

雪梨果肉多酚氧化酶的活性研究与纯化

李桂琴^{1,2}, 刘 坤¹, 张玉星^{2,*}

(1. 河北经贸大学生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050061; 2. 河北农业大学园艺学院, 河北 保定 071001)

摘 要: 以雪梨果实为试材, 通过以邻苯二酚为底物测定氧化产物的方法, 测定温度、pH 值、抑制剂、不同成熟期及不同部位对 PPO 活性的影响。结果表明: 最适 pH 值为 6.4; 最适温度为 25℃; 不同成熟期 PPO 的活性不同; 1mol/L 的亚硫酸钠为较好的抑制剂; 果肉内部 PPO 活性最高, 果肉中部的 PPO 活性最低。粗提液又经 30% 硫酸铵沉淀去杂和 80% 饱和度硫酸铵析出、Sephadex-G200 柱层析及 HiPrep™16/10 QXL 离子柱层析, 得到电泳均一的 PPO, 分子量 43 kD。

关键词: 雪梨; 多酚氧化酶(PPO); 层析

Characteristic and Purification of Polyphenol Oxidase from Snow Pear Flesh

LI Gui-qin^{1,2}, LIU Kun¹, ZHANG Yu-xing^{2,*}

(1. Biological Science and Engineering Institute, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang 050061, China;
2. College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: The polyphenol oxidase (PPO) in snow pear flesh was extracted and purified. The results showed that the optimum pH for PPO is 6.4; the optimum temperature for PPO is 25℃; the PPO activity changed at different stages; the 1 mol/L sodium sulfite is a better inhibitor and the PPO activity is largest in the interior of pear flesh. Oxidase was purified from snow pear flesh by four steps: Ammonium sulfate fractionation with saturation 30%, ammonium sulfate fractionation with saturation 80%, Sephadex-G200 filtration and HiPrep™16/10 QXL column chromatography in turn. Through these steps, PPO was purified to electrophoretic homogeneity. SDS-PAGE showed the protein as a single polypeptide with a molecular weight of about 43.0 kD.

Key words: pear; phenol oxidize (PPO); chromatography

中图分类号: S661.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0297-04

1973 年, Kubowitz 在 Warburg 实验室中第一次分离出多酚氧化酶。多酚氧化酶(PPO) 能催化各种酚类物质氧化成为醌, 再聚合成黑色素, 并随时间的延长而逐渐变黑, 是引起水果、蔬菜及其制品酶促褐变的主要酶类, 因此倍受关注。

关于 PPO 性质的研究已有较多报道, 研究结果揭示 PPO 的性质因植物种类及品种而异。梨果肉中含有大量

的 PPO, 在加工程中, 极易发生酶促褐变, 不仅影响产品的风味、色泽, 还大大降低了梨制品的营养价值^[1-2]。本实验研究了温度、pH 值、抑制剂、不同成熟期及不同部位对雪梨 PPO 活性的影响, 以及雪梨 PPO 的纯化。雪梨是河北省梨的主要加工品种, 研究其 PPO 在不同成熟期、不同部位等的活性情况及变化规律, 对果实加工选择适宜的采收期、贮藏条件及抗褐变措施等

收稿日期: 2007-09-25

*通讯作者

基金项目: 河北省科技攻关项目(042401116D-2)

作者简介: 李桂琴(1964-), 女, 教授, 研究方向为食品生物技术。

by 16S rRNA gene analysis[J]. Clin Microbiol, 1997, 35: 2464-2471.

[6] 刘正祥, 邹全明. 基因芯片在病原微生物检测中的应用评价[J]. 国外医学: 临床生物化学与检验学分册, 2003, 24(2): 66-69.

[7] 顾鸣, 韩伟, 关蝶, 等. 常见食源性致病菌基因芯片鉴定技术[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(11): 1309-1312.

[8] GILLGAN K, SHIPLEY M, STILES B, et al. Identification of *Staphy-*

lococcus aureus enterotoxins A and B genes by PCR-ELISA[J]. Mol Cell Probes, 2000, 14(2): 71-78.

[9] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS. 分子克隆实验指南[M]. 2版, 北京: 科学出版社, 1996.

[10] FODOR S P A, RAVA R P, HUANG X C, et al. Multiplexed biochemical assays with biological chip[J]. Nature, 1993, 364: 555-556.

具有重要意义,同时有助于深入了解该酶的性质,并为果实褐变机制的研究奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂与设备

雪梨(采自石家庄学府路果园),透析袋(截留分子量10000~20000D),微量注射器;磷酸盐缓冲液(PB溶液),过硫酸铵,邻苯二酚,Hiprep™16/10 QXL型层析柱,SephadexG200,30%丙烯酰胺,AgNO₃银染液等;18-1138-03 AD,Protein purification,Spectrum 754型紫外可见分光光度计,TGL-16C型台式高速离心机,DYY-5稳压稳流凝胶电泳仪,国华HY-5回旋振荡器。

1.2 方法

1.2.1 PPO的提取与活性测定

将无损伤的梨用不锈钢刀迅速去皮,取5g果肉,切碎,加入pH6.5预冷的0.1mol/L柠檬酸—磷酸氢二钠缓冲液(pH6.6)10ml制成匀浆,在4℃下离心10min(RCF为16000N)取上清液,即为PPO粗提液。

PPO活性测定采用速率法^[3]。配制酶促反应液2.5ml(0.1mol/L柠檬酸—磷酸氢二钠缓冲液,0.02mol/L邻苯二酚,2%PPO提取液),立即在420nm波长下测定OD值,每隔10s读数一次,重复三次,取平均值。一个活性单位为每毫升酶液在1min内使OD值升高0.001(1U=0.001OD值/(min·ml))。

1.2.2 PPO特性

1.2.2.1 PPO最适温度、最适pH值的测定

采用常规方法(最大活性管的相对活性定为100%)。

1.2.2.2 不同抑制剂对PPO活性的影响

参考文献[4](将1mol/L亚硫酸钠抑制程度定为100%)。

1.2.2.3 雪梨在不同成熟期的酶活

2005年4月底开始采集,每隔9d采集一次,共采集六次(为以后叙述方便六次采集的梨分别计为第1、2、3、4、5、6时期),采集完后即刻测定PPO活性。

1.2.2.4 雪梨果实不同部位的酶活测定

取成熟的雪梨果实,在其中部、内部、外部分别取样,测定PPO活性。

1.2.3 PPO的纯化

1.2.3.1 硫酸铵逐级沉淀

取PPO粗提液10ml,边缓慢搅拌边加入固体硫酸铵,使饱和度达到10%,静置30min,16000r/min离心30min,收集上清液,测酶活。重复上述步骤,分别进行20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%的硫酸铵沉淀,并分别收集上清测酶活。

1.2.3.2 透析

用10ml磷酸钠缓冲液(0.05mol/L,pH6.6)溶解有酶活的蛋白沉淀,以蒸馏水为透析液进行透析,直到在透析液中加入BaCl₂没有沉淀即可。

1.2.3.3 SephadexG-200柱层析

在18-1138-03 AD液相层析系统中将SephadexG-200柱(1.0cm×20cm)用0.05mol/L pH7.4磷酸钠缓冲溶液充分平衡后,加入粗酶液5ml。用0.05mol/L,pH7.4的磷酸钠缓冲溶液进行洗脱,流速为0.5ml/min,每10min收集一管。检测各管酶活性及280nm的吸收值,收集PPO活性峰。对水透析,蔗糖低温包埋浓缩。

1.2.3.4 Hiprep™16/10 QXL型层析

Hiprep™16/10 QXL凝胶柱(1.6cm×20cm)用0.1mol/L,pH7.4的磷酸缓冲液充分平衡后,将SephadexG-200层析后的活性组分0.3ml加到凝胶柱上,用100ml磷酸钠缓冲溶液(0.05mol/L,pH7.4,含0.1mol/L NaCl)洗脱。再分别用含0.3、0.5、0.7、0.9、1.0mol/L NaCl的磷酸钠缓冲液(0.05mol/L,pH7.4)洗脱,流速为0.5ml/min,每10min收集一管。检测各管酶活性及280nm的吸收值,收集PPO活性峰。

1.2.3.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳^[5]

按4%浓缩胶、12%分离胶进行电泳,完成后用AgNO₃染色。

2 结果与分析

2.1 PPO特性

2.1.1 最适pH值

选择不同pH(范围5.4~7.0,间隔为0.2)的酶促反应液,分别加入相同数量的PPO粗酶液,测PPO活性,结果表明该酶的最适pH值为6.4,见图1。

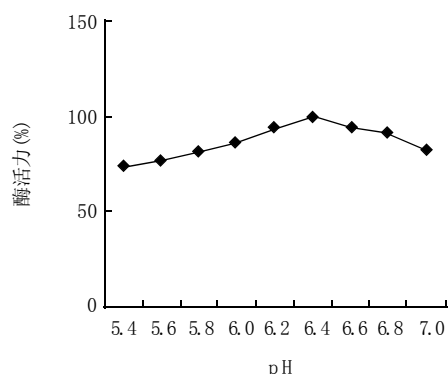


图1 pH值对PPO的影响

Fig.1 Effects of pH values on PPO activity

2.1.2 最适温度

选择不同温度(范围15~45℃,间隔为5℃)的酶促

反应液, 分别加入相同数量的 PP0 粗酶液, 测 PP0 活性, 结果表明该酶最适温度为 25℃, 见图 2。

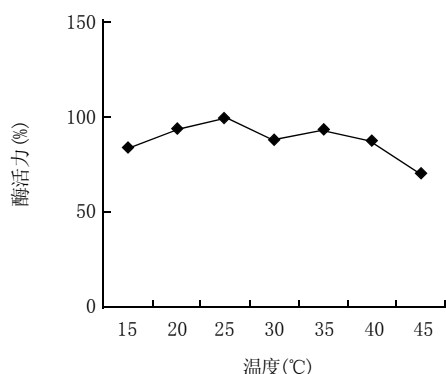


图2 温度对 PPO 的影响

Fig.2 Effects of temperature on PPO activities

2.1.3 抑制剂对雪梨 PP0 活性的影响

将几种抑制剂分别配置两种浓度, 测定各种抑制剂对 PP0 活性的影响(见表 1)。结果表明, 亚硫酸钠、抗坏血酸和蔗糖对雪梨 PP0 的抑制作用最强, EDTA、巯基乙醇、苯甲酸次之, 而不同浓度的 NaCl 作用不同, 浓度为 0.2 时抑制作用很强, 而浓度为 2 时却有激活作用。

表 1 不同抑制剂对 PPO 活性的影响
Table 1 Effects of different inhibitors on PPO activity

抑制剂(100%)	浓度(mol/L)	抑制效果(%)
EDTA	0.02	38.4
	0.2	25.0
NaCl	0.2	49.8
	2	-5.9
蔗糖	0.05	53.6
	0.5	78.9
巯基乙醇	0.5	44.1
	5	52.3
亚硫酸钠	0.1	79.9
	1	100.0
抗坏血酸	0.5	81.8
	5	97.3
苯甲酸	0.1	40.2
	1	49.0

2.1.4 雪梨不同成熟期的 PP0 酶活力

不同成熟期雪梨 PP0 的活性有明显差别, 从图 3 看出: 第 1 期 PP0 的活性最高, 相对活性为 100%, 到第 3 期(9d 间隔)PP0 的活性由原来的 100% 降低到 61.2%, 随后酶活有所上升, 第 4 期酶活达到 66.1%, 随后酶活又不断降低。可见第 3 期以后, PP0 的活性较低, 这利于加工过程抗褐变作用。

2.1.5 不同部位的酶活变化

果实不同部位 PP0 活性不同, 结果(表 2)表明: 果

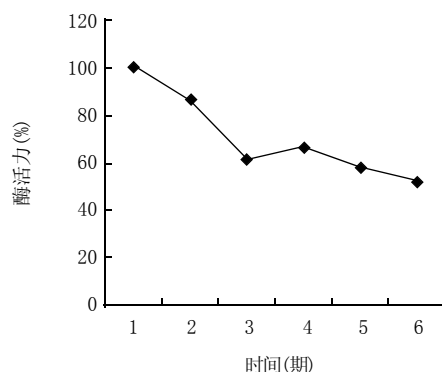


图3 不同成熟期对 PPO 的影响

Fig.3 Effects of different maturity stages on PPO activity

肉内部的 PP0 活性最高, 相对活性为 100%, 果肉中部的 PP0 活性最低。说明了 PP0 活性和酚类物质含量分布的一致性^[6], 即易引起果肉褐变的果肉内部酚类物质含量高, PP0 活性也高。

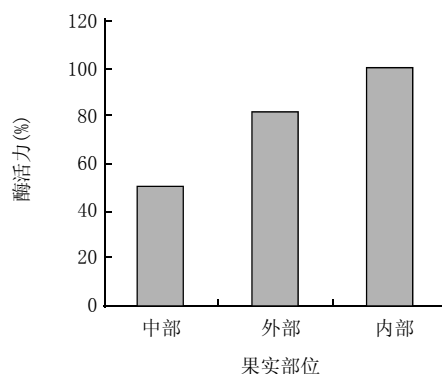


图4 果肉不同部位对 PPO 的影响

Fig.4 Effects of different flesh part on PPO activity

2.2 PP0 纯化

2.2.1 硫酸铵逐级沉淀结果

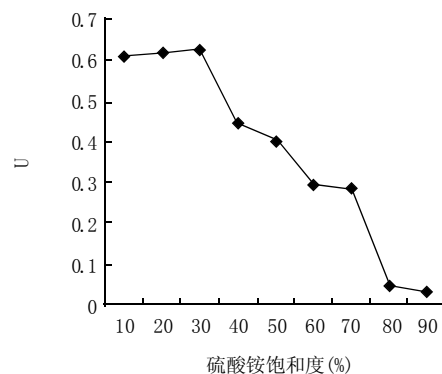


图5 硫酸铵分级沉淀后的 PPO 酶活力

Fig.5 PPO activity through ammonium sulfate fractionation with different saturation

10ml 粗提液经 30% 硫酸铵沉淀以前的上清液 PP0 酶

活力较高且无多大变化,经80%硫酸铵沉淀以后上清液PPO酶活力较低。初步说明经30%硫酸铵沉淀去杂和80%饱和度硫酸铵析出,可有效地去除部分杂蛋白。

2.2.2 SephadexG200 柱层析

将透析后的粗酶液加到SephadexG200凝胶层析,得到一有酶活的蛋白峰(见图5)。经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测为混合蛋白质组分,因此将此峰的洗脱液对水透析后用蔗糖包埋浓缩,用于进一步纯化。

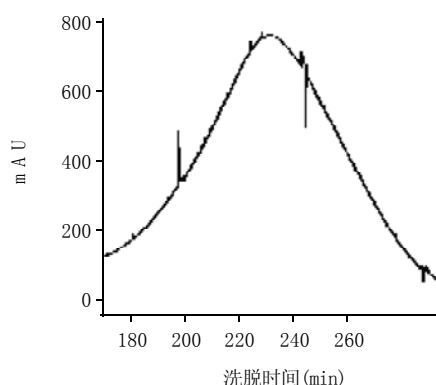


图6 PPO的Sephadex G200层析
Fig.6 Sephadex G200 chromatography of enzyme

2.2.3 Hiprep™16/10 QXL 型离子交换层析

将处理过的酶液加到Hiprep™16/10 QXL型离子交换层析柱上,进行洗脱,出现了四个吸收峰,见图6。经测定,峰1酶活较高,收集并浓缩用于电泳鉴定。

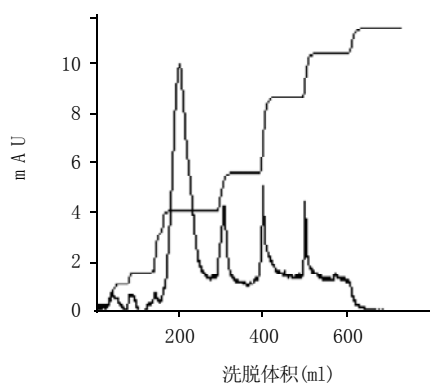
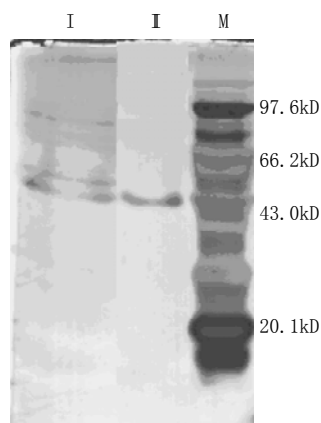


图7 PPO的Hiprep™16/10 QXL离子层析
Fig.7 Hiprep™16/10 QX chromatography of enzyme

2.2.4 纯化结果检测

将marker、SephadexG-200凝胶层析和Hiprep™16/10 QXL型离子层析后富含多酚氧化酶的样品进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,从图7中可以看出,经纯化后收集



I. SephadexG-200凝胶层析后PPO; II. Hiprep™16/10 QXL型离子层析后PPO; M. 标准蛋白分子量。

图8 PPO蛋白的纯化效果
Fig.8 SDS-PAGE of antifungal protein

到的II为单一组分的酶蛋白,表观分子量为43kDa。

3 结论

3.1 对雪梨果肉PPO活性研究结果表明:最适pH值为6.4;最适温度为25℃;不同成熟期PPO的活性不同,第3期以后PPO的活性较低,这利于加工过程抗褐变作用;亚硫酸钠、抗坏血酸和蔗糖为较好的抑制剂;果肉内部PPO活性最高,果肉中部的PPO活性最低,说明了PPO活性和酚类物质含量分布的一致性。

3.2 PPO与梨果肉褐变的关系极为密切。雪梨果肉PPO纯化为进一步研究PPO酶学特征、氨基酸序列测定和PPO基因的克隆,最终控制梨果酶促褐变奠定了基础。笔者研究纯化出的PPO的分子量约为43kD,与报道(天然植物PPO有活性的形式主要为40~45、59、65~68以及70~72kD)相近。

参考文献:

- [1] 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,2005,22(2):215-222.
- [2] GONG Qin-qin, TIAN Shi-ping. Partial characterization of soluble peroxidase in pericarp of liitchi fruit[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2002, 29(6): 891-895.
- [3] COSETENGMY, LEECY. Changes in apple polyphenol oxidase and polyphenol concentrations in relation to degree browning[J]. J Food Sci, 1987, 52(4): 985-989.
- [4] 仲飞.红星苹果多酚氧化酶某些特性及其抑制剂的研究[J].园艺学报,1998,25(2):184-186.
- [5] 李建武,肖能庚,余瑞元,等.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社,1994:216-223.
- [6] 董剑寒,王然,宫静静,等.不同梨果实褐变特异性分析[J].中国农学通报,2007,23(4):285-288.