

## 氧化白藜芦醇协同抗坏血酸抑制余甘子酶促褐变的机制研究

陈 军<sup>1</sup>, 陈洪彬<sup>1</sup>, 郭凤仙<sup>1</sup>, 郑瑞生<sup>1</sup>, 林河通<sup>2</sup>, 郑宗平<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>福建省海洋藻类活性物质制备与功能开发重点实验室 泉州师范学院海洋与食品学院 福建泉州 362000

<sup>2</sup>福建农林大学食品科学学院 福州 350002)

**摘要** 通过研究氧化白藜芦醇协同抗坏血酸对余甘子酶促褐变的抑制作用,以及对其多酚氧化酶的酶抑制动力学研究,探明氧化白藜芦醇联合抗坏血酸协同抑制褐变酶的作用机理。结果表明,0.02%氧化白藜芦醇、0.15%抗坏血酸、0.02%氧化白藜芦醇+0.15%抗坏血酸均能减缓余甘子的酶促褐变,对 3 种褐变酶即多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性均有较好的抑制作用;0.02%氧化白藜芦醇+0.15%抗坏血酸联合处理对余甘子的酶促褐变及对 PPO、POD、PAL 的抑制活性强于单独使用。酶抑制动力学结果表明,氧化白藜芦醇对 PPO 的 IC<sub>50</sub> 为 (3.300±0.010) μmol/L,抑制机理为可逆的混合型抑制,而氧化白藜芦醇+抗坏血酸(1:7)的 IC<sub>50</sub> 为 (1.600±0.020) μmol/L,抑制机理为可逆的竞争性抑制,协同使用导致抑制方式也发生改变。氧化白藜芦醇对 PPO 的抑制常数 K<sub>i</sub> 为 0.904 μmol/L,对 PPO-底物形成的复合物的抑制常数 K<sub>is</sub> 为 14.285 μmol/L,而氧化白藜芦醇+抗坏血酸(1:7)对 PPO 的抑制常数 K<sub>i</sub> 为 0.840 μmol/L,联合处理对 PPO 的抑制性加强。

**关键词** 余甘子; 酶促褐变; 氧化白藜芦醇; 抗坏血酸; 酶抑制动力学

**文章编号** 1009-7848(2023)01-0240-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.01.023

余甘子(*Phyllanthus emblica*)为大戟科植物余甘子的果实,为热带、亚热带地区特色水果,在我国主要分布在福建、广西、广东、云南、海南等省份<sup>[1]</sup>。余甘子具有健胃止咳、清热凉血、治疗血瘀、减轻腹痛、缓解喉咙干疼、清新口腔的药用价值<sup>[2-4]</sup>。现代药理研究表明,余甘子对高血压<sup>[5]</sup>、糖尿病<sup>[6]</sup>具有一定的预防和治疗作用,并且具有抗病毒<sup>[7]</sup>、抗炎<sup>[8]</sup>、抗肿瘤<sup>[9]</sup>、抗氧化<sup>[10]</sup>、抗癌<sup>[11]</sup>、护肝<sup>[12]</sup>等功效。现有研究主要集中在余甘子的药理作用和药用价值,而对余甘子采后加工贮藏及抗褐变鲜有研究。余甘子采后在加工和贮藏过程中逐渐变黄,形成果实褐变,在余甘子果汁饮料加工过程中,随着时间的延长,会出现褐色沉淀,影响其感官、营养价值。因此,减缓余甘子在采后贮藏和加工过程中的褐变问题,对余甘子资源的开发具有重要意义。

酶促褐变是引起果蔬褐变的重要原因,主要通过多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶等酶以及氧气的参与,将酚类物质氧化成醌类物质,醌类物质进一步氧化聚合或通过非酶促褐变反应与蛋白质

等大分子物质聚合缩合,形成褐变物质,导致果蔬的营养、感官、经济价值降低<sup>[13]</sup>。抑制酶促褐变可从氧气、酚类物质和褐变酶等 3 个方面入手,通过隔绝氧气、钝化酶活性、抑制酶的活性等手段抑制或减缓酶促褐变的发生,通过阻止酶、底物、氧气同时存在且相互接触的方法阻止酶促褐变的发生<sup>[14]</sup>。

氧化白藜芦醇(Oxyresveratrol,OXY)为二苯乙烯类物质,前期研究表明,OXY 对多酚氧化酶有很强抑制作用,抑制活性远胜于曲酸<sup>[15-16]</sup>。Wang 等<sup>[17]</sup>以酪氨酸为底物,研究 OXY 对 PPO 的抑制机制为可逆的混合型抑制。近几年,OXY 被广泛应用于水果、蔬菜的抗褐变研究,结果表明其有很好的效果。陈春等<sup>[18]</sup>研究 OXY 对苹果鲜切片及鲜榨果汁的抗褐变作用,表明 OXY 对贮藏期苹果的多酚氧化酶活性、过氧化物酶活性有较好的抑制作用,能显著降低褐变度。在实际应用中,复合护色剂对果蔬的鲜切片或鲜榨果蔬汁进行护色有更好的效果,He 等<sup>[19-20]</sup>利用 OXY 和抗坏血酸(VC)对藕片、葡萄汁的抗褐变效果,研究表明,复合使用的抗褐变效果比单独使用 OXY 更好。Li 等<sup>[21]</sup>也发现单独使用 OXY 对苹果鲜切片抗褐变效果没有联合使用 OXY+VC 的效果好。到目前为止,研究

收稿日期: 2022-01-13

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2018J01440)

第一作者: 陈军,男,硕士生

通信作者: 郑宗平 E-mail: zzpsea@qut.edu.cn

者多以单一抑制剂对多酚氧化酶进行抑制研究,而利用复合抑制剂对多酚氧化酶抑制机制的研究鲜有报道。本研究采用 OXY 联合 VC 对余甘子切片进行抗褐变研究,同时研究其酶抑制动力学,探明 OXY 联合 VC 对余甘子的多酚氧化酶的协同抑制机理,为余甘子采后贮藏和加工过程中抗褐变提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

余甘子(品种为“玻璃甘”),泉州水果批发市场;二甲基亚砜(DMSO)、十二水合磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠、聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)、抗坏血酸(VC)、创愈木酚、苯丙氨酸、焦性没食子酸、4-己基间苯二酚(4-HR)、PPO, Sigma 公司;30%过氧化氢、盐酸(分析纯级),国药集团化学试剂有限公司;氧化白藜芦醇,上海源叶生物有限公司;试验用水为去离子水。

ZRX-260 低温人工气候箱,宁波赛福实验仪器有限公司;T6 新世纪紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;H2050R 型台式高速大容量冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;Infinite M200 Pro 酶标仪,瑞士帝肯公司;ADCI 系列全自动色差计,北京辰泰克仪器技术有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 余甘子切片的  $L$  值、 $\Delta E$  的测定 挑选大小、成熟度一致,无机械损伤的新鲜余甘子,洗净,切成直径约为 2~3 cm 的余甘子果片,将切好的余甘子切片浸泡于 500 mL 待护色溶液中,3 min 后取出沥干,放于塑料平板上,于室温下晾干后,置于相对湿度为 85%,温度为 25 °C 恒温恒湿培养箱中贮藏,经预试验,测试样品包括去离子水(CK)、0.02% OXY、0.01% 4-HR、0.15% VC、0.02% OXY + 0.15% VC、0.01% 4-HR + 0.15% VC 溶液。

将浸泡护色液后晾干的余甘子切片用 ADCI 色差计测量余甘子切片的  $L$ (亮度)、 $a$ (红-绿)和  $b$ (黄-蓝)值,在间隔时间为 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 h 时,分别测出其色差值,不同组样品各测量 10 个不同余甘子切片,取平均值, $\Delta E$  代表不同样品总色差度,计算公式如下<sup>[21]</sup>:

$$\Delta E = \sqrt{(L_t - L_0)^2 + (a_t - a_0)^2 + (b_t - b_0)^2} \quad (1)$$

式中, $\Delta E$ ——总色差度; $L_t, a_t, b_t$ —— $t$  时刻的  $L, a, b$  值; $L_0, a_0, b_0$ ——0 时刻的  $L, a, b$  值。

1.2.2 余甘子切片褐变度的测定 参照关正萍等<sup>[23]</sup>的方法略有改动,将经液氮处理的余甘子果片用万能粉碎机粉碎,各组称取 2 g 余甘子粉末,冰浴研磨,12 000 r/min 条件下离心 15 min,取上清液,定容 10 mL 后,经酶标仪测定在 420 nm 波长处的吸光值,平行操作 3 次,以每克鲜重在波长 420 nm 处吸光值表示褐变度( $OD_{420nm}/g$ )。

1.2.3 余甘子切片 PPO、POD、PAL 的提取 将经液氮处理的余甘子果片用万能粉碎机粉碎,各组称取 2 g 余甘子粉末用含 2% PVPP、0.1% VC、磷酸盐缓冲液(磷酸二氢钠和磷酸氢二钠混合配制而成,pH 6.8)冰浴研磨,经 2 000 r/min 离心 15 min,取上清液,定容至 10 mL,制得粗酶液。

1.2.4 余甘子切片 PPO 活性的测定 酶的活性测定方法参照谢征芸等<sup>[24]</sup>的方法略有改动,即向试管中加入 1 mL 磷酸盐缓冲液(pH 6.8)配成的 0.1 mol/L 的焦性没食子酸溶液,1.5 mL 磷酸盐缓冲液(pH 6.8),放入 30 °C 水浴 2 min 后,以去离子水做参比液,加入 0.5 mL 酶液,立刻测试在 420 nm 波长下的吸光值,测试之后立刻倒回试管,放入 30 °C 水浴锅中,反应 5 min 后,立刻测定 420 nm 波长下的吸光值,平行操作 3 次,定义每分钟每克余甘子酶促反应吸光值增加 0.001 为 1 个酶活力单位(U),PPO 活性单位为 U/g·min。

$$\text{PPO 活性} = \frac{\Delta A_{420nm} \times V_T}{M \times V_s \times 0.001 \times T} \quad (2)$$

式中, $\Delta A_{420nm}$ ——酶反应前、后吸光值之差; $V_T$ ——酶液提取的总体(mL); $M$ ——待测材料的质量(g); $V_s$ ——测定时所取样品提取液体积(mL); $T$ ——反应时间(min)。

1.2.5 余甘子切片 POD 的测定 过氧化物酶活性测定参照曹健康等<sup>[25]</sup>方法略有改动,吸取 3.0 mL 由磷酸盐缓冲液(pH 6.8)配成的 25 mmol/L 愈创木酚溶液和 0.1 mL 酶液,置于 30 °C 水浴 2 min,加入 0.1 mL 2 mol/L 的  $H_2O_2$  溶液,将反应混合液迅速倒入比色皿,在 475 nm 波长下测定吸光值,结果记为  $OD_0$ ,以去离子水为参比液,测量后倒回试管,在 30 °C 下水浴预热 5 min 后,测量反应

溶液吸光值,记为  $OD_1$ ,做差得  $\Delta A_{475nm}$ ,以每分钟每克余甘子酶促反应吸光值增加 0.01 为 1 个过氧化酶活性单位(U),平行操作 3 次,POD 活性单位为  $U/g \cdot min$ 。

$$POD \text{ 活性} = \frac{\Delta A_{475nm} \times V}{0.01 \times V_s \times t \times m} \quad (3)$$

式中, $\Delta A_{475nm}$ ——酶反应前、后吸光值之差; $V$ ——酶液提取的总体积(mL); $V_s$ ——测定时所取样品提取液的体积(mL); $t$ ——反应时间(min); $m$ ——待测材料的质量(g)。

1.2.6 余甘子切片 PAL 活性的测定 酶液提取同 1.2.3 节的方法,PAL 活性测定参照曹健康等<sup>[25]</sup>的方法,平行操作 3 次,PAL 活性单位为  $U/g \cdot h$ 。

$$PAL \text{ 活性} = \frac{(OD_1 - OD_0) \times V}{0.01 \times V_s \times T \times m} \quad (4)$$

式中, $OD_1$ ——反应 60 min 后的吸光值; $OD_0$ ——反应 0 min 时的吸光值; $V$ ——样品液提取的总体积(mL); $V_s$ ——测定时所取样品提取液体积(mL); $T$ ——酶促反应时间(h); $m$ ——样品质量(g)。

1.2.7 OXY、OXY+VC 对 PPO 抑制活性的测定 参考张龙<sup>[26]</sup>的方法,并做适当修改。将抑制剂样品溶解于 DMSO 中配制成 1 mmol/L 的溶液,用去离子水稀释成所需浓度。然后将底物 L-DOPA 和 PPO 溶解在磷酸盐缓冲溶液(pH 6.8)中,分别配成浓度为 1 mmol/L 和 200 U/mL 的溶液,4 °C 避光保存待用。先在试管中加入 3.0 mL 底物 L-DOPA 溶液,然后向其中添加 100  $\mu$ L 不同浓度的 OXY、OXY+VC 溶液,用漩涡混匀器混匀,放置于 30 °C 水浴锅中温浴 2 min,最后加入 100  $\mu$ L PPO 溶液,立刻混匀,用紫外可见分光光度计于 475 nm 波长处测定吸光值,在 30 °C 恒温条件下继续反应 10 min 后,再次测定体系在 475 nm 波长处吸光度,平行操作 3 次。100  $\mu$ L DMSO 代替体系中的 OXY、OXY+VC 溶液作为空白对照;不同浓度曲酸(KA)、KA+VC 溶液作为阳性对照。 $IC_{50}$  为使 PPO 活力下降至 50% 时 OXY、OXY+VC 的浓度。采用公式(5)计算化合物对 PPO 活性的抑制率:

$$\text{抑制率} = \frac{[(A_2 - A_1) - (B_2 - B_1)]}{A_2 - A_1} \times 100\% \quad (5)$$

式中, $A_1$ ——空白组 0 min 的吸光度; $A_2$ ——空白组 10 min 后的吸光度; $B_1$ ——样品组 0 min

的吸光度; $B_2$ ——样品组 10 min 后的吸光度。

1.2.8 OXY+VC 相互作用的评价 参考王庆华等<sup>[27]</sup>的方法略有改动,两种复合抑制剂对 PPO 的作用,用相互作用系数  $\gamma$  表示,当  $\gamma > 1$  时,表示为拮抗作用,当  $\gamma < 1$  时,表示为协同作用。 $\gamma$  值越大,表明拮抗作用越强, $\gamma$  值越小,表示协同作用越强。

$$\gamma = \frac{IC_{50a}}{IC_{50A}} + \frac{IC_{50b}}{IC_{50B}} \quad (6)$$

式中, $IC_{50A}$ 、 $IC_{50B}$ ——分别表示抑制剂 A、B 单独使用时,对 PPO 抑制率为 50% 时的质量浓度( $\mu$ mol/L); $IC_{50a}$ 、 $IC_{50b}$ ——分别表示抑制剂 A、B 复合使用时,对 PPO 抑制率为 50% 时的质量浓度( $\mu$ mol/L)。

1.2.9 OXY、OXY+VC(1:7)对 PPO 抑制作用方式的测定 参照张龙<sup>[26]</sup>方法略有改动。加入 3.0 mL 由磷酸盐缓冲液(pH 6.8)配成的浓度为 1 mmol/L 的 L-DOPA,然后加入 100  $\mu$ L 不同浓度的抑制剂,30 °C 水浴 2 min,加入 100  $\mu$ L 不同浓度的 PPO,立刻混匀,用紫外可见分光光度计于 475 nm 波长处测定吸光值,在 30 °C 恒温条件下继续反应 10 min 后,再次测定体系吸光度,测定体系吸光值变化,用酶促反应速度  $V$  ( $OD_{475nm}/min$ )与 PPO 的浓度作图,根据曲线特点判断该抑制剂对 PPO 的抑制作用方式。若得到一组相交于原点的直线,则抑制剂对 PPO 的抑制方式为可逆抑制;若得到一组不相交的平行直线,则为不可逆抑制。

1.2.10 OXY、OXY+VC 对 PPO 抑制类型和抑制常数的测定 参照张龙<sup>[26]</sup>方法略有改动,向试管中加入 3 mL 不同浓度的 L-DOPA 溶液,在 30 °C 水浴条件下,测定不同浓度的抑制剂对 PPO 活力的影响,此时 PPO 溶液加入量是 0.1 mL,浓度为 200 U/mL,最后采用以 L-DOPA 浓度的倒数  $S^{-1}$  为横坐标,以酶促反应速率( $OD_{475nm}/min$ )的倒数  $V^{-1}$  为纵坐标的双倒数作图法作图,根据图形特点来判断抑制类型。以直线的斜率(Slope)和纵坐标的截距(Intercept)分别对抑制剂浓度进行二次作图,可求得相应的抑制剂对游离酶的抑制常数  $K_I$  以及对酶-底物复合物的抑制常数  $K_{IS}$ ,如公式(7)、(8)所示:

$$\text{Slope} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \quad (7)$$

$$\text{Intercept} = \frac{1}{V_{\max}} \times \left(1 + \frac{I}{K_{IS}}\right) \quad (8)$$

式中,  $K_m$ ——米氏常数;  $V_{\max}$ ——最大反应速度 (mol/L·min);  $[I]$ ——抑制剂浓度 (mol/L);  $K_I$ ——抑制剂对游离酶的抑制常数 ( $\mu\text{mol}$ );  $K_{IS}$ ——酶-底物复合物的抑制常数 ( $\mu\text{mol}$ )。

1.2.11 数据处理 数据经过 Excel 处理, 经 Sigma.Plott 12.5 软件绘制, 显著性差异经 SPSS Statistics 22.0 软件处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 OXY 协同 VC 对余甘子 L 值、 $\Delta E$ 值的影响

从图 1a 可以看出, 随着时间的延长, 各处理组的 L 值均呈下降趋势, 对照组 (CK) L 值下降最快且最低, OXY+VC 处理组的 L 下降最慢且最高, OXY、4-HR+VC、VC、4-HR 处理组的余甘子 L 值依次降低。0~6 h, OXY、VC、OXY+VC、4-HR+VC

处理组的 L 值相差不大; 6~12 h 期间, OXY 和 OXY+VC 联合处理组的 L 值仍相差不大, 然而 VC、4-HR+VC 处理组 L 值下降速度变快; 从 12 h 开始, OXY 处理组 L 值与 OXY+VC 联合处理组差距逐渐加大, OXY+VC 复合处理组的余甘子 L 值均高于 OXY、VC 单独处理组, 表明 OXY 联合 VC 后, 对抑制余甘子切片 L 值下降的效果比单独使用更佳。

从图 1b 可以看出, 各组的  $\Delta E$  值均随着时间的延长而增加。在 0~12 h, OXY、VC、OXY+VC、4-HR、4-HR+VC 组的  $\Delta E$  值相差不大; 12~36 h, 4-HR 组的  $\Delta E$  值高于 VC、4-HR+VC。总体来看, CK、4-HR、VC、4-HR+VC、OXY、OXY+VC 组的  $\Delta E$  值依次降低, 表明 4-HR、VC、4-HR+VC、OXY、OXY+VC 均对余甘子的  $\Delta E$  值的上升有抑制作用, 单独组余甘子切片的  $\Delta E$  值高于联合组, 表明联合使用对余甘子切片  $\Delta E$  值升高的抑制作用比单独使用强。

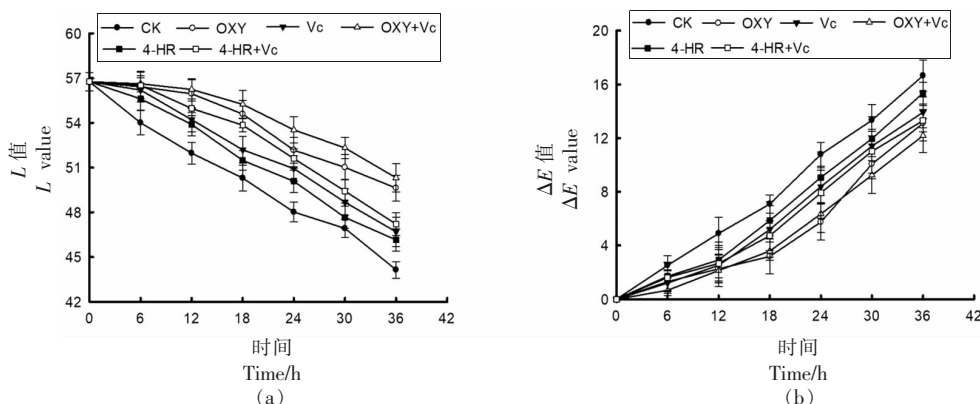


图 1 OXY 协同 VC 对余甘子 L 值(a)、 $\Delta E$  值(b)的影响

Fig.1 Effects of OXY + VC on L value (a),  $\Delta E$  (b) values of *P. emblica*

### 2.2 OXY 协同 VC 对余甘子褐变度的影响

褐变度是褐变现象最直观的表现, 褐变度高表示褐变程度大, 对产品造成的视觉效果最为明显, 是影响感官价值的直接指标。从图 2 可以看出, 各组的褐变度值均随着时间的延长而增加, 在 0~6 h, 各组的褐变度缓慢增加, 6~24 h 期间快速增加, 24~36 h 呈缓慢增加的趋势。在 0~12 h, OXY、OXY+VC 组的褐变度没有明显变化且两组

的褐变度值相差不大, 其它组的褐变度值快速增加且高于 OXY、OXY+VC 组, 说明在 0~12 h, OXY、OXY+VC 能明显抑制余甘子切片褐变现象的发生; 12~36 h, OXY、OXY+VC 组的褐变度快速增加, 且 OXY+VC 组的褐变度值略低于 OXY 单独组, 说明 OXY 联合 VC 处理和 OXY 单独处理对余甘子切片的褐变度值的影响在贮藏后期相差不大。

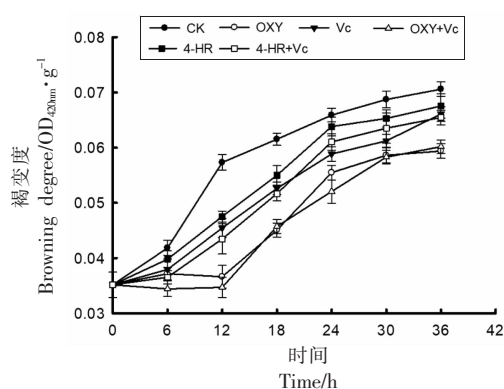


图2 OXY协同VC对余甘子褐变度的影响

Fig.2 Effects of OXY + VC on browning degree of *P. emblica*

### 2.3 OXY协同VC对余甘子PPO、POD、PAL的影响

PPO是引起褐变的关键酶,其活性的高、低与褐变程度呈正相关。从图3a可以看出,在0~6 h,除CK组外,各组的余甘子PPO活性较低且变化不大,相差不明显,说明在贮藏早期,各组对余甘子PPO的活性有较好的抑制作用;6~18 h,各组的余甘子PPO活性剧烈增加;18~36 h,各组的余甘子PPO活性缓慢降低,在18 h时,PPO活性达到最高。与各组相比,CK组的余甘子PPO活性最高,OXY+VC组的余甘子PPO活性最低,由此可知,联合处理组的余甘子PPO活性低于其单独处理组的PPO活性,说明OXY+VC联合处理对余甘子中的PPO的抑制活性能力强于OXY、VC单独处理组。

POD是引起余甘子褐变现象的另一关键性酶,在细胞内活性氧代谢的条件下,产生过氧化氢,能作为过氧化物酶反应的启动子,能使过氧化物酶迅速与酚类物质反应,形成褐变物质,从而影响感官。从图3b可以看出,各组POD活性均呈先增加后减少的趋势,在18 h时活性最高。在0~6 h,各组的余甘子POD活性较低且相差不大;在6~36 h,4-HR+VC组的POD活性远低于4-HR组,OXY单独组的POD活性远高于OXY+VC组。在整个贮藏期间,OXY+VC组的POD维持在较低水平,数据表明,各组均对余甘子切片的POD活性有抑制作用,OXY、VC联合处理比单独处理对余甘子POD活性抑制效果强。

PAL能将苯丙氨酸转化为酚类物质,酚类物质能作为酶促反应的底物,因此苯丙氨酸与褐变现象的发生有密切关系,其活性最高,表明非酚类物质向酚类物质转化越多,酶促褐变反应底物越充足。从图3c可以看出,各组的PAL活性随着时间的延长,均呈下降趋势,CK组的PAL活性保持较高水平,高于其它组,在0~6 h,4-HR、VC、4-HR+VC、OXY、OXY+VC组的余甘子切片PAL活性迅速下降;在6~18 h,4-HR、VC、4-HR+VC、OXY、OXY+VC组的余甘子切片PAL活性缓慢下降;18~36 h,又快速下降。在整个贮藏期内,OXY、VC与OXY+VC组相比,VC、OXY单独处理组PAL活性高于OXY+VC处理组,表明OXY+VC联合处理对余甘子切片中的PAL活性抑制作用强于OXY、VC单独处理。

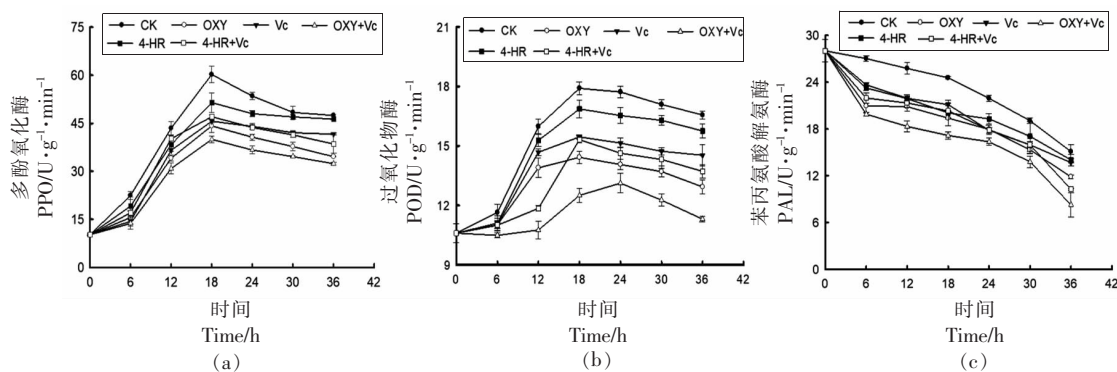


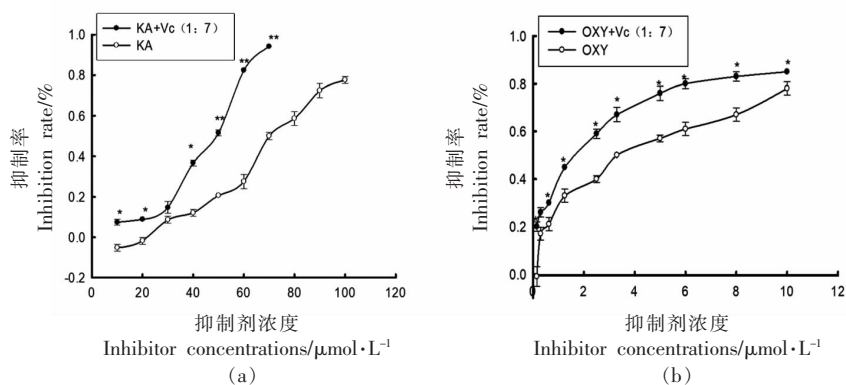
图3 OXY协同VC对余甘子PPO(a),POD(b),PAL(c)活性的影响

Fig.3 Effects of OXY+ VC on PPO(a), POD (b), PAL (c) activity of *P. emblica*

## 2.4 OXY 协同 VC 对 PPO 活性的抑制作用

从图 4 可以看出,在 OXY、OXY+VC(1:7)溶液浓度为 0~5  $\mu\text{mol/L}$  时,随着浓度的增加,PPO 活性迅速减少,其中在相同浓度下,OXY+VC(1:7)对 PPO 活性的抑制作用强于 OXY、VC 单独处理。KA、KA+VC(1:7)、OXY、OXY+VC(1:7)溶液处理的  $\text{IC}_{50}$  值分别为  $(70.005 \pm 0.805) \mu\text{mol/L}$ ,  $(48.300 \pm 1.300) \mu\text{mol/L}$ ,  $(3.300 \pm 0.010) \mu\text{mol/L}$ ,

$(1.600 \pm 0.020) \mu\text{mol/L}$ 。与阳性对照 KA 和 KA+VC(1:7)相比,KA 的  $\text{IC}_{50}$  是 OXY 的 21.210 倍,是 OXY+VC(1:7)的 43.750 倍;而 KA+VC(1:7)是 OXY 的 14.630 倍,是 OXY+VC(1:7)的 30.188 倍。综合来看,各抑制剂对 PPO 的抑制强弱能力为 OXY+VC > OXY > KA+VC(1:7) > KA。OXY 为强 PPO 抑制剂,OXY 联合 VC 处理后对 PPO 抑制作用加强且差异显著( $P < 0.05$ )。



注:\*. 表示有显著差异( $P < 0.05$ ),\*\*. 表示有极显著差异( $P < 0.01$ )。

图 4 曲酸(a)和氧化白藜芦醇(b)对余甘子 PPO 的抑制作用

Fig.4 Inhibition effects of kojic acid (a) and oxyresveratrol (b) on PPO of *P. emblica*

## 2.5 OXY、VC 对 PPO 抑制的相互作用的评价

经计算得到  $\gamma$  OXY+VC(1:7)=0.5044 < 1,表明 OXY 与 VC 对 PPO 的抑制作用有较好的协同作用,这可能与 OXY 和 VC 均有不饱和乙烯类共价键有关,既可以失去电子,又可以得到电子,两者相互促进,加强了对 PPO 的抑制作用。

## 2.6 OXY、OXY+VC 对 PPO 抑制方式的研究

从图 5 可以看出,通过对酶浓度和酶促反应速度作图,所有的图形均经过原点,随着抑制剂浓度的增加,斜率逐渐降低,表明 OXY、OXY+VC 对 PPO 活性的抑制作用均为可逆的,PPO 的活性下降是由于抑制剂的浓度增加所致,而不是由于 PPO 有效酶活力减少所致。

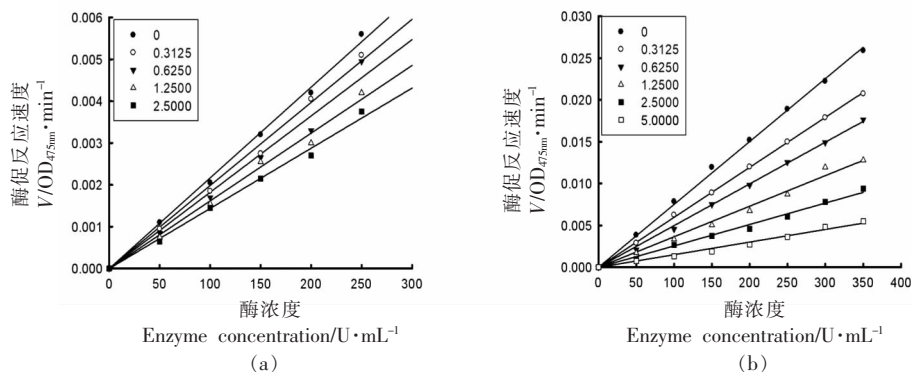


图 5 OXY (a)和 OXY+VC(1:7) (b)对 PPO 的抑制方式

Fig.5 Inhibition mode of OXY (a) and OXY+VC(1:7) (b) on PPO

## 2.7 OXY、OXY 协同 VC 对 PPO 抑制类型及抑制常数的测定

### 2.7.1 OXY 对 PPO 抑制类型及抑制常数的测定

由图 6a 可知,通过双倒数研究 OXY 对 PPO 作用获得在第二象限相交的一组直线,说明随着 OXY 浓度的增加,导致  $K_m$  值变大而  $V_{max}$  逐渐变小,说明 OXY 对 PPO 的抑制类型是混合型抑制,与文献[16]报道一致。表明 OXY 既可以与游离的 PPO 活性中心结合,阻止底物与酶接触,又可以与

PPO 和底物形成的复合物结合,阻止褐变物质的形成。以 OXY 浓度和各直线的斜率进行二次作图,得到图 6b,结合公式(7,8)可求出 OXY 对游离的 PPO 的抑制常数  $K_I$  为  $0.904 \mu\text{mol/L}$ ;以各直线  $y$  轴的截距对 OXY 浓度进行二次作图得图 6c,并结合公式(7,8)求出 OXY 对酶-底物复合物的抑制常数  $K_{IS}$  值为  $14.285 \mu\text{mol/L}$ 。抑制常数越小越好, $K_{IS} > K_I$ ,表明 OXY 对 PPO 的结合能力比 OXY 对 PPO-底物复合物的结合能力强。

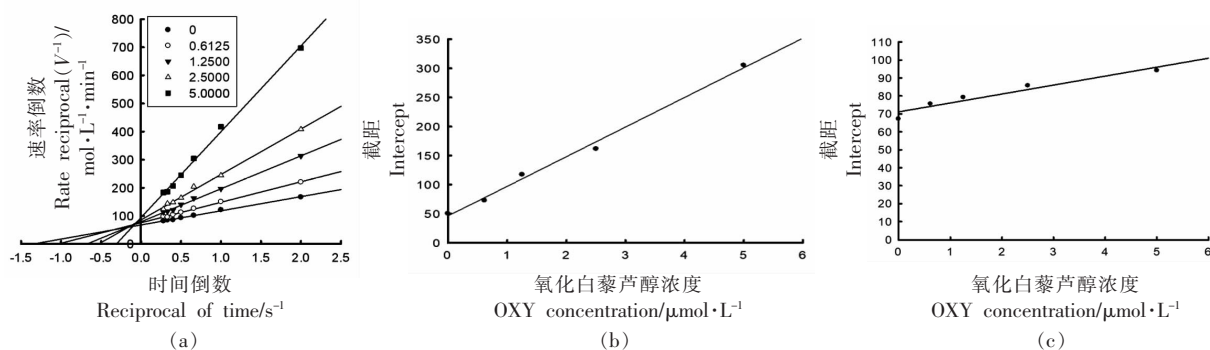


图 6 OXY 对 PPO 抑制类型(a)、抑制常数  $K_I$ (b)、 $K_{IS}$ (c)测定

Fig.6 Determination of PPO inhibition type (a) and inhibition constant  $K_I$  (b),  $K_{IS}$  (c) of OXY

2.7.2 OXY+VC 对 PPO 抑制类型及抑制常数的测定 通过双倒数作图法研究 OXY+VC (1:7)对 PPO 的抑制类型,可得到一组相交于  $y$  轴同一点的直线,如图 7a 所示,说明 OXY+VC(1:7)对 PPO 的作用是竞争性抑制类型。以各直线的斜率对

OXY+VC(1:7)浓度进行二次作图可得到一条线性良好的直线,如图 7b 所示,表明 OXY+VC(1:7)对 PPO 的抑制位点是单一的或单一类型的位点。通过这条直线结合公式(7,8),求得 OXY+VC(1:7)对 PPO 的抑制常数  $K_I$  值为  $0.840 \mu\text{mol/L}$ 。

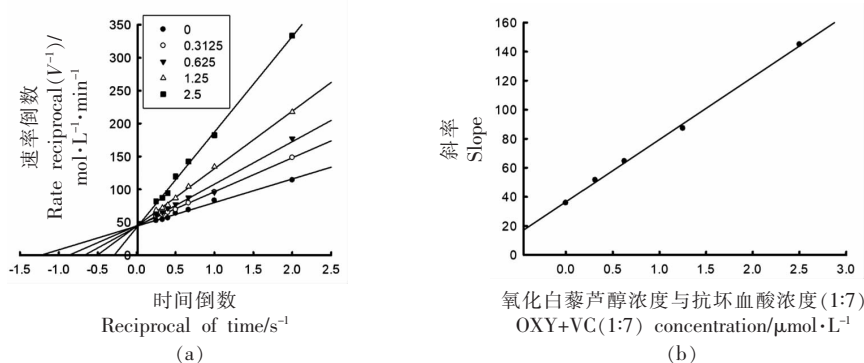


图 7 OXY+VC(1:7)对 PPO 抑制类型(a)及抑制常数  $K_I$ (b)的测定

Fig.7 Determination of PPO inhibition type (a) and inhibition constant  $K_I$  (b) of OXY+VC (1:7)

## 3 结论

氧化白藜芦醇(OXY)和抗坏血酸(VC)能减缓余甘子在加工和贮藏过程中褐变现象的发生,

二者联合处理对余甘子切片的褐变有较好的抑制效果,其途径主要通过抑制余甘子中的 PPO、POD、PAL 活性,尤其是抑制 PPO 的活性。通过酶

抑制动力学研究发现,OXY和OXY+VC对PPO的抑制方式均为可逆抑制,OXY对PPO的抑制为混合型抑制,与文献报道[16]一致。有趣的是,通过添加VC后,OXY与VC联合使用对PPO的抑制由混合型抑制变为竞争性抑制,这种联合使用方式不仅提高了OXY抗褐变能力,同时也改变了其对酶的作用方式。

### 参 考 文 献

- [1] 毛正睿. 不同干燥工艺对余甘子质量、体外降血糖及抗氧化活性的影响研究[D]. 成都: 西华大学, 2020. MAO Z R. Effect of different drying processes on the quality, hypoglycemic activity and antioxidant activity of *Phyllanthus emblica* L *in vitro*[D]. Chengdu: Xihua University, 2020.
- [2] 王淑慧, 程锦堂, 郭丛, 等. 余甘子化学成分研究[J]. 中草药, 2019, 50(20): 4873-4878. WANG S H, CHEN J T, GUO C, et al. Chemical constituents of *Phyllanthus emblica* and its anti-inflammation activities[J]. Chinese Herbal Medicines, 2019, 50(20): 4873-4878.
- [3] QIAN G, LI X, HUANG H, et al. The efficacy of a chewing gum containing *Phyllanthus emblica* fruit extract in improving oral health[J]. Current Microbiology, 2018, 75(5): 604-610.
- [4] DU Z, LIU J, LI Y, et al. Development of *Phyllanthus emblica* (L) fruit as a carrier for EGCG: Interaction and *in vitro* digestion study[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2019, 43(7): e13951.
- [5] 薛国丹, 蔡希伦. 二十五味余甘子丸联合福辛普利钠治疗原发性高血压的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2020, 35(5): 946-949. XUE G D, CAI X L. Clinical study on ershiwuwei yuganzi pills combined with fosinopril sodium in treatment of essential hypertension[J]. Drugs & Clinic, 2020, 35(5): 946-949.
- [6] SHARMA A, JOSHI T, JOSHI T, et al. In silico screening of potential antidiabetic phytochemicals from *Phyllanthus emblica* against therapeutic targets of type 2 diabetes[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 248: 112268.
- [7] YAN H, HAN L R, ZHANG X, et al. Two new anti-TMV active chalconoid analogues from the root of *Phyllanthus emblica*[J]. Natural Product Research, 2017, 31(18): 2143-2148.
- [8] JAIJOY K, SOONTHORNCHAREONNON N, PANTHONG A, et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of the water extract from the fruit of *Phyllanthus emblica* Linn[J]. International Journal of Applied Research in Natural Products, 2010, 3(2): 48-58.
- [9] 单粒子, 何林. 藏药在抗肿瘤及免疫调节方面的作用[J]. 自然杂志, 2019, 41(4): 266-274. SHAN L Z, HE L. The role of Tibetan medicine in anti-tumor and immunomodulation[J]. Chinese Journal of Nature, 2019, 41(4): 266-274.
- [10] LI W, ZHANG X, CHEN R, et al. HPLC fingerprint analysis of *Phyllanthus emblica* ethanol extract and their antioxidant and anti-inflammatory properties[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 254: 112740.
- [11] ZHAO T, SUN Q, MAUD M, et al. Anticancer properties of *Phyllanthus emblica* (Indian Gooseberry)[J]. Oxidative Medicine & Cellular Longevity, 2015, 2015: 950890.
- [12] SRIPANIDKULCHAI B, JUNLATAT J. Bioactivities of alcohol based extracts of *Phyllanthus emblica* branches: Antioxidation, antimelanogenesis and anti-inflammation[J]. Journal of Natural Medicines, 2014, 68(3): 615-622.
- [13] 周享乐, 王富海, 易俊洁, 等. 化学抑制剂对果蔬食品多酚氧化酶性质影响的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(4): 253-260. ZHOU H L, WANG F H, YI J J, et al. Research progress on the effect of chemical inhibitors on the properties of polyphenol oxidase in fruits and vegetables[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(4): 253-260.
- [14] 李彩云, 李洁, 严守雷, 等. 果蔬酶促褐变机理的研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(9): 283-292. LI C Y, LI J, YAN S L, et al. Progress in research on the mechanism of enzymatic browning in fruits and vegetables[J]. Food Science, 2021, 42(9): 283-292.
- [15] SHIN N H, RYU S Y, CHOI E J, et al. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 243(3): 801-803.



- [16] KIM Y K, YUN J, LEE C K. Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds: Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(18): 16340–16344.
- [17] WANG S, LIU X M, ZHANG J, et al. An efficient preparation of mulberroside a from the branch bark of mulberry and its effect on the inhibition of tyrosinase activity[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109396.
- [18] 陈春, 黎家妍, 黄泽鹏, 等. 氧化白藜芦醇对鲜切苹果及果汁褐变的影响[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(20): 285–289, 295.
- CHEN C, LI J Y, HUANG Z P, et al. Effects of oxyresveratrol on browning of fresh-cut apples and apple Juice[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(20): 285–289, 295.
- [19] HE J, ZHU Q, DONG X, et al. Oxyresveratrol and ascorbic acid O/W microemulsion: Preparation, characterization, anti-isomerization and potential application as antibrowning agent on fresh-cut lotus root slices[J]. *Food Chemistry*, 2017, 214: 269–276.
- [20] HE J, GUO F, LIN L, et al. Investigating the oxyresveratrol  $\beta$ -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin complexes: The effects on oxyresveratrol solution, stability, and antibrowning ability on fresh grape juice[J]. *LWT—Food Science and Technology*. 2019, 100: 263–270.
- [21] LI H, CHENG K W, CHO C H, et al. Oxyresveratrol as an antibrowning agent for cloudy apple juices and fresh-cut apples[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2007, 55(7): 2604–2610.
- [22] 唐月明, 朱永清, 沈学善, 等. 川中丘陵区冬作不同品种马铃薯鲜切加工适宜性评价[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(9): 219–224.
- TANG Y M, ZHU Y Q, SHEN X S, et al. Evaluation different varieties of potato suitable for fresh cutting in winter in hilly area of central Sichuan[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(9): 219–224.
- [23] 关正萍, 郭少珏, 肖春玲, 等. 低温处理对鲜切马铃薯片保鲜的影响[J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(15): 230–234.
- GUAN Z P, GUO S Y, XIAO C L, et al. Impact of low temperature treatments on preservation of fresh-cut potato slices[J]. *Jiangsun Agricultural Science*, 2020, 48(15): 230–234.
- [24] 谢征芸, 谢杨, 庄萌, 等. 不同处理方式对余甘子果多酚氧化酶和过氧化物酶活性的影响[J]. *现代食品*, 2019(19): 132–137.
- XIE Z Y, XIE Y, ZHUANG M, et al. Effects of different treatments on polyphenol oxidase and peroxidase activities in *Phyllanthus emblica* L[J]. *Modern Food*, 2019(19): 132–137.
- [25] 曹建康, 姜微波, 赵玉梅. 果蔬采后生理生化实验指导[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007: 101–102, 142.
- CAO J K, JIANG W B, ZHAO Y M. Experiment guidance of postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2007: 101–102, 142.
- [26] 张龙. 间苯二酚类黄酮衍生物对酪氨酸酶抑制机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- ZHANG L. Study on the inhibitory mechanism of resorcinol flavonoid derivatives on tyrosinase [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [27] 王庆华, 黄演婷, 舒锦华. 复合抑制剂对酪氨酸酶活性的相互作用研究[J]. *中山大学学报 (自然科学版)*, 2011, 50(4): 91–95.
- WANG Q H, HUANG Y T, SHU J H. The interaction effects of combination inhibitor on tyrosinase [J]. *Acta Scientiarum Naturalium University Sunvatseni*, 2011, 50(4): 91–95.

### Studies on Inhibitory Mechanism of Oxyresveratrol Combined with Ascorbic Acid on Enzymatic Browning in *Phyllanthus emblica*

Chen Jun<sup>1</sup>, Chen Hongbin<sup>1</sup>, Guo Fengxian<sup>1</sup>, Zheng Ruisheng<sup>1</sup>, Lin Hetong<sup>2</sup>, Zheng Zongping<sup>\*</sup>

(<sup>1</sup>Fujian Province Key Laboratory for the Development of Bioactive Material from Marine Algae, College of Oceanology and Food Science, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, Fujian

<sup>2</sup>College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

**Abstract** In this paper, the inhibitory enzymatic browning effects and the inhibition kinetics of polyphenol oxidase of *Phyllanthus emblica* by oxyresveratrol combined with ascorbic acid were studied to explore their synergistic inhibition mechanism of browning enzyme. The results showed that 0.02% oxyresveratrol, 0.15% ascorbic acid, and 0.02% oxyresveratrol + 0.15% ascorbic acid could reduce the enzymatic browning of *P. emblica* and had a good inhibitory effect on the activities of polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD) and phenylalanine ammonia lyase (PAL). The treatment of 0.02% oxyresveratrol combined with 0.15% ascorbic acid had stronger inhibitory activities on enzymatic browning and PPO, POD and PAL of *P. emblica* than that of oxyresveratrol alone. The results of enzyme inhibition kinetics showed that the  $IC_{50}$  of oxyresveratrol on PPO was  $(3.300 \pm 0.010) \mu\text{mol/L}$ , its inhibition mechanism was reversible mixed inhibition, while the  $IC_{50}$  of oxyresveratrol combined with ascorbic acid (1:7) was  $(1.600 \pm 0.020) \mu\text{mol/L}$ , their inhibition mechanism was reversible competitive inhibition, and this cooperative use led to the change of inhibition mode. The inhibition constant  $K_i$  of oxyresveratrol on PPO was  $0.904 \mu\text{mol/L}$ , whereas its inhibition constant  $K_{IS}$  of the complex formed by PPO and substrate was  $14.285 \mu\text{mol/L}$ . Furthermore, the inhibition constant  $K_I$  of oxyresveratrol combined with ascorbic acid (1:7) on PPO was  $0.840 \mu\text{mol/L}$ . Lower than that used oxyresveratrol alone, the inhibition of PPO was strengthened by oxyresveratrol combined with treatment ascorbic acid.

**Keywords** *Phyllanthus emblica*; enzymatic browning; oxyresveratrol; ascorbic acid; enzyme inhibition kinetics