

山楂多酚氧化酶的酶学特性研究

李利华, 刘军海

(陕西理工学院化学与环境科学学院, 陕西汉中 723000)

摘要: 研究山楂多酚氧化酶(PPO)的酶学特性。采用分光光度法测定PPO的酶活性,考察底物特异性、pH值、温度、热稳定性、底物浓度、金属离子以及抑制剂对PPO酶活性的影响。实验结果表明,山楂PPO的最适底物为邻苯二酚;最适pH值为6.5;最适温度为40℃;90℃热处理1.0 min或85℃处理1.5 min PPO酶活基本完全丧失;山楂PPO最适底物浓度为0.10 mol/L, PPO酶促褐变反应动力学符合米氏方程,相应的动力学参数 $K_m=55.83$ mmol/L, $V_{max}=98.04$ U/min; Al^{3+} 对PPO酶活的抑制作用较强, Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 次之, Cu^{2+} 和 Mg^{2+} 对PPO酶活抑制作用不明显, Fe^{3+} 对PPO酶活有一定的促进作用;四种抑制剂对山楂PPO酶活均有一定的抑制作用,且抑制效果与抑制剂浓度呈量效关系,相同浓度下抑制效果由强到弱顺序为:抗坏血酸>L-半胱氨酸>亚硫酸氢钠>柠檬酸,抗坏血酸的抑制效果最为显著。

关键词: 山楂;多酚氧化酶;酶学特性

文章编号: 1673-9078(2015)9-112-116

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.9.019

Enzymological Characteristics of Polyphenol Oxidase from Hawthorn

LI Li-hua, LIU Jun-hai

(Chemical and Environmental Sciences, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China)

Abstract: The enzymatic characteristics of Polyphenol oxidase (PPO) from hawthorn was studied. The effects of substrate specificity, pH value, temperature, thermostability, substrate concentration, metal ions, and inhibitors on PPO activity were examined using spectrophotometry. The optimum substrate, pH value, temperature, and substrate concentration for PPO were found to be catechol, 6.5, 40℃, and 0.10 mol/L, respectively. PPO was completely inactivated by heating at 90℃ for 1.0 min or 85℃ for 1.5 min. PPO activity followed Michaelis-Menten kinetics in the enzymatic browning reaction. The K_m and V_{max} values were 55.83 mmol/L and 98.04 U/min, respectively. Metal ion Al^{3+} showed relatively strong inhibitory effect on the enzyme activity, followed by Mn^{2+} , Ca^{2+} , and Zn^{2+} , where all four substances showed dose-dependent effect. The inhibitory effects of Cu^{2+} and Mg^{2+} on enzyme activity were not obvious, while activity was promoted to some degree by Fe^{3+} . At the same concentration, inhibitory effects were in the following order: ascorbic acid > L-cysteine, $NaHSO_3$ > citric acid, where ascorbic acid showed the most significant inhibitory effect on PPO activity.

Key words: hawthorn; polyphenol oxidase; enzymological characteristics

山楂(*Crataegus pinnatifida*), 英文名(hawthorn), 又名山里果、红果,为蔷薇科植物山楂的果实,质硬,果肉薄,味微酸涩,成熟果实可生用或炒黄焦用入药^[1]。山楂具有很高的药用价值。现代研究表明,山楂能够消食健胃、行气散瘀,用于肉食积滞、心腹刺痛、高血脂症等,具有明显的扩张血管及降压作用,有增强心肌、抗心律不齐、调节血脂及胆固醇含量的功效^[2]。同时,山楂中富含多种对人体有益的氨基酸、蛋白质、活性多糖和矿物质^[3],是一种重要的药果兼用果实。然而新鲜山楂在采收、加工和储运过程中易发

收稿日期: 2014-12-10

基金项目: 陕西省科技厅资助科研项目(2014JQ2055); 陕西省教育厅资助科研项目(2014JK1145)

作者简介: 李利华(1977-),女,博士,高级实验师;研究方向:天然产物有效成分的分析、检测

生褐变,使得其感官品质和营养价值大大降低,同时影响产品的经济价值。

研究发现,新鲜果蔬的褐变主要是由植物组织中的多酚氧化酶(Polyphenol Oxidase, PPO)催化内源性酚类底物及其衍生物而发生的复杂化学反应,最终形成褐色或黑色物质所致^[4-5]。在正常情况下,PPO与酚类底物被区域化分开,PPO以潜伏状态存在于物质体中,而酚类底物存在于液泡中,因此不会发生褐变;当植物体内发生生理紊乱或组织受损时,PPO与酚类底物的亚细胞区域化被打破,氧气的浸入造成酚类底物在PPO的催化下迅速氧化成邻醌,再经聚合作用形成褐色或黑色沉淀,这是果蔬等农产品发生酶促褐变的主要原因^[6-8]。因此,多酚氧化酶的酶活力是决定果蔬组织褐变程度的重要因素之一,对多酚氧化酶的酶学特性研究成了解决果蔬酶促褐变问题的重点所

在。不同的果蔬, 由于其品种或生长环境等的差异, PPO 对酶促褐变的影响也不同。目前, 关于果蔬类多酚氧化酶已有广泛研究报道^[9-13], 而有关新鲜山楂采后 PPO 的酶学特性及其有效抑制剂研究未见报道, 致使对预防和控制果实的酶褐变缺乏理论依据和理想的方法。本文以新鲜山楂果实为原材料, 对山楂果实 PPO 进行酶学特性及其有效抑制剂的研究, 旨在为控制其在加工过程中的酶促褐变提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料、试剂及仪器

新鲜山楂果实, 购于汉中水果市场(挑选大小均一, 成熟度相对一致, 无病虫害、无机械伤的果实), 4℃贮存备用。

磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、邻苯二酚、间苯二酚、对苯二酚、焦性没食子酸、没食子酸、柠檬酸、抗坏血酸、L-半胱氨酸、亚硫酸氢钠等均为国产分析纯。

TU-1810 紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限公司; GR-200 型电子天平, 日本 A&D 公司; TGL-16M 台式高速冷冻离心机, 上海精密仪器有限公司; HHS 型电热恒温水浴锅, 常州国华仪器有限公司;

BCD-218ZN2D 美菱电冰箱, 合肥美菱股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 山楂 PPO 粗酶液的制备

称取洗净去皮的新鲜山楂样品 20.0 g 于冷的研钵中, 加入预冷的 pH 6.5 磷酸盐缓冲溶液 80 mL, 冰浴快速研磨至匀浆, 并于 4℃ 条件下浸提 20 min, 4℃、10000 r/min 离心 20 min, 收集上清液即为 PPO 粗酶液^[12], 置冰水浴中保存备用。

1.2.2 PPO 酶活力测定

参照文献方法^[13]略作改动。吸取 0.05 mol/L 的 pH 6.5 磷酸盐缓冲溶液 3 mL, 0.10 mol/L 邻苯二酚溶液 1 mL, 加入 PPO 粗酶液 0.5 mL 后迅速混匀, 测定反应体系在 420 nm 处的吸光度值 A_{420} , 每隔 30 s 记录一次 A_{420} 随时间的变化值, 连续记录 10 min, 作吸光值 A_{420} 与反应时间的关系曲线, 依据曲线最初直线段的斜率计算酶活力。一个酶活力单位 (U) 定义为: 在测定条件下, 每克样品 (鲜重) 每分钟引起吸光度改变 0.001 所需的酶量。

1.2.3 PPO 的底物特异性

分别以 0.10 mol/L 的焦性没食子酸、没食子酸、邻苯二酚、对苯二酚、间苯二酚为底物, 按照 1.2.2

方法测定酶活力, 以最高酶活力为 100%, 计算 PPO 的相对酶活, 考察山楂 PPO 的底物特异性。

1.2.4 pH 对 PPO 酶活的影响

分别配制 pH 为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的磷酸盐缓冲溶液, 其他条件不变, 按照 1.2.2 方法测定酶活力, 考察 pH 对山楂 PPO 酶活的影响。

1.2.5 温度对 PPO 酶活的影响

将山楂 PPO 酶液分别置于 20~60℃ 水浴中保温 5 min, 其他条件不变, 按照 1.2.2 方法测定酶活力, 考察温度对山楂 PPO 酶活的影响。

1.2.6 PPO 的热稳定性研究

将山楂 PPO 酶液分别置于 70~90℃ 水浴中保温 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 min, 其他条件不变, 按照 1.2.2 方法测定酶活力, 以未保温前酶活力为 100%, 计算 PPO 的残留酶活, 考察山楂 PPO 的热稳定性。

1.2.7 底物浓度对 PPO 酶活的影响

用最适 pH 条件下的磷酸盐缓冲液配制浓度为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12 mol/L 的邻苯二酚溶液作为底物, 其他条件不变, 按照 1.2.2 方法测定酶活力, 确定 PPO 作用的最适底物浓度, 并根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法求得米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max} 。

1.2.8 金属离子对 PPO 酶活的影响

用最适 pH 条件下的磷酸盐缓冲液配制 5 mmol/L 的金属离子溶液 $MgCl_2$ 、 $ZnSO_4$ 、 $CaCl_2$ 、 $CuCl_2$ 、 $Al(NO_3)_3$ 、 $FeCl_3$, 测定时加入所配金属离子溶液 0.5 mL, 其他条件不变, 按照 1.2.2 节方法测定酶活力, 考察金属离子对山楂 PPO 酶活的影响。

1.2.9 抑制剂对 PPO 酶活的影响

用最适 pH 条件下的磷酸盐缓冲液配制不同浓度的柠檬酸、亚硫酸氢钠、L-半胱氨酸、抗坏血酸溶液, 测定时加入抑制剂溶液 0.5 mL, 其他条件不变, 按照 1.2.2 节方法测定酶活力。以不加抑制剂所测酶活力为 100%, 计算 PPO 残留酶活, 考察抑制剂对山楂 PPO 酶活的影响。

1.2.10 数据分析

利用 SPSS 17.0 和 origin 8.0 软件进行数据统计分析及作图, 每个实验重复 3 次, 数据均以平均值±标准差(mean±SD)表示。

2 结果与分析

2.1 山楂 PPO 反应进程曲线的测定

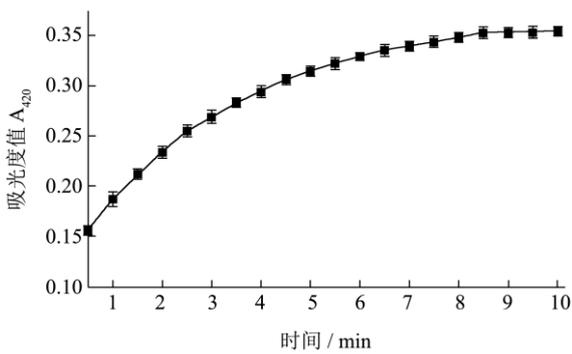


图1 山楂PPO反应进程

Fig.1 Enzymatic reaction curve of PPO from hawthorn

由图1可看出,山楂PPO在0~3 min内吸光度值几乎呈线性增加,说明酶促褐变反应速度较快,随着时间的延长,曲线斜率逐渐降低并趋于平坦,这可能与酶作用底物的消耗和产物的积累对酶的抑制有关,

表1 PPO催化不同底物的酶活力

Table 1 PPO activity using different substrates

底物	邻苯二酚	焦性没食子酸	对苯二酚	没食子酸	间苯二酚
PPO酶活力	122.33±0.58	36.15±0.34	10.62±0.45	2.67±0.51	0.67±0.25
相对酶活/%	100±0.47	29.55±0.59	8.68±0.77	2.18±0.88	0.55±0.43

2.3 pH对PPO酶活的影响

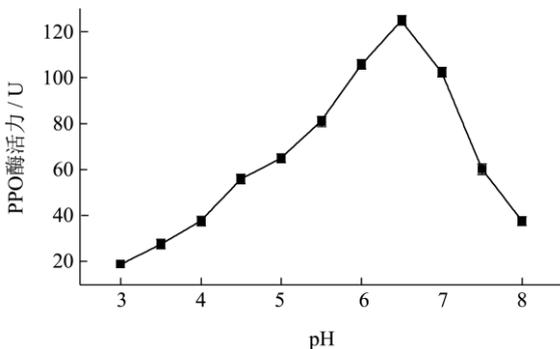


图2 pH对山楂PPO酶活的影响

Fig.2 Effect of pH on the activity of PPO from hawthorn

由图2可知,在实验范围内,随着pH值增加,山楂PPO的酶活力先增大后减小,在pH=6.5左右酶活力达到最大值。说明山楂PPO对pH值的变化比较敏感。由于PPO是一种含铜蛋白质,PPO的活性与酸碱性密切相关的,在强酸条件下,酶中的铜离子解离出来,使酶失活;在碱性环境中,铜离子以Cu(OH)₂形式沉淀出来,从而使其活性降低。因此,可以通过调节pH防止山楂PPO酶促褐变的发生。

2.4 温度对PPO酶活的影响

由图3可知,在20~40℃范围内,山楂PPO具有较强的活力,且随温度升高酶活力逐渐增强,在

PPO酶活性已不能由反应进程完全表征出来;因此,本实验确定在3 min内测定酶活力有实际意义。

2.2 底物特异性

表1为5种不同底物的酶催化情况。由PPO酶活力可知,山楂PPO的最适底物为邻苯二酚,其次是焦性没食子酸,PPO对对苯二酚的酶催化作用很小,而PPO对没食子酸和间苯二酚几乎没有催化作用,表明山楂PPO的主要氧化底物为邻苯二酚类和邻苯三酚类(焦性没食子酸)。据文献报道^[5],植物中的PPO依据酶作用底物的特征分为单酚氧化酶、双酚氧化酶和漆酶;可推测山楂中的PPO属于双酚氧化酶,这种酶能催化氧化邻位酚,但催化氧化间位酚和对位酚的能力较差。因此本实验选用酶活力单位最大的邻苯二酚为测定山楂PPO活力的反应底物。

40℃左右时酶活力最强;此后继续升温,PPO活力呈下降趋势,当60℃时PPO酶活力仅为40℃酶活的30.6%。原因可能是PPO在最适温度才能被完全激活,高温条件会导致酶活性中心破坏,酶蛋白变性,从而引起酶活降低。因此,山楂PPO酶活的最适温度为40℃,在山楂加工过程中可通过适当升温防止酶促褐变。

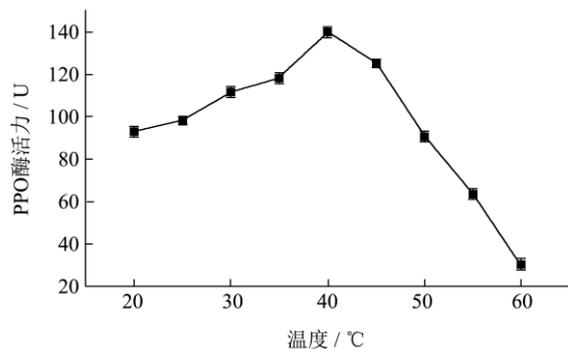


图3 温度对山楂PPO酶活的影响

Fig.3 Effect of temperature on the activity of PPO from hawthorn

2.5 PPO热稳定性的研究

由图4可看出,山楂PPO经不同高温处理,随处理时间的延长,PPO残留酶活均呈下降趋势,且温度越高,PPO残留酶活下降越明显。70℃或75℃处理3.0 min,80℃处理2.5 min,85℃处理1.5 min,90℃处理1.0 min,PPO几乎完全失活。这说明热处理可有

效抑制 PPO 的活性。因此在山楂加工中,可采用热烫的方法钝化 PPO,从而达到抑制褐变的目的。但如果热处理不当,会破坏其营养成分,影响产品品质。

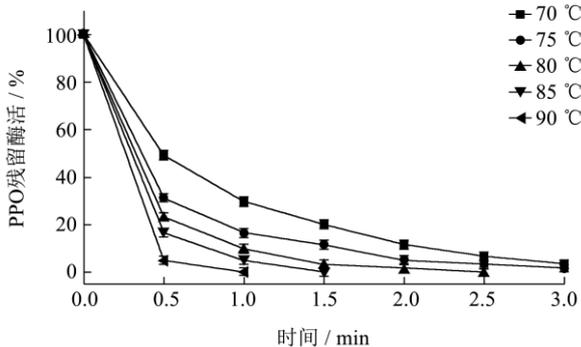


图4 山楂 PPO 的热稳定性

Fig.4 Thermostability of PPO from hawthorn

2.6 底物浓度与 PPO 酶活关系

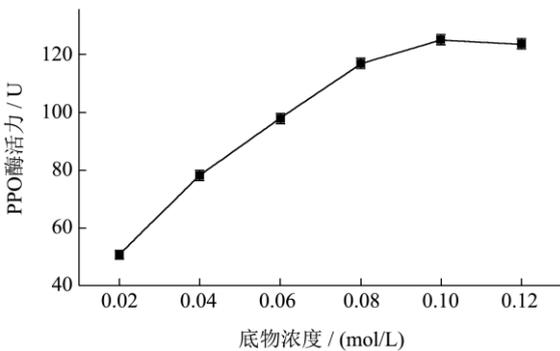


图5 底物浓度对山楂 PPO 酶活的影响

Fig.5 Effect of substrate concentration on the activity of PPO from hawthorn

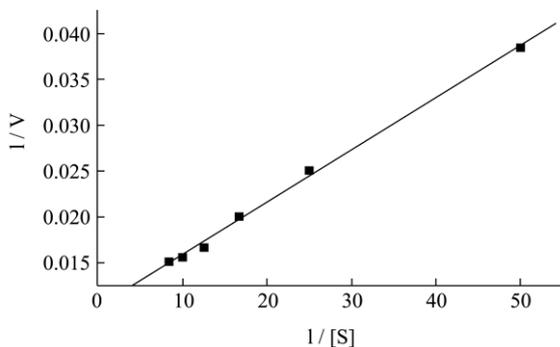


图6 山楂 PPO 酶促反应双倒数图

Fig.6 Double-reciprocal plot of enzyme-catalyzed reaction of PPO from hawthorn

图5 是不同底物浓度[S]对山楂 PPO 酶活力的影响。由图5可知,当底物浓度[S]≤0.08 mol/L时,随着浓度的增大,酶活性也随之增高,二者呈一级反应;继续增大底物浓度,酶活性变化趋于平缓,且在浓度为0.10 mol/L时酶活达到最大值。这是由于底物浓度

较低时,只有部分酶与底物结合,故底物浓度决定反应速率;而当底物达到一定浓度时,与酶的活性部位全部结合,酶已经达到饱和,再增加底物浓度,反应速率也不会增加。

根据 Lineweaver-Burk 双倒数方程 $1/V=(1/[S])K_m/V_{max}+1/V_{max}$,以 $1/[S]$ 为横坐标, $1/V$ 为纵坐标作图,如图6所示。拟合得到动力学方程 $1/V=5.69 \times 10^{-4}(1/[S])+0.0102$,相关系数 $R=0.9989$ 。根据计算得到山楂 PPO 对邻苯二酚的 K_m 和 V_{max} 值分别为 55.83 mmol/L 和 98.04 U/min。

2.7 金属离子对 PPO 酶活的影响

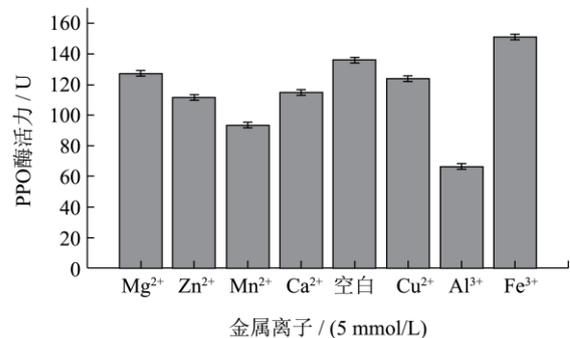


图7 金属离子对山楂 PPO 酶活的影响

Fig.7 Effect of metal ions on the activity of PPO from hawthorn

由图7可看出,金属离子对山楂 PPO 酶活性的影响效果各不相同。与未加金属离子的 PPO 空白对照相比,Al³⁺对 PPO 酶活的抑制作用较强,添加 Al³⁺的山楂 PPO 酶活力仅为空白对照的 48.9%;Mn²⁺、Ca²⁺、Zn²⁺次之,Cu²⁺和 Mg²⁺对 PPO 酶活的抑制作用不明显,而 Fe³⁺对 PPO 的酶活有一定的促进作用。因此,在山楂加工中应避免原料与 Fe³⁺接触,防止发生酶促褐变;而 Al³⁺、Mn²⁺等对 PPO 酶活有抑制作用的金属离子应在确保安全、不影响产品营养成分与感官品质的前提下,按照国家标准或者有关行业、企业标准添加以抑制褐变。

2.8 抑制剂对 PPO 酶活的影响

由图8可知,随着四种抑制剂浓度的增加,山楂 PPO 残留酶活均逐渐降低,说明四种抑制剂对山楂的酶促褐变均有一定的抑制作用,且抑制效果与抑制剂浓度呈明显的量效关系;对比可见,当抑制剂浓度达 0.80 mmol/L 时,添加抗坏血酸的 PPO 残留酶活为 0,表明 PPO 已完全失活;添加其他三种抑制剂的 PPO 残留酶活分别为: L-半胱氨酸为 16.9%,亚硫酸氢钠为 30.3%,柠檬酸为 42.6%,可得出四种抑制剂抑制山楂 PPO 酶促褐变的强弱顺序为: 抗坏血酸>L-半胱

氨酸>亚硫酸氢钠>柠檬酸,抗坏血酸抑制山楂 PPO 酶促褐变效果最为显著。

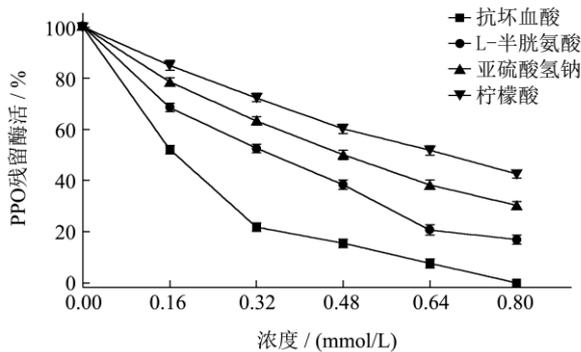


图8 抑制剂对山楂 PPO 酶活的影响

Fig.8 Effect of inhibitors on the activity of PPO from hawthorn

3 结论

3.1 实验结果表明, 山楂 PPO 的最适底物是邻苯二酚, 与已报道的杏子果实^[8]、金帅苹果^[9]PPO 最适底物一致, 与水蜜桃^[10]PPO 最适底物(儿茶素)、中华寿桃^[12]PPO 最适底物(绿原酸)不同; 山楂 PPO 最适 pH 值为 6.5, 与香蕉^[11]、中华寿桃^[12]PPO 最适 pH 相同, 高于金帅苹果^[9](pH 5.0), 库尔勒梨^[13](pH 5.7)。山楂 PPO 最适温度为 40 °C, 与金帅苹果^[9]、库尔勒梨^[13]、白萝卜^[6]PPO 最适温度相同, 高于香蕉^[11](30 °C), 低于中华寿桃^[12](60 °C)。由此可见, 不同植物来源的果蔬的 PPO 在酶学性质方面存在一定差异。90 °C 高温条件下热处理 1.0 min 或 85 °C 热处理 1.5 min, 山楂 PPO 酶活基本完全丧失, 因此, 在山楂的深加工过程中, 可采用高温瞬时灭酶法抑制酶促褐变。

3.2 动力学研究表明: 山楂 PPO 的酶活与底物邻苯二酚的浓度关系遵循 Michealis-Menten 的酶促动力学方程, 通过计算得到米氏常数 $K_m=55.83$ mmol/L, 最大反应速率 $V_{max}=98.04$ U/min。米氏常数(K_m)是酶的一个基本特征常数, 反映了酶与底物结合及解离的性质, K_m 越小说明底物与酶结合的亲和力越强^[7]。不同植物来源 PPO 的 K_m 不同, 同一种 PPO 作用底物不同, 其 K_m 也不同。山楂 PPO 的 K_m 低于库尔勒梨^[13]的 K_m , 反应时酶和底物的亲和力较大。

3.3 通过考察七种金属离子对该酶的影响表明: 金属离子 Al^{3+} 对山楂 PPO 的活性有较强的抑制作用, 其次是 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} , Cu^{2+} 和 Mg^{2+} 对 PPO 酶活的抑制作用不明显, 而 Fe^{3+} 对 PPO 的酶活有一定的激活作用。四种酶活抑制剂对山楂 PPO 的酶活的抑制效果与抑制剂浓度呈明显的量效关系, 相同浓度下其抑制能力由强到弱依次为: 抗坏血酸>L-半胱氨酸>亚硫酸氢

钠>柠檬酸, 抗坏血酸抑制山楂 PPO 酶促褐变效果最显著, 当浓度达到 0.80 mmol/L 时 PPO 酶活可完全得到抑制。由于不同抑制剂抑制褐变的机理各不相同, 有文摘报道^[7,14]几种不同抑制剂的协同抑制效果要优于单一抑制剂的抑制作用。因此, 还需要在单一抑制剂的研究基础上, 对几种不同抑制剂的协同抑制效果进行研究, 为防止山楂酶促褐变提供更详细的数据支持。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典委员会.中国药典(2005 版一部)[S].北京:化学工业出版社,2005
The pharmacopoeia committee of the People's Republic of China . Chinese pharmacopoeia (2005 edition) [S]. Bei Jing: Chemical Industry Press, 2005
- [2] Seyed J H , Mohammad A , Atefeh J A. Protective effect of hawthorn extract against genotoxicity induced by cyclophosphamide in mouse bone marrow cells [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2008, 25 (1): 51-56
- [3] 李硕,郭成宇.不同生产工艺工程对冻山楂果汁品种的影响[J].现代食品科技,2013,29 (4):835-840
LI Shuo, GUO Cheng-yu. Effect of different processing techniques on the quality of frozen hawthorn juice [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(4): 835-840
- [4] MUKHERJEE S, BASAK B, BHUNIA B, et al. Potential use of polyphenol oxidases (PPO) in the bioremediation of phenolic [J]. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2013, 12(1): 61-73
- [5] Yoruk R, Marshall M R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review [J]. J. Food Bio. Chem., 2003, 27(5): 361-422
- [6] 华颖,沈国华,刘大群.白萝卜多酚氧化酶的酶学特性研究[J].现代食品科技,2014,30(1): 69-72
HUA Ying, SHEN Guo-hua, LIU Da-qun. Characterization of polyphenol oxidase extracted from white radish [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(1): 69-72
- [7] BUCKOW R, WEISS U, KNORR D. Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure-temperature domains [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2009, 10(4): 111-118
- [8] MADRAU M A, PISCOPO A, SANGUINETTI A M, et al. Effect of drying temperature on polyphenolic content and antioxidant activity of apricots [J]. European Food Research

- and Technology, 2009, 228(3):441-448
- [9] 付聿成,王妮娅,杜金华.金帅苹果多酚氧化酶提取及部分酶学特性研究[J].食品工业科技,2006,27(2):59-62
FU Yu-cheng, WANG Ni-ya, DU Jin-hua. Study on optimization of the extraction conditions and some enzymatic characteristics for polyphenol oxidase in golden delicious apple fruit [J]. Science and Technology of Food Industry, 2006, 27(2): 59-62
- [10] 曹少谦,刘亮,杨震峰,等.几种抑制剂对水蜜桃多酚氧化酶特异性及的抑制效应[J].中国食品学报,2014,14(7):144-147
CAO Shao-qian, LIU Liang, YANG Zhen-feng, et al. Inhibitory effects of different inhibitors on polyphenol oxidase from honey peach[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(7): 144-147
- [11] UNAL M U. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*) [J]. Food Chemistry, 2007, 100(3): 909-91.
- [12] 段玉权,董维,张明晶,等.中华寿桃多酚氧化酶的特性研究[J].中国农业科学, 2008, 41(3):795-799
DUAN Yu-quan, DONG Wei, ZHANG Ming-jing, et al. Properties of polyphenol oxidase extracted from Zhonghuashoutao peach flesh [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(3):795-799
- [13] 朱路英,吴伟伟,孙杰,等.库尔勒梨多酚氧化酶的酶学特性[J].食品科学,2010,31(21):275-278
ZHU Lu-ying, WU Wei-wei, SUN Jie, et al. Enzymatic properties of polyphenol oxidase from kuerle pear [J]. Food Science, 2010, 31(21): 275-278
- [14] ZHENG Yong-ju, SHI Jun-ling, PAN Zhong-li. Biochemical characteristics and thermal inhibition kinetics of polyphenol oxidase extracted from Thompson seedless grape [J]. European Food Research and Technology, 2012, 234: 607-616