

蛋白交联中多酚氧化酶的酶源筛选 及酶学性质研究

吴进菊^{1,2}, 郭小英³, 陈红兵^{1,2}, 高金燕^{1,4,*}

(1.南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047; 2.南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047;
3.南昌市农产品质量安全检测中心, 江西 南昌 330009; 4.南昌大学生命科学与食品工程学院, 江西 南昌 330047)

摘 要: 从多种植物和真菌中筛选出多酚氧化酶(PPO)活力高的原料, 并对其酶学性质进行研究, 以利于其在蛋白交联中的应用。双孢蘑菇和茄子中 PPO 酶活相对较高, 达到 11004U/g 和 9376U/g。双孢蘑菇 PPO 和茄子 PPO 的最适温度和 pH 值均分别为 20℃ 和 7.0; 在温度较高时, 茄子 PPO 比双孢蘑菇 PPO 稳定性更好。Zn²⁺、Mn²⁺、Ag⁺ 对双孢蘑菇 PPO 和茄子 PPO 活力表现明显的抑制作用, Cu²⁺ 对双孢蘑菇 PPO 活力表现明显的促进作用, 而对茄子 PPO 却有很强的抑制作用。双孢蘑菇 PPO 和茄子 PPO 的 K_m 和 V_{max} 分别为 5.5mmol/L、1666.7U 和 8.75mmol/L、2500U。

关键词: 交联; 多酚氧化酶; 双孢蘑菇; 茄子

Screening and Characterization of Polyphenol Oxidase Source for Protein Cross-linking

WU Jin-ju^{1,2}, GUO Xiao-ying³, CHEN Hong-bing^{1,2}, GAO Jin-yan^{1,4,*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 3. Nanchang Agri-food and Safety Inspection Center, Nanchang 330009, China; 4. School of Life Science and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The plants and fungus with high polyphenol oxidase (PPO) activity were selected to apply to protein cross-linking, and biochemical nature of this enzyme was characterized. PPOs from *Agaricus bisporus* and eggplant were observed to be the highest, 11004 U/g and 9376 U/g. The optimum temperature and pH for these two kinds of PPO were found to be 20 °C and 7.0, while PPO from *A. bisporus* showed lower heat stability than that from eggplant at high temperature. Metal ions like Zn²⁺, Mn²⁺ and Ag⁺ showed obvious inhibition on PPOs while Cu²⁺ was able to promote the PPO activity from *A. bisporus* (140.9%) and inhibit PPO activity from 23.4%. The K_m and V_{max} values of PPOs from *A. bisporus* and eggplant were 5.5 mmol/L and 1666.7 U, 8.75 mmol/L and 2500 U, respectively.

Key words: cross-linking; polyphenol oxidase(PPO); *Agaricus bisporus*; eggplant

中图分类号: Q814

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)23-0229-04

多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO, EC 1.14.18.1), 通常又称为酪氨酸酶, 是由核编码的铜金属酶, 在细胞质中合成, 普遍存在于植物、真菌和昆虫中。PPO 相当稳定, 甚至在土壤中已腐烂的植物残渣上都可检测到 PPO 的活性^[1]。

多酚氧化酶可催化蛋白发生交联反应, 从而改善蛋白质的功能特性, 如热稳定性、乳化性、凝胶特性、

保水性、流变学特性等。虽然其研究的深度与广度大大逊于对转谷氨酰胺酶的开发, 但是也取得了一定的成绩。Takasaki^[2]研究发现蘑菇 PPO 能催化小麦醇溶蛋白发生分子内和分子间的交联。里氏木霉 PPO 在 3h 内使 β -酪蛋白产生交联, 但牛血清白蛋白在 24h 内都不能产生交联^[3]。

本研究从多种植物和真菌出发, 筛选出 PPO 活力高

收稿日期: 2009-06-25

基金项目: 国家“863”计划项目(2006AA10Z324); 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ09063);

江西省研究生创新资金项目

作者简介: 吴进菊(1983—), 女, 博士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: wujinju302@163.com

* 通讯作者: 高金燕(1967—), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为食品卫生与安全。E-mail: gjy1967@yahoo.com.cn

的原料, 并对其粗酶液的部分酶学特性和动力学参数进行研究和比较, 为后续在蛋白交联中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

苹果、香蕉、梨、双孢蘑菇、茄子、山药、马铃薯、莴苣和芋艿等均购自当地市场。

邻苯二酚、丙酮、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠等试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Allegra 64R 高速冷冻离心机 德国 Beckman 公司; TU-1901 双光束紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司; PB-10 型酸度计 德国 Sartorius 公司。

1.3 方法

1.3.1 原料丙酮粉的制备

将从市场上买来的新鲜苹果、香蕉、梨、双孢蘑菇、茄子、山药、马铃薯、莴苣和芋艿等洗净后去皮、切碎, 放入研钵中, 加入液氮, 迅速用杵捣碎至无明显颗粒的粉末状。加入预冷丙酮(-20°C), 用布氏漏斗进行抽滤, 然后进行真空冷冻干燥, 即得丙酮粉, -20°C 保存备用。

1.3.2 PPO 粗酶液的制备

取冷冻干燥原料丙酮粉 0.2g, 加入 10ml 预冷(4°C) 的 0.05mol/L、pH7.0 磷酸盐缓冲液, 磁力搅拌 25~30min, $7000 \times g$ 离心 20min, 上清液即为粗酶液。

1.3.3 温度对 PPO 活性和稳定性的影响

将邻苯二酚溶液置于 $10\sim 40^{\circ}\text{C}$ 范围内, 加入酶液测定 PPO 活力, 得出 PPO 的最适温度。将酶液放置在 30、40、50、 60°C 等不同温度下, 经水浴加热 10~60min, 每 10min 取样一次, 取出后迅速放置在冰水浴中降温, 测定残留的 PPO 活力。

1.3.4 pH 值对 PPO 活性的影响

采用 0.05mol/L、pH3~9.5 的缓冲液配制邻苯二酚底物溶液, 测定 PPO 活力, 得出 PPO 的最适 pH 值。采用的缓冲液为 pH3~5 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, pH5.5~8 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液, pH8.5~10 Tris-盐酸缓冲液。

1.3.5 金属离子对 PPO 活性的影响

在邻苯二酚底物溶液中分别添加 NaCl、KCl、 MgCl_2 、 CuSO_4 、 ZnSO_4 、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、 BaCl_2 、 MnSO_4 等金属盐类, 使其浓度为 5mmol/L, 测定粗酶液中 PPO 活力, 以不加金属离子作对照。

1.3.6 PPO 酶学动力学研究

用浓度为 0.05mol/L、pH7.0 的磷酸盐缓冲溶液配制

浓度为 $2\sim 30\text{mmol/L}$ 的邻苯二酚溶液, 在 20°C 测定 PPO 的活性, 由 Lineweaver-Burk 作图法得 V_{\max} 和 K_m 值。

1.3.7 PPO 活力测定

参照 Gawlik-Dziki 等^[4]的方法, 用 0.05mol/L、pH7.0 磷酸盐缓冲液配制 0.04mol/L 邻苯二酚溶液, 取 2.8ml, 加入 0.2ml 粗酶液, 混匀后在 420nm 波长处比色, 酶液加入后开始计时, 每 30s 记录 1 次 $OD_{420\text{nm}}$ 随时间的变化值, 以最初直线段的斜率计算酶活力。一个酶活力单位定义为在测定条件下, 每分钟引起光密度值改变 0.001 所需的酶量。

1.3.8 蛋白含量测定

采用 Lowry 法^[5], 以牛血清白蛋白为标准蛋白测定样品的蛋白含量。

2 结果与分析

2.1 多种植物和真菌中 PPO 活性和含量的比较

表 1 多种植物和真菌中 PPO 活性和含量的比较

Table 1 Contents and activities of polyphenol oxidase activity and from kinds of plant and fungus

参数	苹果	香蕉皮	梨	双孢蘑菇	茄子	山药	马铃薯	莴苣	芋艿
丙酮粉酶活力(U/g)	21600	2400	26000	208400	293000	7900	16600	5000	13100
比酶活(U/mg蛋白)	730	84	487	1345	3983	309	302	81	102
原料酶活(U/g)	380	135	489	11004	9376	730	3081	68	2211

由表 1 可知, 双孢蘑菇和茄子中丙酮粉酶活力相对较高, 分别为 208400U/g 和 293000U/g, 其他原料中丙酮粉酶活较低, 均低于 25000U/g。茄子 PPO 比酶活力最高, 为 3983U/mg 蛋白, 双孢蘑菇 PPO 比酶活力为 1345U/mg 蛋白, 而其他原料中比酶活力相对较低。另外, 双孢蘑菇和茄子中原料酶活也是最高的。因此, 选择双孢蘑菇和茄子为原料, 进行 PPO 酶学性质的研究和比较。

2.2 温度对双孢蘑菇 PPO、茄子 PPO 活性和稳定性的影响

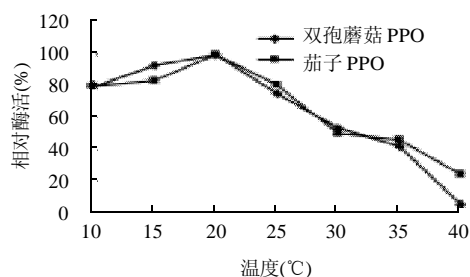


图 1 温度对双孢蘑菇 PPO 和茄子 PPO 活性的影响

Fig.1 Effect of temperature on activities of PPO from *Agaricus bisporus* and eggplant

由图1可知,双孢蘑菇PPO和茄子PPO的最适温度均为20℃,在10~25℃范围内相对酶活均在75%以上。当温度大于20℃时,随着温度的升高,酶活逐渐降低。当温度达到40℃时,双孢蘑菇PPO相对酶活仅为5.1%,茄子PPO相对酶活为24%。大多数植物和真菌PPO的最适温度较低,在20~30℃之间,如菊芋PPO最适温度为20℃^[6],黄冠梨为25℃^[7],香蕉^[8]、多孔菌^[9]、彩绒革盖菌^[9]、毛栓菌^[9]、咖啡叶和胚乳^[10]PPO最适温度都为30℃。但有些植物和真菌中PPO最适温度很高,如鸡腿菇45℃^[11],芒果50℃^[12],阿魏菇55℃^[13],冬甜瓜和厚皮甜瓜PPO的最适温度达到了60℃^[14]。

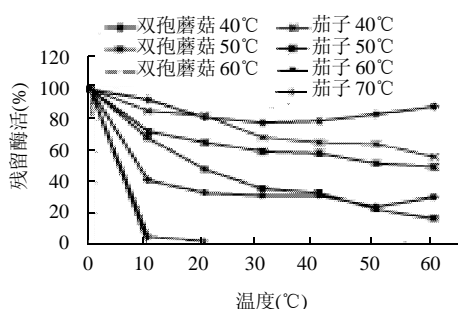


图2 温度对双孢蘑菇PPO和茄子PPO稳定性的影响

Fig.2 Thermal stability of PPO from *Agaricus bisporus* and eggplant

温度对双孢蘑菇PPO和茄子PPO稳定性的影响见图2。在40℃时,双孢蘑菇PPO孵育60min残留酶活能保持80%左右的活性,茄子PPO残留酶活仅能保持56.9%的活性。当高于40℃时,茄子PPO比双孢蘑菇PPO稳定性更好。在60℃保持10min,双孢蘑菇PPO残留酶活仅为0.6%。而茄子PPO在60℃保持60min,残留酶活为30.7%,在70℃保持20min,残留酶活为2.6%。

2.3 pH值对双孢蘑菇PPO和茄子PPO活性的影响

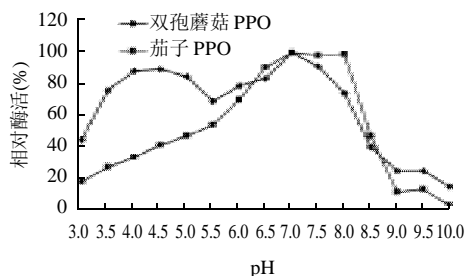


图3 pH值对双孢蘑菇PPO和茄子PPO活性的影响

Fig.3 Effect of pH value on activities of PPO from *Agaricus bisporus* and eggplant

由图3可见,双孢蘑菇PPO在pH3~10的范围内出现了两个峰,分别为pH4.5和7.0,且pH7.0时活力比

pH4.0高,可能在双孢蘑菇中存在PPO的同工酶。茄子PPO的最适pH值为7.0,且在pH6.5~8.0范围内相对酶活高于90%。大多数植物和真菌PPO的最适pH值在中性左右。以儿茶酚为底物时,香蕉^[8]、桑尺蠖^[15]、硬皮甜瓜^[14]中PPO最适pH值均为7.0,鸡腿菇^[11]、黄冠梨^[7]、多孔菌中PPO最适pH值为6.0^[9],阿魏菇为6.6^[13],芒果为6.86^[12],毛栓菌为5.2^[16],彩绒革盖菌为5.5^[9],菊芋为7.4^[6],冬甜瓜为7.5^[14],多孔菌为8.0,而洋蓍PPO的最适pH值范围很广,为5.0~9.0^[17]。

2.4 金属离子对双孢蘑菇PPO和茄子PPO活性的影响

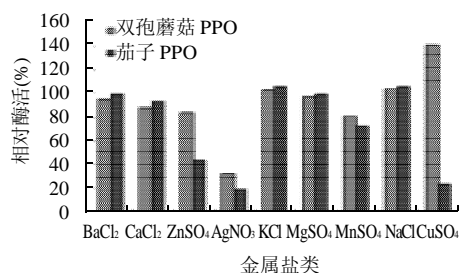


图4 金属离子对双孢蘑菇PPO和茄子PPO活性的影响

Fig.4 Effect of metal ions on activities of PPO from *Agaricus bisporus* and eggplant

由图4可以看出, Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对双孢蘑菇PPO和茄子PPO活性影响不大, K^{+} 、 Na^{+} 对PPO活力表现微弱的促进作用。 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ag^{+} 对PPO活力表现明显的抑制作用,其中 Ag^{+} 抑制作用最强,双孢蘑菇PPO和茄子PPO的残留酶活分别为32.3%和19.4%。 Cu^{2+} 对双孢蘑菇PPO活力表现很强的促进作用,相对酶活达到了140.9%,而对茄子PPO却有很强的抑制作用,相对酶活仅为23.4%。

2.5 双孢蘑菇PPO和茄子PPO的酶动力学研究

根据Lineweaver-Burk方程 $1/V = (1/S)K_m/V_{\max} + 1/V_{\max}$,以 $1/V$ 为纵坐标, $1/S$ 为横坐标作图,见图5、6。由此可得双孢蘑菇和茄子的PPO K_m 和 V_{\max} 分别为5.5mmol/L、1666.7U和8.75mmol/L、2500U。

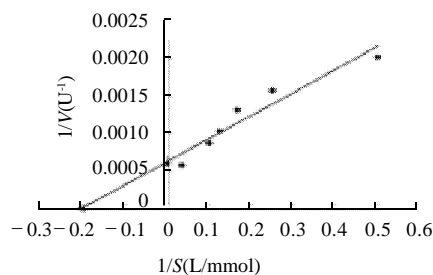


图5 双孢蘑菇PPO Lineweaver-Burk图

Fig.5 Lineweaver-Burk plots of PPO activity from *Agaricus bisporus* against temperature

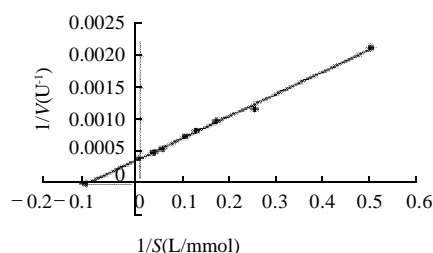


图6 茄子 PPO Lineweaver-Burk 图

Fig.6 Lineweaver-Burk plots of PPO activity from eggplant against temperature

3 结 论

本研究从多种植物和真菌出发,筛选出两种 PPO 活力较高的原料:双孢蘑菇和茄子,其丙酮粉酶活力分别为 208400U/g 和 293000U/g,原料酶活分别达到了 11004U/g 和 9376U/g,在所选原料中均为最高。双孢蘑菇 PPO 和茄子 PPO 的最适温度和 pH 值均分别为 20℃和 7.0,两种 PPO 对热均不太稳定。金属盐类对两种来源不同的 PPO 活力影响不同,说明 PPO 来源不同,其酶学性质差异也较大。双孢蘑菇 PPO 和茄子 PPO 对蛋白交联的效果有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 吴红梅,萧慧,刘刚,等.多酚氧化酶的研究进展[J].茶业通报,2004,26(2): 62-64.
- [2] TAKASAKI S, KAWAKISHI S, MURATA M, et al. Polymerisation of gliadin mediated by mushroom tyrosinase[J]. LWT, 2001, 34(8): 507-512.
- [3] MATTINEN M L, LANTTO R, SELINHEIMO E, et al. Oxidation of peptides and proteins by *Trichoderma reesei* and *Agaricus bisporus* tyrosinases[J]. J Biotechnol, 2008, 133(3): 395-402.
- [4] GAWLIK-DZIKI U, ZLOTEK U, SWIECA M. Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata L.) [J]. Food Chem, 2008, 107(1): 129-135.
- [5] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193(1): 265-275.
- [6] 胡建锋,邱树毅,胡秀沂,等.菊芋多酚氧化酶的酶学特性研究[J].食品科技,2007,32(9): 22-25.
- [7] 龚新明,崔彦红,关军锋,等.黄冠梨果皮多酚氧化酶的酶学特性[J].安徽农业科学,2008,36(31): 13541-13543.
- [8] ÜMIT ÜNAL M. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*) [J]. Food Chem, 2007, 100(3): 909-913.
- [9] 王宜磊.白腐菌多酚氧化酶研究[J].山东理工大学学报:自然科学版,2003,17(1): 100-102.
- [10] MAZZAFERA P, ROBINSON S P. Characterization of polyphenol oxidase in coffee[J]. Phytochemistry, 2000, 55(4): 285-296.
- [11] 李君兰,李怡华,赵秋玲,等.鸡腿蘑多酚氧化酶特性研究[J].食品科学,2007,28(1): 187-191.
- [12] 汤凤霞,魏好程,曹禹.芒果多酚氧化酶的特性及抑制研究[J].食品科学,2006,27(12): 156-160.
- [13] 张桂芝,杜付.阿魏菇中多酚氧化酶特性及其抗褐变剂的研究[J].新疆农业大学学报,2004,27(1): 73-76.
- [14] CHISARI M, BARBAGALLO R N, SPAGNA G. Characterization and role of polyphenol oxidase and peroxidase in browning of fresh-cut melon[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(1): 132-138.
- [15] 张永亮,曾媛琴,贾永红,等.桑尺蠖多酚氧化酶的纯化及其部分生物化学性质[J].西南大学学报:自然科学版,2007,29(9): 86-90.
- [16] AYDEMIR T. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads[J]. Food Chem, 2004, 87(1): 59-67.