

菜豆豆荚多酚氧化酶的酶学特性研究

李雯妮, 赵秀文, 田维娜*, 曹建康, 姜微波

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 目的: 了解菜豆豆荚多酚氧化酶(polyphenol Oxidase, PPO)的酶学特性。方法: 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)法对菜豆豆荚 PPO 的最适 pH 值、最适温度、底物专一性、激活剂及抑制剂进行研究。结果: 菜豆豆荚 PPO 最适 pH 值为 6.0; 最适温度为 30℃, 且温度为 30℃时, 该酶具有较强的热稳定性, 80℃可使其完全失活; 该酶对不同酚类物质表现出不同的底物专一性, 邻苯二酚为该酶的最适底物; 抗坏血酸、L-半胱氨酸、 β -巯基乙醇、甘氨酸均能抑制该酶的活性, 而 1.0mmol/L β -巯基乙醇或抗坏血酸可完全抑制其活性; 氯化铜、尿素对该酶均有激活作用, 其中氯化铜的激活作用明显。结论: 高温、偏碱性环境、 β -巯基乙醇或抗坏血酸处理均可有效抑制菜豆豆荚 PPO 活性。

关键词: 多酚氧化酶; 酶学特性; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 菜豆豆荚

Enzymatic Properties of Polyphenol Oxidase from Kidney Bean Pods

LI Wen-ni, ZHAO Xiu-wen, TIAN Wei-na*, CAO Jian-kang, JIANG Wei-bo

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

Abstract: Objective: To explore enzymatic properties of polyphenol oxidase (PPO) from kidney bean pods (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Shuangqing). Methods: The optimal pH, temperature, substrate specificity and inhibitors of PPO were evaluated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Results: The optima pH for PPO activity was 6.0. The PPO was relatively stable at 30℃ and inactivated at 80℃. Catechol was the optimal substrate for the enzyme. Its activity was inhibited by ascorbic acid, β -mercaptoethanol, glycine or L-cysteine. Moreover, the PPO activity was inhibited completely by 1.0 mmol/L β -mercaptoethanol or ascorbic acid; however, it was activated by copper dichloride and carbamide. Conclusion: High temperature, high pH and β -mercaptoethanol or ascorbic acid can inhibit the activity of the PPO enzyme.

Key words: polyphenol oxidase; polyphenol property; polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE); kidney bean pod
中图分类号: TS201.21 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2011)17-0269-04

菜豆(*Phaseolus vulgaris* L. cv. Shuang qing)多以嫩荚作为蔬菜食用,在贮藏过程中,豆荚极易失水萎蔫,纤维化程度严重,极大的限制鲜食菜豆的贮藏销售^[1]。目前,有关果蔬多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)酶学特性的研究较多^[2],尤其是有关芒果^[3]、生菜^[4]、花椰菜^[5]的 PPO 酶学特性研究较早且较成熟,而有关菜豆 PPO 酶学特性研究却鲜见报道。明确菜豆豆荚 PPO 酶学特性,可为探寻菜豆衰老的调控措施提供理论依据。

目前,有关果蔬组织 PPO 酶学特性的研究方法多集中于分光光度法,该法具有一定局限性。而采用凝

胶电泳技术对果蔬 PPO 同工酶特性进行探究,不仅可以避免分光光度法只能测定样品总体酶活性变化的弊端,而且可以在电泳胶片上分析比较不同 PPO 同工酶的活性。另外,采用凝胶电泳技术可以避免纯化 PPO 时复杂繁琐的过程,无需纯化就可对同一胶片上对不同的 PPO 同工酶进行特性分析,明确不同同工酶各自的特性,为定性分析 PPO 同工酶提供了新的分析方法^[3]。目前还未见采用凝胶电泳的方法对菜豆豆荚中多酚氧化酶酶学特性进行研究的报道。本实验拟采用聚丙烯酰胺电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)的方法对

收稿日期: 2010-12-07

基金项目: 国家“863”计划项目(2008AA100803); 中央高校基本科研业务费专项基金项目(2010JS075)

作者简介: 李雯妮(1989—),女,本科生,主要从事食品安全研究。E-mail: liwenni08@163.com

* 通信作者: 田维娜(1981—),女,博士研究生,主要从事果蔬采后生理研究。E-mail: twncinderella@163.com

菜豆豆荚多酚氧化酶的酶学特性进行研究,以期明确该酶性质,为控制菜豆豆荚在贮藏和加工提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菜豆(*Phaseolus vulgaris* L. cv. Shuang qing)采自北京市密云县,采摘当天转运至实验室。

1.2 方法

1.2.1 样品处理

选择外观颜色均匀,成熟度一致的菜豆取样测定。称取 1g 菜豆豆荚,加入 5mL pH7.5 的 Tris-HCl 提取缓冲液(内含 2% 聚乙烯吡咯烷酮),在冰浴中充分研磨,匀浆转移至离心管,4℃、10000 × g 离心 30min,收集上清液,立即进行电泳。

1.2.2 菜豆豆荚 PPO 同工酶活性测定方法

PPO 活性分析参照姜微波^[6]的方法并加以改进。采用垂直板凝胶电泳进行分离。10% 分离胶,4% 浓缩胶,电极缓冲液为高离子强度 pH8.3 的 Tris-Gly 系统。浓缩胶所加电压为 75V,分离胶所加电压为 150V,在 4℃ 条件下进行电泳,以溴酚蓝为指示剂,当其延至封底胶时结束电泳。

取 1.2.1 节样品中的上清液 25 μL 与 2 × 样品缓冲液(内含 1.0mol/L Tris-HCl、50% 的甘油、10g/L 的溴酚蓝)25 μL 混合均匀后,按预定顺序上样,每孔上样量为 25 μL。单槽上样时,菜豆豆荚酶粗提取液 310 μL 与 2 × 样品缓冲液 310 μL 混合均匀后,每孔上样量为 600 μL。

染色方法参照 Jean 等^[7]的方法,略有改进。0.6g/L 苯二胺(0.01mol/L 草酸溶解)、10g/L 苯二酚、0.05mol/L pH6.8 磷酸缓冲液 3 种溶液按 1:3:1(V/V)比例配制,现配现用,倒入透明塑料盒中,电泳完毕后将胶片放入盒中,至酶带显现清晰,去除漂洗,并拍照记录结果。

1.2.3 PPO 的最适 pH 值

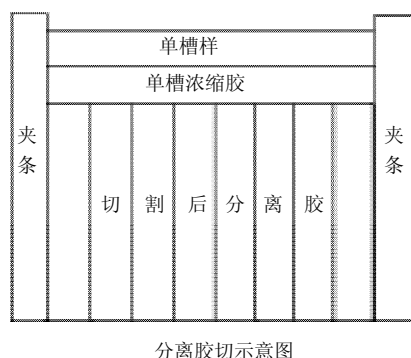


图1 分离胶切胶示意图

Fig.1 Sketch map of slicing the separating gel

将醋酸缓冲液、磷酸缓冲液、甘氨酸-氢氧化钠缓冲液分别配制成 0.1mol/L pH3.0~5.0、6.0~8.0、9.0~12.0 的缓冲液。参照姜微波^[6]的方法,浓缩胶灌至距离玻璃板凹面 1cm 处停止灌胶,不加梳子成单个加样槽(图 1)。电泳结束后,将凝胶纵向切成同等宽度的凝胶条,切好的凝胶条分别置于不同 pH 值的缓冲液中。

1.2.4 PPO 的最适反应温度

将酶液分别在 30、40、50、60、70、80、90、100℃ 水浴中保温 10min 后迅速放入冰浴中冷却,于 4℃、10000 × g 离心 10min,收集上清液,立即进行电泳。

1.2.5 PPO 底物专一性

制备电泳凝胶时将浓缩胶做成单槽,电泳结束后,将凝胶纵向切成同等宽度的凝胶条,将凝胶条分别置于邻苯二酚、焦苯酸、间苯二酚、间苯三酚、酪氨酸、愈创木酚的染色液中进行染色。

1.2.6 不同浓度激活剂对 PPO 活性的影响

制备电泳凝胶时将浓缩胶做成单槽,电泳结束后,将凝胶纵向切成同等宽度的凝胶条,将凝胶条分别置于含不同浓度的激活剂的染色液中进行染色。用于测定的激活剂包括氯化铜、尿素^[8-10]。

1.2.7 不同浓度抑制剂对 PPO 活性的影响

制备电泳凝胶时将浓缩胶做成单槽,电泳结束后,将凝胶纵向切成同等宽度的凝胶条,将凝胶条分别置于含不同浓度的抑制剂的染色液中进行染色。用于测定的抑制剂包括抗坏血酸、L-半胱氨酸、β-巯基乙醇、甘氨酸^[8-10]。

2 结果与分析

2.1 菜豆豆荚 PPO 最适反应 pH 值

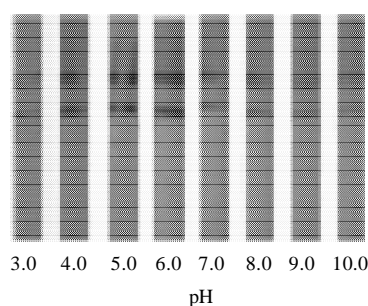


图2 菜豆豆荚 PPO 最适应 pH 值

Fig.2 Optimal pH for the activity of PPO from kidney bean pods

以邻苯二酚为底物,不同 pH 值的染色液对菜豆豆荚 PPO 同工酶的染色效果不同。结果如图 2 所示,当 pH6.0 时,胶片上的条带最为清晰,说明菜豆豆荚 PPO 同工酶在 pH 6.0 时活性最大;当 pH < 6.0 或 pH > 6.0

的染色条件下,胶片上的条带清晰度有所减弱,说明菜豆豆荚PPO酶在强酸或碱性环境下,其活性有所降低。由此可知,菜豆豆荚PPO的最适反应pH值为6.0,pH值降低或升高,酶活性均会减弱。因而,在菜豆贮藏加工过程中,为避免由于PPO酶活性升高而产生的品质劣变,可使其远离pH6.0的范围。

2.2 菜豆豆荚PPO最适反应温度

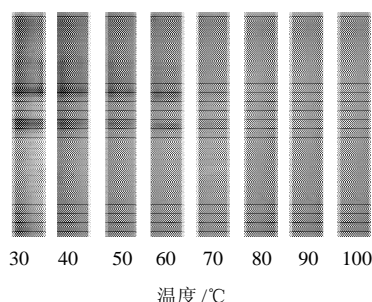


图3 菜豆豆荚PPO最适反应温度

Fig.3 Optimal temperature for the activity of PPO from kidney bean pods

如图3所示,当处理温度为30~70℃时,胶片均有酶带呈现,条带颜色随着温度的升高而变浅,说明随着温度的升高,菜豆豆荚PPO活性逐渐降低。当处理温度为30~50℃时,胶片上所呈现的条带较为清晰,而当处理温度为60~70℃时,菜豆豆荚PPO同工酶条带较浅,说明30~50℃的处理温度对菜豆豆荚PPO的活性影响较小;当处理温度为80~100℃时,胶片上没有条带出现,说明80~100℃的热处理会将菜豆豆荚PPO酶活性完全抑制。

2.3 菜豆豆荚PPO底物专一性

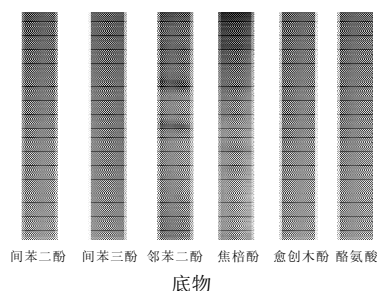


图4 菜豆豆荚PPO底物专一性

Fig.4 Substrate specificity of PPO from kidney bean pods

如图4所示,当底物为邻苯二酚时,菜豆豆荚PPO同工酶条带最为清晰,而其余的5种酚类化合物只有焦梧桐有隐约条带,说明该酶对不同的酚类物质表现出不同的底物专一性,而对邻苯二酚的底物专一性最强,其余的酚类物质底物专一性都远不如邻苯二酚,焦梧桐存在一定的底物专一性而间苯二酚、间苯三

酚、愈创木酚和酪氨酸几乎对菜豆豆荚多酚氧化酶没有底物专一性。

2.4 不同激活剂对菜豆豆荚PPO的影响

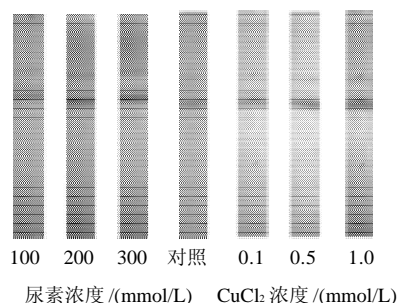
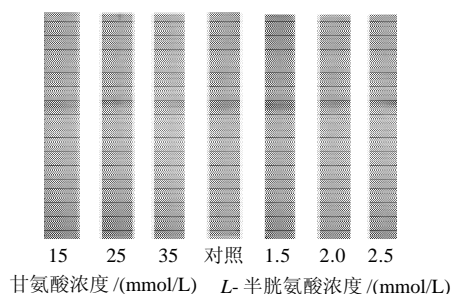


图5 不同激活剂对菜豆豆荚PPO的影响

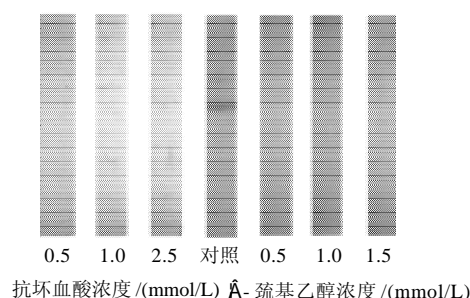
Fig.5 Effects of activators on the activity of PPO from kidney bean pods

如图5所示,氯化铜、尿素对菜豆豆荚PPO均有激活效果,其中氯化铜效果较为明显,1.0mmol/L就能使胶片的条带加粗、加深,有效激活菜豆豆荚PPO的活性。

2.5 不同抑制剂对菜豆豆荚PPO的影响



甘氨酸浓度/(mmol/L) L-半胱氨酸浓度/(mmol/L)



抗坏血酸浓度/(mmol/L) β-巯基乙醇浓度/(mmol/L)

图6 不同抑制率对菜豆豆荚PPO的影响

Fig.6 Effects of inhibitors on the activity of PPO from kidney bean pods

如图6所示,β-巯基乙醇和抗坏血酸对菜豆豆荚PPO的抑制效果最为明显,0.5mmol/L就可以完全抑制菜豆豆荚PPO的活性,而2.5mmol/L L-半胱氨酸对PPO有较好的抑制效果,但只能抑制大部分PPO活性。甘氨酸

酸的抑制效果相对较差, 25mmol/L 的甘氨酸只能抑制部分 PPO 活性。

3 讨 论

目前有关果蔬 PPO 酶学特性的研究大多局限于分光光度法, 得到的结果多为样品 PPO 的整体特性^[11-13], 但是缺乏对某一特定果蔬的不同 PPO 同工酶特性进行分析的研究。本实验采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术可以避免分光光度法只能测定样品总体酶活性变化的弊端以及纯化 PPO 时复杂繁琐的过程, 可在同一胶片上对不同的 PPO 同工酶进行特性分析, 明确不同同工酶各自的特性。从茄子果实中分离出的 PPO, 其最适 pH 值为 5.0, 最适温度为 30℃^[14], 对欧渣果 PPO 酶学特性的研究表明, 其最适底物为愈创木酚, 最适 pH 7.0, 最适温度为 30℃左右^[15]。而本实验结果表明, 菜豆豆荚 PPO 最适 pH 值为 6.0; 最适温度为 30℃, 该酶对温度有较强的稳定性, 80℃完全失活。这些研究结果表明, 果蔬种类、品种不同其 PPO 酶学特性不尽相同。而同种抑制剂对不同 PPO 的抑制作用也不尽相同^[16]。在对菜豆豆荚 PPO 底物专一性的研究中发现其对苯二酚和焦棓酚体现了底物的专一性, 说明邻位酚类对该酶的亲和性大于对位和间位酚类。总之, 菜豆豆荚 PPO 耐热能力强, 适度高温、碱性条件、 β -巯基乙醇或抗坏血酸处理可抑制该酶的活性。

参考文献:

- [1] ARMELIM J M, CANNIATTI-BRAZACA S G, SPOTOM H F, et al. Quantitative descriptive analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under gamma radiation[J]. Journal of Food Science, 2006, 71(1): 8-12.
- [2] RAMIREZ E C, WHITAKER J R, VIRADOR V M. Polyphenoloxidase [M]// WHITAKER J R, VORAGEN A G J, WONG D W S. Handbook of food enzymology[M]. New York: Marcel Dekker, 2004: 509-522.
- [3] 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.
- [4] GAWLIK-DZIKI U, ZLOTEK U, SWIECA M. Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.) [J]. Food Chemistry, 2008, 107: 129-135.
- [5] GAWLIK-DZIKI U, SZYMANOWSKA U, BARANIAK B. Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets[J]. Food Chemistry, 2007, 105: 1047-1053.
- [6] 姜微波. 凝胶电泳分析蛋白酶活性的技术改进[J]. 植物学通报, 2002, 19(5): 607-610.
- [7] JEAN S, MIELKE E A. Identification of seedless table grape cultivars and a bud sport with berry isozymes[J]. Horticultural Science, 1982, 111: 933-937.
- [8] DOĞAN M, ARSLAN O, DOĞAN S. Substrate specificity, heat inactivation and inhibition of polyphenol oxidase from different aubergine cultivars[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2002, 37: 415-423.
- [9] GUERRERO-BELTRÁN J A, SWANSON B G, BARBOSA-CÁNOVAS G V. Inhibition of polyphenol oxidase in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid[J]. LWT, 2005, 38: 625-630.
- [10] LAVEDA F, NÚÑEZ-DELICADO E, GARCIA-CAOMONA F, et al. A reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins[J]. Archives Biochemistry Biophysics, 2000, 379: 1-6.
- [11] 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.
- [12] 程建军, 马莺, 杨咏丽, 等. 苹果梨中多酚氧化酶酶学特性的研究[J]. 园艺学报, 2002, 29(3): 261-262.
- [13] ÚNAL M Ú. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana[J]. Food Chemistry, 2007, 100: 909-913.
- [14] CONCELLÓN A, AÑÓN M C, CHAVES A R. Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature[J]. Food Chemistry, 2004, 88: 17-24.
- [15] AYAZ F A, DEMIR O, TORUN H, et al. Characterization of polyphenol oxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening[J]. Food Chemistry, 2008, 106: 291-298.
- [16] MAYER A M, HAREL E. Polyphenol oxidases in plants[J]. Phytochemistry, 1979, 18: 193-215.