

富士苹果中膜结合态多酚氧化酶分离纯化方法*

刘芳 甘芝霖 赵金红 温馨 倪元颖

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要:以烟台红富士为原料,研究膜结合态多酚氧化酶(mPPO)的分离纯化条件,采用非离子型去污剂结合热诱导方法粗提,硫酸铵分级沉淀,DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换柱层析方法对 mPPO 进行纯化,并对其进行串联质谱(LC-MS/MS)分析鉴定。结果表明 mPPO 提取纯化最佳条件为:超声提取 10 min,50% ~ 80% 饱和度硫酸铵沉淀,0.1 mol/L NaCl 梯度洗脱。纯化后的 mPPO 纯度提高了 64.30 倍,比活力高达 387 032.97 U/mg。纯化后的 mPPO 经 SDS-PAGE 和 Native-PAGE 分析均为单一蛋白带,且为亚基分子量 67 kDa 的二聚体。经串联质谱分析及蛋白数据库鉴定此纯化蛋白为多酚氧化酶。

关键词:富士苹果 多酚氧化酶 分离纯化 膜结合态 离子交换柱层析 串联质谱

中图分类号: Q814.1; S661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2015)02-0193-05

Isolation and Purification Method of Membrane-bound Polyphenol Oxidase in Fuji Apple

Liu Fang Gan Zhilin Zhao Jinhong Wen Xin Ni Yuanying

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Enzymatic browning was mainly associated with polyphenol oxidases which were able to act with phenolic compounds in the presence of molecular oxygen and decreased the commercial quality, organoleptic acceptance and nutritional value of the product. Membrane-bound polyphenol oxidase (mPPO) in Fuji apple (*Malus domestica* Borkh. cv. Red Fuji) was purified by using temperature-induced phase partitioning technique, ammonium sulfate fractional precipitation and DEAE Sepharose Fast Flow ion exchange column chromatography, and analyzed by using tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The best conditions for isolation and purification were ultrasonic extraction for 10 min, 50% ~ 80% saturation of ammonium sulfate precipitation, and gradient elution with 0.1 mol/L NaCl. The mPPO was purified by 64.30 folds with a high specific activity (387 032.97 U/mg). The Native-PAGE and SDS-PAGE were single bands for mPPO and the purified mPPO was a dimer of a subunit with a molecular weight of 67 kDa. The results by mass spectrometry analysis and comparison in protein database showed that the purified protein was a polyphenol oxidase.

Key words: Fuji apple Polyphenol oxidase Isolation and purification Membrane-bound Specific activity Anionic column chromatography

引言

褐变一直是制约苹果深加工的关键因素,已成为影响苹果加工的主要原因。多酚氧化酶(PPO)是导致苹果酶促褐变的关键酶,能在有氧条件下氧化

组织中内源性酚类物质形成邻醌,邻醌再相互聚合从而使组织发生褐变^[1]。

多酚氧化酶由于其重要的生理意义,受到国内外的广泛关注。有研究表明 PPO 可分为游离态和束缚态,前者主要存在于细胞液中属可溶态 PPO,而

收稿日期: 2014-04-14 修回日期: 2014-05-22

*“十二五”国家科技支撑计划资助项目(2012BAD31B00)

作者简介: 刘芳,博士生,主要从事果蔬加工与保鲜研究,E-mail: liufang_84@126.com

通讯作者: 倪元颖,教授,主要从事农产品加工与贮藏及天然产物提取分离研究,E-mail: niyycau@hotmail.com

后者则主要存在于叶绿体、线粒体等细胞器中,与这些细胞器的膜系统或其他特异部位结合呈不溶态^[2]。众多水果中 PPO 主要以结合状态存在,如苹果中可溶态只占 8% ~ 15%^[3]。国内外对可溶态多酚氧化酶的分离性质研究较多^[4-11],而对膜结合态多酚氧化酶的研究很少。本文选取烟台红富士为研究对象,研究结合态多酚氧化酶的分离纯化方法,提取出比活力及纯度较高的膜结合态多酚氧化酶(mPPO),以期对 mPPO 性质功能的深入研究和苹果产品开发及保藏提供基础。

1 材料与方法

1.1 原料与仪器

原料:成熟新鲜红富士苹果(产自山东烟台)购自北京美廉美超市,4℃ 冰箱贮藏。

仪器:高速冷冻离心机(CR21G III 型,日本日立公司);超滤装置(Stirring Cell 8050 型,美国 Minipore 公司);超纯水器(2000D 型,北京长风仪器仪表公司);紫外可见分光光度计(UV 1800 型,日本 Shimadzu 公司);电泳槽(Mini-PROTEAN 4 Cell 型,美国 Bio-Rad 公司);电泳仪(DYY-2 型,北京六一仪器厂);蛋白质层析系统(上海沪西仪器厂);层析冷柜(YC-1 型,北京博医康公司);HD-4 型电脑核酸蛋白(紫外)检测仪、D100B 型数显定时蠕动泵(上海青浦沪西仪器厂)。nanoACQUITY UPLC 型超高效液相色谱系统配备自动进样器(美国 Waters Micromass 公司);Synapt High Definition Mass Spectrometry 质谱仪(美国 Waters Micromass 公司)。

1.2 mPPO 蛋白粗提液条件的确定

将苹果洗净、切块,加入 0.05 mol/L、pH 值 6.8 的预冷磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液(含 2% 的 PVPP),料液比为 1:1,搅碎,4℃ 下 10 000 r/min 离心 20 min,所得滤液弃去。滤渣加入 150 mL Tris-HCl (pH 值 6.8)缓冲液、0.25% Triton X-100 匀浆并分别进行静置 1、2、3、4 h;超声处理 5、10、15 min。然后 4℃ 下 11 000 r/min 离心 15 min。置于冰箱 30 min,然后 35℃ 水浴保温 15 min。25℃ 下离心 15 min,上清液即为 mPPO,测定不同静置时间下及超声处理时间下的酶活,确定最佳提取方法及时间。

1.3 mPPO 硫酸铵沉淀饱和度的选择

加入固体硫酸铵粉末到粗酶液中,使其至 20% 饱和度,静置 30 min 后,12 000 r/min 离心 15 min,将沉淀物冷冻保存,所余上清液加硫酸铵至下一饱和度 30%,重复操作直至硫酸铵饱和度 85% 为止。收集沉淀,并用少量 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液

(pH 值 6.8)将此沉淀物溶解,再用同样的缓冲溶液在 4℃ 条件下透析 24 h,期间更换缓冲液 4 次。透析结束后,在 9 000 r/min、4℃ 条件下离心 20 min,弃去沉淀物,收集上清液用于层析分离。根据 PPO 活性的高低得出硫酸铵部分纯化的适宜条件。

1.4 mPPO 离子交换柱层析条件的选择

经硫酸铵沉淀后透析的粗蛋白质溶液,加样于经 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 值 6.8)平衡的 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱(1.0 cm × 10 cm),用平衡缓冲液冲洗 400 mL,然后进行加盐洗脱。

NaCl 线性洗脱(0 ~ 0.5 mol/L):用含 0 ~ 0.5 mol/L NaCl,pH 值 6.8 的磷酸缓冲液共 180 mL 进行梯度洗脱,洗脱速度为 0.3 mL/min,每管 3 mL,紫外监测波长为 280 nm。检测各管 PPO 活性,收集 PPO 活性峰。将所得酶活高的蛋白质组分经 30 kDa 超滤离心管浓缩后备用。

NaCl 分梯度洗脱(0、0.1、0.2、0.4、0.5 mol/L):分别用含 0、0.1、0.2、0.4、0.5 mol/L NaCl,pH 值 6.8 的磷酸缓冲液进行洗脱,每个梯度洗脱 40 mL,洗脱速度为 0.3 mL/min,每管 3 mL,紫外监测波长为 280 nm。检测各管 PPO 活性,收集 PPO 活性峰。将所得酶活高的蛋白质组分经 30 kDa 超滤离心管浓缩后备用。

1.5 多酚氧化酶活性测定条件的选择

PPO 催化氧化酚类底物,能生成褐色醌类物质,该氧化产物在特定波长处随着时间的延长,其吸光度会不断升高,在反应的初始阶段,其吸光度随时间呈线性递增,可通过吸光度对时间的斜率计算酶的活性。在 300 ~ 900 nm 波长范围内进行全波长扫描。重复 3 次,以确定其特征吸收波长。

本试验以邻苯二酚为反应底物,用浓度 0.05 mol/L、pH 值 6.8 的磷酸缓冲液配成 0.2 mol/L 的邻苯二酚溶液作为底物溶液。将 0.5 mL 蛋白洗脱液和 2.5 mL 的底物溶液混合,在 20℃ 下用分光光度计测定混合液在 60 s 内、410 nm 下的吸光度变化。一个活力单位(U)定义为在测定条件下 1 min 引起吸光度改变 0.001 所需的酶量。

1.6 蛋白质量测定

采用 Bradford 法进行蛋白质量的测定^[12]。在酸性环境下,蛋白质与考马斯亮兰 G-250 染料相结合,形成的复合物在 595 nm 处形成最大吸收峰,吸光度 $A_{595\text{nm}}$ 与蛋白质浓度成正比。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。

1.7 SDS – PAGE 电泳

SDS – PAGE 电泳中采用的浓缩胶和分离胶质量分数分别为 4% 和 12%。样品缓冲液 (SDS 500 mg、 β -巯基乙醇 0.5 g、甘油 3 mL、溴酚蓝 4 mg、1 mol/L pH 值 6.8 的 Tris-甘氨酸 2 mL, 定容至 10 mL) 与蛋白溶液 10 μ L 等体积混合, 沸水中煮 5 min。样品的上样量为 15 μ L, Marker 为 5 μ L。浓缩胶上所加电压为 75 V, 当染料前沿进入分离胶后, 将电压提高到 110 V。

电泳完毕后, 小心取出凝胶立即将凝胶于快速染色液 (北京索莱宝公司) 中染色, 脱色, 至电泳带清晰, 背景脱色干净后用凝胶成像系统成像及数据采集。SDS – PAGE 蛋白质 Marker 为: 磷酸化酶 b, 97.4 kDa; 牛血清清蛋白, 66.2 kDa; 兔肌动蛋白, 43.0 kDa; 牛碳酸酐酶, 31.0 kDa; 胰酶抑制剂, 20.1 kDa; 溶菌酶, 14.4 kDa。

1.8 Native – PAGE 电泳

Native – PAGE 电泳中采用的浓缩胶和分离胶质量分数分别为 4% 和 12%。样品缓冲液 (甘油 3 mL, 溴酚蓝 4 mg, 1 mol/L, pH 值 6.8 的 Tris-甘氨酸 2 mL, 定容至 10 mL) 与蛋白溶液 10 μ L 等体积混合。样品的上样量为 25 μ L, Marker 为 5 μ L。在恒压 80 V 下进行电泳。电泳完毕后, 背景脱色干净后用凝胶成像系统成像及数据采集。Native – PAGE 蛋白质 Marker 为: 甲状腺球蛋白, 669 kDa; 马脾铁蛋白, 440 kDa; 过氧化氢酶, 232 kDa; 乳酸脱氢酶, 140 kDa; 牛血清蛋白, 66 kDa。

活性电泳多酚氧化酶 (PPO) 染色: 显色参照文献 [13], 0.06% 邻苯二胺 (0.01 mol/L 草酸溶解)、1.0% 邻苯二酚、0.05 mol/L pH 值 6.8 磷酸缓冲液 3 种溶液按体积比例 1:3:1 混合倒入透明塑料盒中, 电泳完毕后将凝胶放入盒中, 至酶带显现, 取出漂洗, 并拍照记录结果。

1.9 蛋白质的 LC – MS/MS 分析

1.9.1 胶内酶切

经考马斯亮蓝染色后的蛋白质条带用刀片切下, 切成 1 mm² 的胶块, 置于 Eppendorf 管中脱色, 用真空离心浓缩仪将其完全干燥, 再加入非离子去污剂后进行胶内酶切。具体操作如下: 于 Eppendorf 管中加入 2 μ L 含 0.05 μ g Trypsin、0.1% n-dodecyl- β -D-maltoside、25 mmol/L NH₄HCO₃ 溶液湿润胶粒 (0.1% n-dodecyl- β -D-maltoside、25 mmol/L NH₄HCO₃)。

1.9.2 MALDI – TOF – MS 分析的条件

采用德国 BRUKER 公司 ReflexTM III 型基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI – TOF – MS) 仪进行测定; 反射检测方式: 飞行管长 3 m; 氮

激光器波长 337 nm; 加速电压 20 kV, 反射电压 23 kV。

方法: 将 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (α -CCA, Bruker 公司) 溶于含 0.1% 三氟乙酸的 50% 乙腈溶液中, 制成饱和溶液, 离心, 取 1 μ L 上清液与 1 μ L 肽段提取液等体积混合, 取 1 μ L 点在靶上, 送入离子源中进行检测。

1.9.3 LC – ESI – MS/MS 分析和数据库检索

LC – ESI – MS/MS 分析由清华大学生物医学测试中心蛋白化学实验室完成。比对结果在 Mascot 及 BLAST 数据库检索完成。

2 结果与讨论

2.1 粗酶液的提取

通过预试验, 确定了提取具有 PPO 活性的蛋白质缓冲液最佳提取 pH 值 6.8, 料液比 1:1。提取缓冲液为 0.05 mol/L 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 含有 2% 的不溶性聚乙烯吡咯烷酮 (PVPP)。PVPP 用于吸附多酚类物质, 可由离心去除。

从 mPPO 与邻苯二酚发生酶促反应开始, 对其反应系统进行 3 次 300 ~ 900 nm 波段扫描。邻苯二酚溶液与酶反应液在波长 300 ~ 900 nm 处测得的吸收波谱见图 1。由图 1 可以看出, 在波长 410 nm 处有重叠峰, 3 次重复扫描结果在 410 nm 处随时间有显著升高, 因此, 可以确定 mPPO 氧化邻苯二酚的产物特定吸收波长为 410 nm。试验中 mPPO 活性均在 410 nm 处测定。

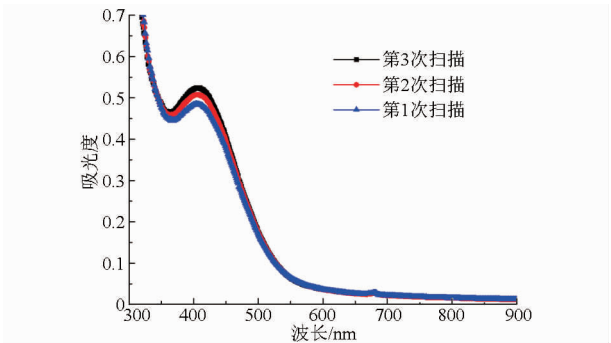


图 1 300 ~ 900 nm 全波长扫描图

Fig.1 Scanning in wavelength of 300 ~ 900 nm

从表 1 中可以看出超声处理不仅可以大大缩短提取时间, 而且可以使提取更充分, mPPO 活力显著高于低温 4℃ 浸提 4 h ($p < 0.05$)。超声提取 10 min 时, mPPO 比活力显著高于超声提取 5 min 及 15 min 时比活力 ($p < 0.05$)。但超声提取 10 min 时比活力与低温 4℃ 浸提 4 h 比活力并无显著差异 ($p > 0.05$), 但超声提取 10 min 可以大大缩短提取时间, 所以超声处理 10 min 作为 mPPO 粗酶液提取的条件最合理。

表 1 提取方式及时间对 mPPO 活性的影响
Tab.1 Influence of extraction method and time on mPPO activity

提取方式	时间	酶活/(U·mL ⁻¹)	蛋白质质量/mg	比活力/(U·mg ⁻¹)
4℃ 浸提	1 h	602 134 ± 1 142 ^c	96.5 ± 2.5 ^c	6 239.73 ± 101.2 ^d
	2 h	707 566 ± 2 107 ^d	105.4 ± 1.9 ^c	6 713.15 ± 99.8 ^b
	4 h	901 102 ± 2 501 ^c	116.8 ± 2.8 ^b	7 714.91 ± 87.5 ^a
超声处理	5 min	904 211 ± 1 085 ^c	121.4 ± 3.1 ^b	7 448.20 ± 121.3 ^b
	10 min	1 171 000 ± 2 279 ^a	150.5 ± 2.2 ^a	7 780.73 ± 145.2 ^a
	15 min	1 005 420 ± 2 654 ^b	155.9 ± 4.5 ^a	6 449.13 ± 104.5 ^c

注:不同小写字母表示同一列之间有显著性差异($p < 0.05$)。

2.2 硫酸铵沉淀

在进行硫酸铵沉淀时,硫酸铵主要起盐析作用,使蛋白质在不同的浓度下沉淀出来。从图 2 中可以看出在硫酸铵饱和度 30%、40%、50%、60% 时沉淀出来的蛋白较多,显著高于 70%、80% 时沉淀的蛋白含量($p < 0.05$),在饱和度 40% 时沉淀出来最多。在硫酸铵饱和度 80% 时比活力显著高于其他饱和度($p < 0.05$)。饱和度 30% 时比活力最低。从图 2 还可看出,当饱和度为 20% 时,比活力也较高,但此饱和度下沉淀的蛋白稳定性很差,透析 24 h 后酶活丢失 80% (数据未列出)。50% ~ 80% 饱和度下比活力较高,试验选取此饱和度进行硫酸铵分级分离。经硫酸铵 50% ~ 80% 分级沉淀后的酶比活力为 32 001.33 U/mg,比原粗酶液的比活力增加了 25 981.71 U/mg。

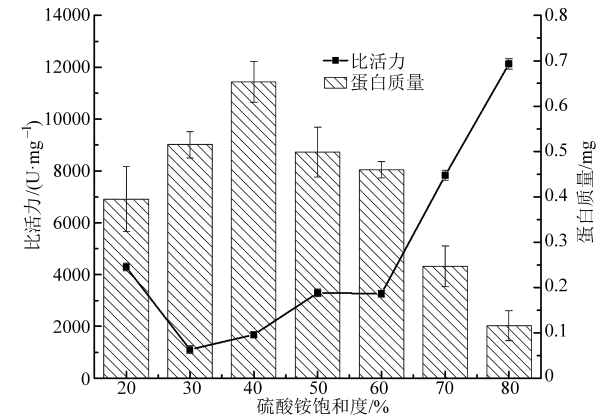


图 2 不同饱和度下硫酸铵沉淀

Fig. 2 Percentage ammonium sulphate precipitate fraction

2.3 离子交换柱层析

DEAE Sepharose Fast Flow 是弱阴离子交换柱,对酸性蛋白质具有很强的吸附能力。在低盐洗脱缓冲溶液中,酸性蛋白质可以牢固地吸附在柱子上。而其他呈电正性或吸附能力较弱的蛋白则在洗脱的过程中被除去。将经过 80% 硫酸铵盐析并透析后得到的蛋白质溶液再经 DEAE Sepharose Fast Flow 柱层析分离。

由图 3 可见,梯度洗脱过程中酶活随着 NaCl 浓度的升高而一直持续出现且有几个峰值,但是并无显著区别。且蛋白含量(图中用 280 nm 处紫外吸光

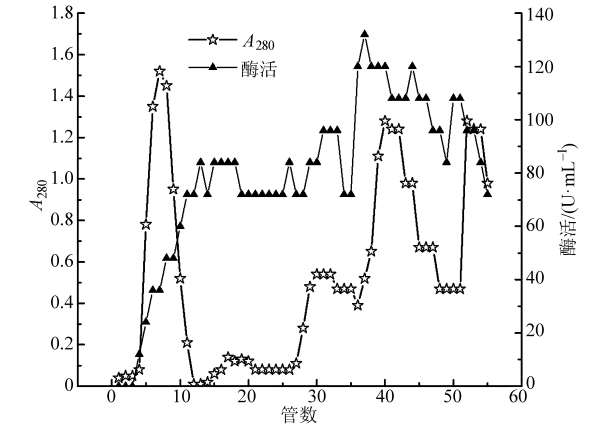


图 3 0 ~ 0.5 mol/L NaCl 线性洗脱曲线

Fig. 3 Chromatographic elution profile of mPPO with a liner gradient of 0 ~ 0.5 mol/L

度 A_{280} 表示)也随着 NaCl 浓度的升高而一直持续出现,没有明显的蛋白吸收峰,表明 0 ~ 0.5 mol/L NaCl 梯度洗脱并不能达到分离纯化的效果。

在试验中发现,当采用不含 NaCl 的平衡缓冲液进行洗脱时,出现一个大的蛋白吸收峰,说明不含 NaCl 的平衡缓冲液能洗下某些杂蛋白,而采用 0、0.1、0.2、0.4、0.5 mol/L NaCl 的平衡缓冲液在梯度洗脱过程中,每个浓度洗脱下,均出现蛋白洗脱峰,其中 0.4 mol/L 和 0.5 mol/L NaCl 浓度下蛋白洗脱峰较高(图 4),但此蛋白吸收峰对应的酶活较低。而 0.1 mol/L NaCl 浓度下酶活最大,且在第 25、26、27 管酶活最高。因此,mPPO 柱层析时,选择浓度为

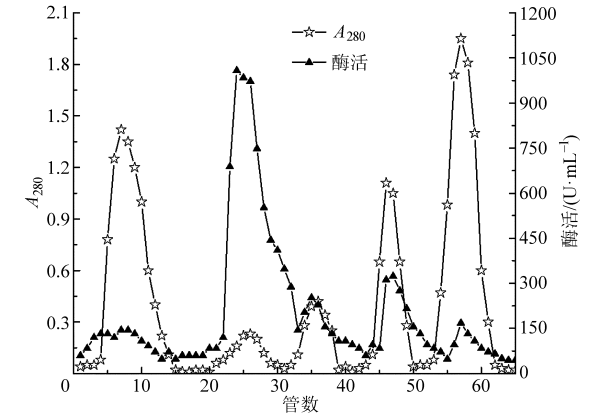


图 4 0、0.1、0.2、0.4、0.5 mol/L NaCl 洗脱曲线

Fig. 4 Chromatographic elution profile of mPPO with gradients of 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5 mol/L

0.1 mol/L 的 NaCl 进行洗脱,选择酶活最高的洗脱液收集、脱盐、浓缩。

2.4 纯化结果分析

如表 2 所示,富士苹果的 mPPO 粗提液经过硫酸铵盐析、DEAE Fast Flow 柱层析分离后,被纯化了 64.30 倍。Zaini 等^[14]采用 1.5% Triton X-114、40%~80% 硫酸铵沉淀、hitrap phenyl sepharose high performance column 及 superdex 200HR 10/30 column 纯化蛇皮果 mPPO 的纯化倍数为 14.1 倍,比活力为 15.16 U/mg。与此相比,本研究的纯化倍数提高了

3 倍多。而且纯化后的 mPPO 比活力大大高于其他植物中纯化的 mPPO,比如枇杷(91.5 U/mg)^[15]、茄子(4 952 U/mg)^[16]。

采用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测纯化后的酶液,考马斯亮蓝 R-250 进行蛋白染色,结果显示为单一蛋白带(图 5a),其分子量约为 67 kDa,高于茄子^[4]、柿子^[16]和桃^[17]。Native-PAGE 凝胶电泳检测分离纯化后的蛋白质,结果显示也为单一电泳带(图 5b),分子量约为 130 kDa,表明 mPPO 为亚基 67 kDa 的二聚体。

表 2 富士 mPPO 提取过程比活力及纯化倍数变化
Tab.2 Purification of mPPO from Fuji apple

纯化步骤	体积/mL	总酶活/U	总蛋白质质量/mg	比活力/(U·mg ⁻¹)	得率/%	纯化倍数
1.5% Triton X-100 粗提	150	951 100	158.01	6 019.62	100	1
温度诱导分离	100	659 800	72.60	9 088.15	45.95	1.51
50%~80% 硫酸铵沉淀	14	240 010	7.50	32 001.33	10.33	5.32
DEAE Fast Flow 柱层析	50	35 220	0.09	387 032.97	1.21	64.30

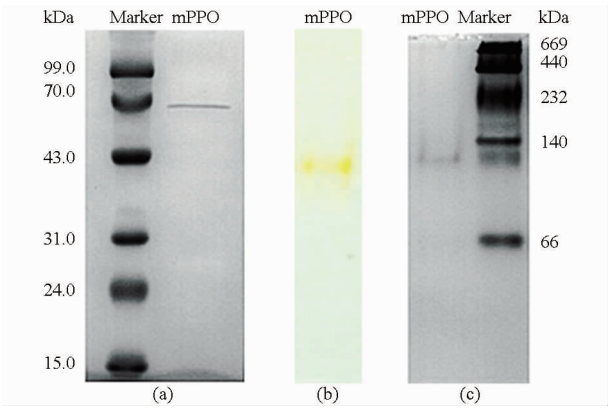


图 5 纯化后 mPPO 的 SDS-PAGE 和 Native-PAGE 图
Fig.5 SDS-PAGE and Native-PAGE analysis of purified mPPO
(a) SDS-PAGE (b) Native-PAGE 邻苯二酚染色
(c) Native-PAGE 考马斯亮蓝染色

2.5 质谱分析鉴定

为精确鉴定出所纯化出的蛋白质,采用 LC-ESI-MS/MS 进行分析。胶上蛋白经胰蛋白酶酶解后,将蛋白质多肽片段进入 LC-ESI-MS/MS 进行

质谱分析,均有质谱信号,所得质谱结果经 Mascot 及 BLAST 数据库检索后,得出的匹配蛋白为苹果属 (*Malus domestica*) 的多酚氧化酶 (polyphenol oxidase IIa),序列号为 384563679,匹配度分值为 1 113.76 分,覆盖范围为 51.67%。

3 结论

(1)确定了 mPPO 提取条件:粗酶液经 0.25% Triton X-100 均质及温度诱导后进行 10 min 超声提取,在 50%~80% 饱和度硫酸铵中沉淀透析,然后用 DEAE Sepharose Fast Flow 层析柱 0.1 mol/L NaCl 进行梯度洗脱,收集酶活最高的洗脱液。

(2)该酶被纯化了 64.30 倍,比酶活远高于其他研究中提取的多酚氧化酶。

(3)此蛋白经过串联质谱分析后,在数据库中检索到与之相匹配度为 51.67% 的蛋白,属于 PPO 蛋白。

(4)mPPO 为亚基相对分子质量 67 kDa 的二聚体蛋白。

参 考 文 献

1 Ibrahim G E, Hassan I M, Abd-Elrashid A M, et al. Effect of clouding agents on the quality of apple juice during storage [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(1): 91-97.
2 Chazarra S, Cabanes J, Escribano J, et al. Partial purification and characterization of latent polyphenol oxidase in iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44(4): 984-988.
3 胡婉峰. 苹果中病程相关蛋白的纯化、表征及高压二氧化碳对其活性和结构的影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2011.
4 Mishra B B, Gautam S, Sharma A. Purification and characterization of polyphenol oxidase (PPO) from eggplant (*Solanum melongena*) [J]. Food Chemistry, 2012, 134(4): 1855-1861.
5 Casado-Vela J, Selles S, Bru R. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* cv. Muchamiel) [J]. Journal of Food Biochemistry, 2005, 29(4): 381-401.

- character of bittern-solidified Tofu[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2013, 44(9): 162–168. (in Chinese)
- 11 Tang C H, Chen L, Foegeding E A. Mechanical and water-holding properties and microstructures of soy protein isolate emulsion gels induced by CaCl_2 , Glucono- δ -lactone (GDL), and transglutaminase; influence of thermal treatments before and/or after emulsification [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(8): 4071–4077.
- 12 Maltais A, Remondetto G E, Gonzalez R, et al. Formation of soy protein isolate cold-set gels: protein and salt effects [J]. Journal of Food Science, 2005, 70(1): C67–C73.
- 13 Bourne M. Food texture and viscosity: concept and measurement[M]. San Diego: Academic Press, 2002.
- 14 Gülseren İ, Corredig M. Interactions at the interface between hydrophobic and hydrophilic emulsifiers: polyglycerol polyricinoleate (PGPR) and milk proteins, studied by drop shape tensiometry [J]. Food Hydrocolloids, 2012, 29(1): 193–198.
- 15 Knoth A, Scherze I, Muschiolik G. Stability of water-in-oil-emulsions containing phosphatidylcholine-deleted lecithin [J]. Food Hydrocolloids, 2005, 19(3): 635–640.
- 16 Garti N, Aserin A, Cohen Y. Mechanistic consideration on the release of electrolytes from multiple emulsions stabilized by BSA and nonionic surfactants [J]. Journal of Controlled Release, 1994, 29(1–2): 41–51.
- 17 Omotosho J A, Law T K, Whateley T L, et al. The stabilization of W/O/W emulsions by interfacial interaction between albumin and nonionic surfactants [J]. Colloids and Surfaces, 1986, 20(1–2): 133–144.
- 18 Ould Eleya M M, Ko S, Gunasekaran S. Scaling and fractal analysis of viscoelastic properties of heat-induced protein gels [J]. Food Hydrocolloids, 2004, 18(2): 315–323.
- 19 Nagano T, Tokita M. Viscoelastic properties and microstructures of 11S globulin and soybean protein isolate gels: magnesium chloride-induced gels [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(7): 1647–1654.
- 20 Hermansson A M. Soy protein gelation [J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 1986, 63(5): 658–666.
-

(上接第 197 页)

- 6 Li G, Ying M, Shi J, et al. The purification and characterisation of polyphenol oxidase from green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. Food Chemistry, 2009, 117(1): 143–151.
- 7 Sener A, Ümit Ünal M. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Akko XIII Loquat (*Eriobotrya japonica* cv Akko XIII) [J]. Food Biotechnology, 2011, 25(1): 30–42.
- 8 García-García M I, Hernández-García S, Sánchez-Ferrer Á, et al. Kinetic study of hydroxytyrosol oxidation and its related compounds by red globe grape polyphenol oxidase [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(25): 6050–6055.
- 9 Ni Eidhin D M, Murphy E, O’Beirne D. Polyphenol oxidase from apple (*Malus domestica* Borkh. cv Bramley’s Seedling): purification strategies and characterization [J]. Journal of Food Science, 2006, 71(1): 51–58.
- 10 Rahman A N, Ohta M, Nakatani K, et al. Purification and characterization of polyphenol oxidase from cauliflower (*Brassica oleracea* L.) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(14): 3673–3678.
- 11 Navarro J L, Tárrega A, Sentandreu M A, et al. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from persimmon [J]. Food Chemistry, 2014, 157: 283–289.
- 12 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1–2): 248–254.
- 13 王建晖. 涂膜对芒果常温贮藏品质、生理生化的影响及果实 PPO 酶学特性、分离纯化的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- 14 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.
- 15 Sellés-Marchart S, Casado-Vela J, Bru-Martí R. Isolation of a latent polyphenol oxidase from loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.): kinetic characterization and comparison with the active form [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2006, 446(2): 175–185.
- 16 Navarro J L, Tárrega A, Sentandreu M A, et al. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from persimmon [J]. Food Chemistry, 2014, 157: 283–289.
- 17 Cabanes J, Escribano J, Gandía-Herrero F, et al. Partial purification of latent polyphenol oxidase from peach (*Prunus persica* L. cv. Catherina). Molecular properties and kinetic characterization of soluble and membrane-bound forms [J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2007, 55(25): 10446–10451.
- 18 罗磊, 周燕燕, 朱文学, 等. 金银花多酚氧化酶特异性与抑制剂动力学研究[J]. 农业机械学报, 2014, 45(7): 202–208. Luo Lei, Zhou Yanyan, Zhu Wenxue, et al. Specificity and inhibition kinetics of polyphenol oxidase from honeysuckle [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2014, 45(7): 202–208. (in Chinese)