan 等<sup>[23]</sup>研究称 4-己基间苯二酚组合能抑制苹果汁 89.2% 的褐变,是苹果汁最有效的抑制剂。

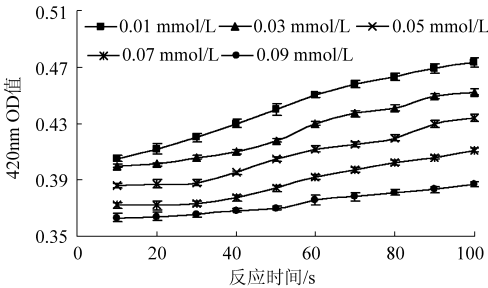


图 2 不同浓度维生素 C 对金银花 PPO 的抑制效应

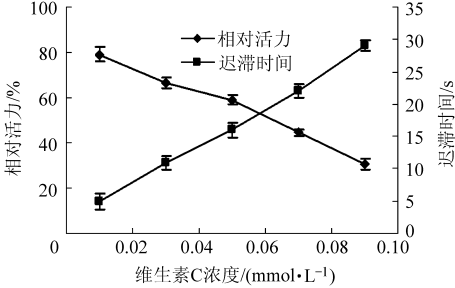


Fig. 2 Effect of concentrations of ascorbic acid on honeysuckle PPO

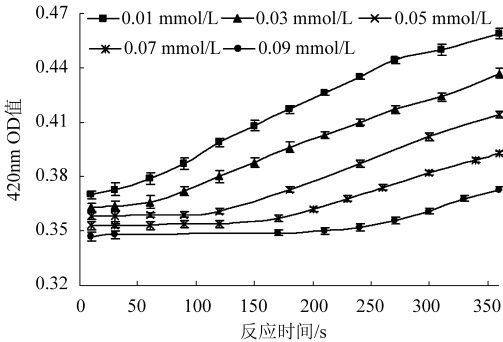


图 3 不同浓度 4-己基间苯二酚对金银花 PPO 的抑制效应

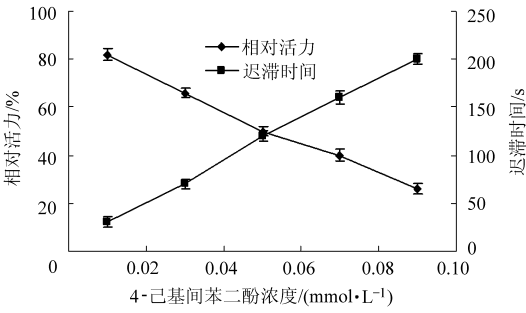


Fig. 3 Effect of concentrations of 4-hexylresorcinol on honeysuckle PPO

2.2.3 L-半胱氨酸

由图 4 可知 L-半胱氨酸对金银花 PPO 活性的发挥有延迟作用,并对酶稳态活力有抑制作用。L-半胱氨酸浓度对 PPO 稳态活力和迟滞时间二次作图,分析可知,随着其浓度的增加,PPO 的稳态活力持续下降,半抑制浓度为 0.140 mmol/L。Jiang 研究表明 L-半胱氨酸、硫脲均能够明显地抑制龙眼 PPO 活性<sup>[24]</sup>。

2.2.4 柠檬酸

由图 5 可知柠檬酸对金银花 PPO 活性的发挥有一定延迟作用,并对酶稳态活力有一定抑制,随着柠檬酸浓度的增加,迟滞时间增加,PPO 的稳态活力持续下降,柠檬酸对金银花 PPO 的半抑制浓度为 0.048 mmol/L。Liu 等认为柠檬酸可作为蘑菇 PPO 的有效抑制剂应用于工业生产

中<sup>[9]</sup>。

2.3 抑制剂对金银花 PPO 的抑制作用机理

图 6a~6c 均为通过原点的直线,随着抑制剂浓度的增加,直线斜率减小,酶促反应速率下降明显,酶活逐步降低,说明维生素 C、4-己基间苯二酚、L-半胱氨酸对金银花 PPO 的抑制属于可逆抑制,抑制剂与酶以非共价键结合而引起酶活性降低,并不导致酶分子结构永久变化。

由图 6d 可知在柠檬酸存在的测活体系中,PPO 稳态活力与加入酶量的关系为一组平行直线,随着柠檬酸浓度的增加,反应速度不受影响,横轴截距增大,说明柠檬酸在酶促反应初期对金银花 PPO 的抑制属于不可逆抑制,柠檬酸能与酶分子某些必需基团以牢固的共价键结合,使酶永久失活减少有效酶量。

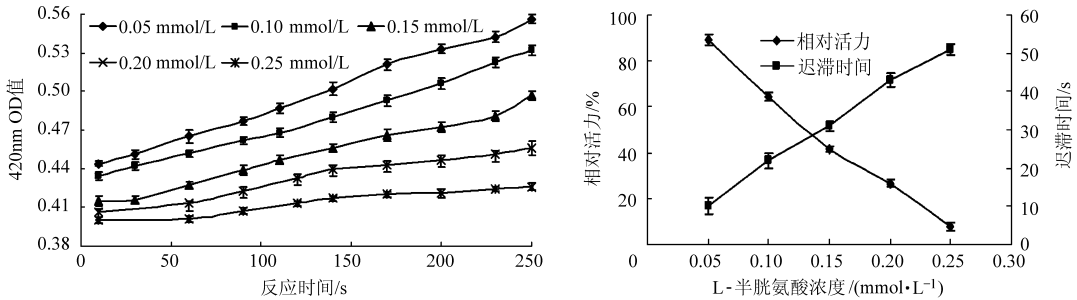


图 4 不同浓度 L-半胱氨酸对金银花 PPO 的抑制效应

Fig.4 Effect of concentrations of L-cysteine on honeysuckle PPO

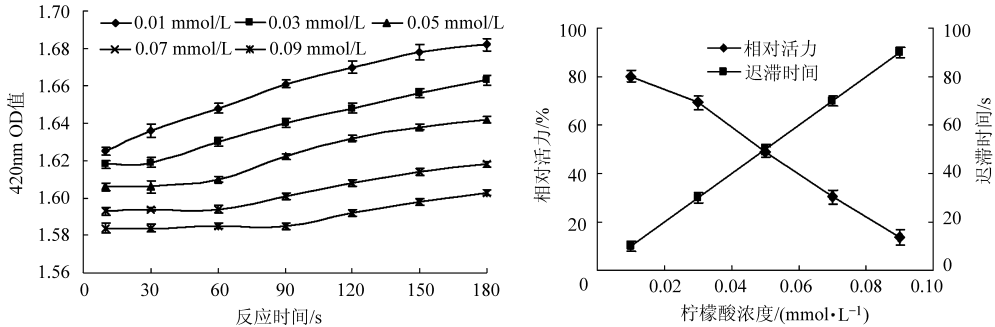


图 5 不同浓度柠檬酸对金银花 PPO 的抑制效应

Fig.5 Effect of concentrations of citric acid on honeysuckle PPO

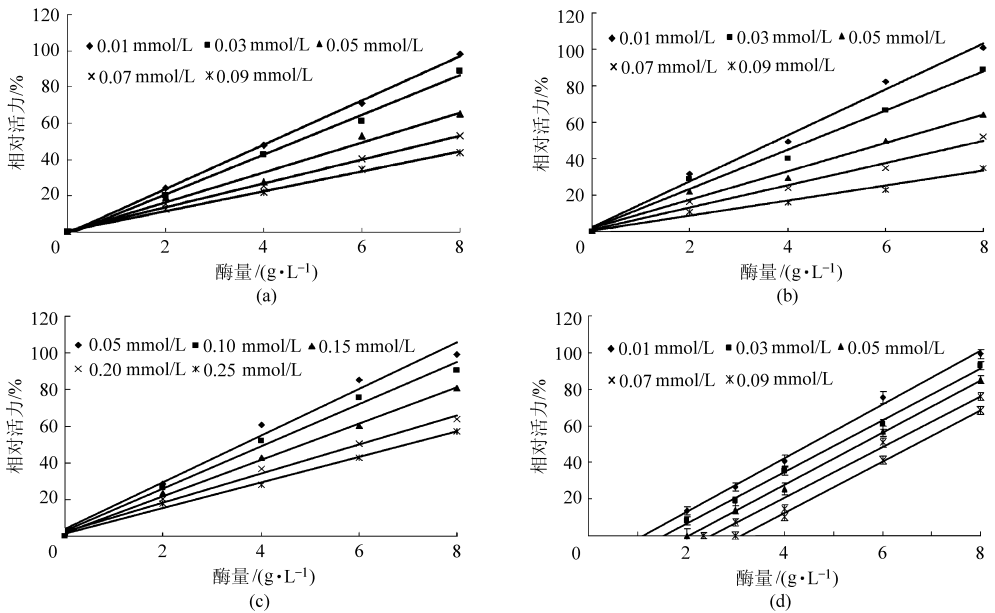


图 6 在不同浓度抑制剂下酶活力和酶量的关系

Fig.6 Effect of inhibitor concentrations on activity of PPO

(a) 维生素 C (b) 4-己基间苯二酚 (c) L-半胱氨酸 (d) 柠檬酸

2.4 抑制剂对金银花 PPO 的抑制类型及抑制常数

2.4.1 维生素 C 对金银花 PPO 的抑制类型

由图 7 可知添加维生素 C 时,为相交于第二象限的一组直线,直线的斜率和纵轴截距均随维生素 C 浓度的变化而变化,其抑制机理表现为混合性抑制,即维生素 C 既能与酶结合,又能与酶-底物络合物结合,且结合常数不同。随着维生素 C 浓度的增大, $K_m$ 增大, $V_{max}$ 减小,说明维生素 C 既能改变 PPO

与底物的亲和力,又能影响酶促反应速率。

2.4.2 4-己基间苯二酚对金银花 PPO 的抑制类型

由图 8 可知添加 4-己基间苯二酚时,为交于  $x$  轴的一组斜率不同的直线,随着 4-己基间苯二酚浓度的增加, $K_m$ 不变, $V_{max}$ 依次减小,说明其抑制类型属于竞争性抑制,4-己基间苯二酚在反应体系中与绿原酸竞争与酶反应,降低参与到酶促反应的酶量,可同时与酶和酶-底物络合物结合,且抑制常数相

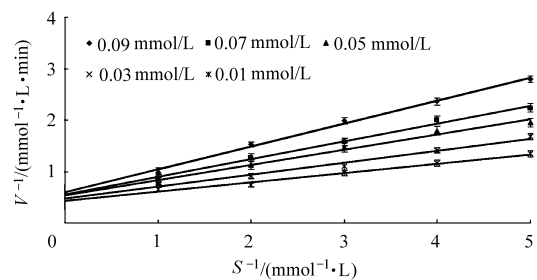


图 7 维生素 C 对金银花 PPO 抑制作用的 Lineweaver - Burk 曲线

Fig. 7 Lineweaver - Burk plots for inhibition of ascorbic acid on honeysuckle PPO

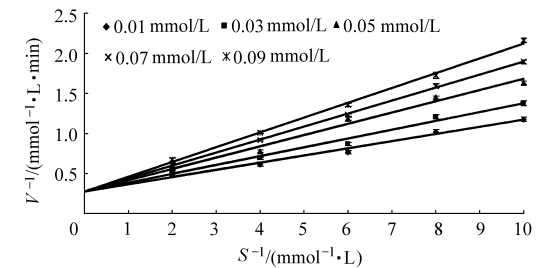


图 8 4-己基间苯二酚对金银花 PPO 抑制作用的 Lineweaver - Burk 曲线

Fig. 8 Lineweaver - Burk plots for inhibition of 4-hexylresorcinol on honeysuckle PPO

同,其不影响 PPO 与绿原酸的结合力,只影响酶促反应速度。

2.4.3 L-半胱氨酸对金银花 PPO 的抑制类型

由图 9 可知添加 L-半胱氨酸时,为一组平行的直线,酶促反应的  $K_m$  和  $V_{max}$  均随着 L-半胱氨酸浓度的增大而减小,其抑制类型表现为反竞争性可逆抑制,L-半胱氨酸只能与酶 - 底物络合物结合,形成酶 - 底物 - 抑制剂复合物,从而阻断酶促反应进程,抑制褐色物的生成,并且浓度越大结合力越强。

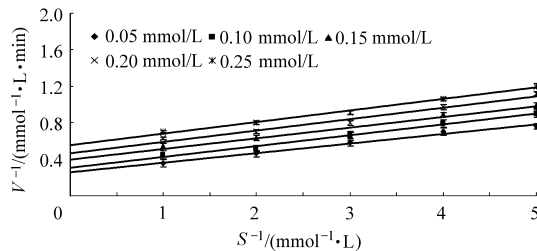


图 9 L-半胱氨酸对金银花 PPO 抑制作用的 Lineweaver - Burk 曲线

Fig. 9 Lineweaver - Burk plots for inhibition of L - cysteine on honeysuckle PPO

2.4.4 不同抑制剂对金银花 PPO 的抑制常数

以米氏方程斜率和纵轴截距对抑制剂浓度二次作图可得到维生素 C、4-己基间苯二酚、L-半胱氨酸对多酚氧化酶的抑制常数,如图 10 根据直线斜率可

求得维生素 C 对游离酶的抑制常数  $K_i$  为 1.620 mmol/L,对酶 - 底物络合物抑制常数  $K_{is}$  为 1.995 mmol/L。由图 11、12 可知,分别根据直线斜率可求得 4-己基间苯二酚对游离酶的抑制常数  $K_i$  为 4.587 mmol/L,对酶 - 底物络合物的抑制常数  $K_{is}$  为零;L-半胱氨酸不能与游离酶结合, $K_i$  为零,其对酶 - 底物络合物的抑制常数  $K_{is}$  为 3.780 mmol/L。

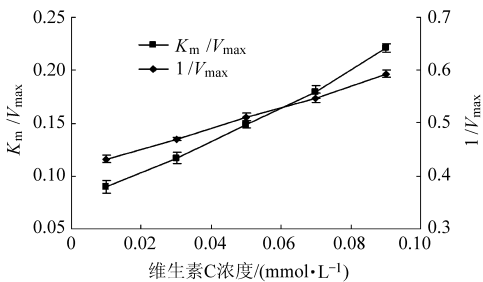


图 10 维生素 C 浓度与斜率和纵轴截距的关系

Fig. 10 Effect of concentrations of ascorbic acid on slope and intercept

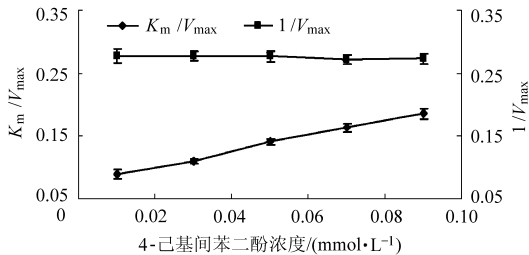


图 11 4-己基间苯二酚浓度与纵轴截距的关系

Fig. 11 Effect of concentrations of 4-hexylresorcinol on intercept

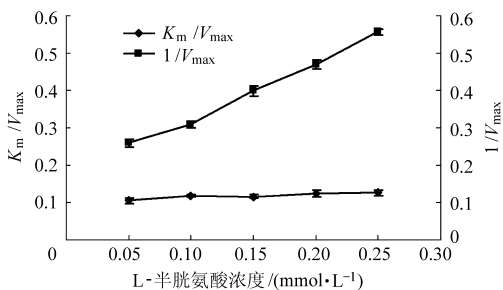


图 12 L-半胱氨酸浓度与纵轴截距的关系

Fig. 12 Effect of concentrations of L-cysteine on intercept

3 结论

(1) 金银花 PPO 最适底物为绿原酸,米氏常数为 0.005 9 mmol/L。维生素 C、4-己基间苯二酚、L-半胱氨酸和柠檬酸均对金银花多酚氧化酶有抑制作用,半抑制浓度分别为 0.062、0.053、0.140、0.048 mmol/L。

(2) 维生素 C、4-己基间苯二酚、L-半胱氨酸对金银花多酚氧化酶的抑制属于可逆抑制,柠檬酸为不可逆抑制。通过双倒数作图分析得出维生素 C、

4-己基间苯二酚、L-半胱氨酸对金银花多酚氧化酶抑制类型分别为混合性、竞争性、反竞争性。

(3) 维生素 C 对游离酶的抑制常数  $K_i$  为 1.620 mmol/L,对酶-底物络合物抑制常数  $K_{is}$  为 1.995 mmol/L;4-己基间苯二酚对游离酶的抑制常数  $K_i$  为 4.587 mmol/L,对酶-底物络合物的抑制常数  $K_{is}$  为零;L-半胱氨酸对游离酶的抑制常数  $K_i$  为零,对酶-底物络合物抑制常数  $K_{is}$  为 3.780 mmol/L。

(4) 柠檬酸对金银花 PPO 的抑制效果最强,半抑制浓度为 0.048 mmol/L;其次为 4-己基间苯二酚,其在酶促褐变初始阶段通过对游离酶抑制而阻碍褐变进程,半抑制浓度为 0.053 mmol/L;第三为维生素 C,其从游离酶和酶底物络合物两方面阻碍酶促褐变的发生,抑制常数相对较低,半抑制浓度为 0.062 mmol/L;L-半胱氨酸的抑制作用最弱,半抑制浓度为 0.140 mmol/L。

参 考 文 献

- 1 马雪梅, 吴朝封. 河南省金银花产业发展现状及思路[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(6): 1185 - 1188.  
Ma Xuemei, Wu Chaofeng. Current situation and development ideas on honeysuckle industry in Henan Province[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2012, 51(6): 1185 - 1188. (in Chinese)
- 2 石钺, 石任兵, 陆蕴如, 等. 我国药用金银花资源、化学成分及药理研究进展[J]. 中国药学杂志, 1999, 34(11): 724.
- 3 李会军. 金银花的活性成分与质量评价研究[D]. 南京: 中国药科大学, 2003.
- 4 侯爽爽, 罗磊. 金银花热风干燥过程中颜色的劣变机理[J]. 农产品加工学刊, 2010(10): 63 - 65.  
Hou Shuangshuang, Luo Lei. The mechanism of honeysuckle color degeneration in hot air drying[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2010(10): 63 - 65. (in Chinese)
- 5 Dogru Y Z, Erat M. Investigation of some kinetic properties of polyphenol oxidase from parsley[J]. Food Research International, 2012, 49(1): 411 - 415.
- 6 De la Rosa L A, Alvarez-Parrilla E, Moyers-Montoya E, et al. Mechanism for the inhibition of apple juice enzymatic browning by Palo Fierro (desert ironweed) honey extract and other natural compounds[J]. LWT- Food Science and Technology, 2011, 44(1): 269 - 276.
- 7 Liu N, Liu W, Wang D, et al. Purification and partial characterization of polyphenol oxidase from the flower buds of *Lonicera japonica* Thunb[J]. Food Chemistry, 2013, 138(1): 478 - 483.
- 8 侯爽爽. 金银花热风干燥过程中颜色劣变机理及抑制研究[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2011.  
Hou Shuangshuang. Research on mechanism of honeysuckle color degeneration in hot air drying and the rejection[D]. Luoyang: Henan University of Science and Technology, 2011. (in Chinese)
- 9 Liu Wei, Zou Liqiang, Liu Junping, et al. The effect of citric acid on the activity, thermodynamics and conformation of mushroom polyphenoloxidase[J]. Food Chemistry, 2013, 140(1 - 2): 289 - 295.
- 10 He S, Liu H, Zhou S, et al. A preliminary study on poly phenol oxidase extraction from sugarcane juice[C] // South China Biennial World Conference on Recent Development in Sugar Technologies. Guangzhou: SCUT, 2009: 183 - 186.
- 11 Palma-Orozco G, Ortiz-Moreno A, Dorantes-Alvarez L, et al. Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mamey (*Pouteria sapota*) [J]. Phytochemistry, 2011, 72(1): 82 - 88.
- 12 Doğru Y Z, Erat M. Investigation of some kinetic properties of polyphenol oxidase from parsley[J]. Food Research International, 2012, 49(1): 411 - 415.
- 13 李佩艳, 刘建学, 徐宝成, 等. 不同抑制剂对澳洲青苹中多酚氧化酶活性的影响[J]. 中国食品添加剂, 2011(1): 160 - 164.  
Li Peiyan, Liu Jianxue, Xu Baocheng, et al. The influences of different inhibitors on polyphenoloxidase activity in granny amith apple[J]. China Food Additives, 2011(1): 160 - 164. (in Chinese)
- 14 Alijanianzadeh M, Saboury A A, Ganjali M R, et al. The inhibitory effect of ethylenediamine on mushroom tyrosinase[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 50(3): 573 - 577.
- 15 Fange D, Lovmar M, Pavlov M Y, et al. Identification of enzyme inhibitory mechanisms from steady-state kinetics[J]. Biochimie, 2011, 93(9): 1623 - 1629.
- 16 Melanie Holzwarth, Julia Wittig, Reinhold Carle, et al. Influence of putative polyphenoloxidase (PPO) inhibitors on strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) PPO, anthocyanin and color stability of stored purées[J]. LWT-Food Science and Technology, 2013, 52(2): 116 - 122.
- 17 Yang M H, Chen C M, Hu Y H, et al. Inhibitory kinetics of DABT and DABPT as novel tyrosinase inhibitors[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, 115(5): 514 - 517.
- 18 肖飞, 赵曙辉. 鹰嘴豆异黄酮对酪氨酸酶的抑制动力学[J]. 日用化学工业, 2010, 40(6): 439 - 443.  
Xiao Fei, Zhao Shuhui. Inhibitory kinetics of *Cicer arietinum* isoflavones on tyrosinase activity[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2010, 40(6): 439 - 443. (in Chinese)
- 19 Si Y X, Ji S, Wang W, et al. Effects of boldine on tyrosinase: inhibition kinetics and computational simulation[J]. Process Biochemistry, 2013, 48(1): 152 - 161.
- 20 彭益强, 邓峰, 刘宇, 等. 富士苹果中多酚氧化酶活性的中心必需基团与抑制动力学[J]. 华侨大学学报: 自然科学版,

2012,33(1):51–54.

Peng Yiqiang, Deng Feng, Liu Yu, et al. Researches on essential groups of enzyme active site and inhibition kinetics of polyphenol oxidase from Fuji apple[J]. Journal of Huaqiao University:Natural Science, 2012, 33(1): 51–54. (in Chinese)

21 Kumar V B, Mohan T C, Murugan K. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.)[J]. Food Chemistry, 2008, 110(2): 328–333.

22 Guerrero-Beltrán J A, Swanson B G, Barbosa-Cánovas G V. Inhibition of polyphenoloxidase in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid[J]. LWT-Food Science and Technology, 2005, 38(6): 625–630.

23 Iyidogan N F, Bayindirli A. Effect of L L-cysteine, kojic acid and 4-hexylresorcinol combination on inhibition of enzymatic browning in Amasya apple juice[J]. Journal of Food Engineering, 2004, 62(3): 299–304.

24 Jiang Y M. Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit[J]. Food Chemistry, 1999, 66(1): 75–79.

## Specificity and Inhibition Kinetics of Polyphenol Oxidase from Honeysuckle

Luo Lei   Zhou Yanyan   Zhu Wenxue   Yang Bin   Qu Zheng   Kang Xinyan  
(College of Food and Biological Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China)

**Abstract:** The aim of this work was to study substrate speciflcity and inhibition kinetics of ascorbic acid, 4-hexylresorcinol, L-cysteine and citric acid on PPO obtained from honeysuckle. The results show that the best substrate is chlorogenic acid because of the lowest  $K_m$  value 0.0059 mmol/L; ascorbic acid, 4-hexylresorcinol and L-cysteine demonstrate reversible inhibition, and their  $IC_{50}$  values are 0.062, 0.053,0.140 mmol/L. Citric acid shows irreversible inhibition to PPO with  $IC_{50}$  value of 0.048 mmol/L. Lineweaver–Burk plotting show that ascorbic acid, 4-hexylresorcinol and L-cysteine are mixed-type, non-competitive and anti-competitive inhibitors, with the inhibition constants  $K_i$  of 1.620, 4.587, 0 mmol/L, and  $K_{is}$  of 1.995, 0, 3.780 mmol/L, respectively.

**Key words:** Honeysuckle   Polyphenol oxidase   Substrate specificity   Inhibitor   Kinetic

(上接第 221 页)

## Experiment and Numerical Simulation of Layer Resistance Parameters in Dryer

Zhang Ye   Li Changyou   Ma Xingzao   Li Jianmin   Zou Xiangjun   Wang Runfa  
(Key Laboratory of Key Technology on Agricultural Machine and Equipment, Ministry of Education, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Ventilation resistance characteristic of grain layer is the key influence factor to the drying uniformity and energy consumption, is also the theoretical foundation parameter for layer design and fan selection. The traditional empirical formulas of ventilation resistance of grain layer are low precision and ignore the complicated changes and nonlinear uncertainty problems of grain layer porous media. The pressure loss factors were discussed based on the traditional Ergun model. By testing the airflow resistance on test platform, dividing the air velocity into subsections by the exploratory analysis method, and introducing an error influence factor  $\lambda$ , a new pressure field model of variable layer was derived based on the Ergun model. The optimal resistance characteristic curve was given, and the relationship between the ventilation resistance and layer thickness was built. The results show that when the air velocity is less than 0.2 m/s, the  $\lambda$  is 1; when the velocity is between 0.2 m/s and 0.4 m/s, the  $\lambda$  is 0.89; and when the velocity is between 0.4 m/s and 0.6 m/s, the  $\lambda$  is 0.79.

**Key words:** Dryer   Layer resistance   Porous media   Revised Ergun model