

信息与资料 Information and Data

芋中多酚氧化酶的某些催化特性检测

何士敏* 严德兵** 李昌满 王慧超

涪陵师范学院生命科学系, 重庆涪陵 408003

Detection of Some Catalytic Characteristics of Polyphenol Oxidase in Taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott]

HE Shi-Min*, YAN De-Bing**, LI Chang-Man, WANG Hui-Chao

Department of Life Science, Fuling Teacher's College, Fuling, Chongqing 408003, China

提要 芋中多酚氧化酶催化反应的最适pH为7.6, 最适温度为10℃, 以邻苯二酚为底物时的 $K_m=0.115 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $V_{\max}=0.600 \text{ OD}\cdot\text{min}^{-1}$ 。硫脲和抗坏血酸完全抑制酶活性, 抗坏血酸抑制表现出滞后性。SDS对酶有激活作用。

关键词 芋; 多酚氧化酶; 催化特性

芋 [*Colocasia esculenta* (L.) Schott], 又称芋头、芋艿, 属天南星科多年生草本植物, 作一年生栽培。主产区在非洲、亚洲的中国和日本等。芋头具有丰富的营养成分和疗效成分, 口感滑爽, 香气普遍受欢迎, 风味独特。芋头表皮带毛, 难以清除, 人接触后易导致皮肤瘙痒, 给家庭食用带来不便, 宜集中处理后制成鲜切产品销售。有关鲜切芋头生理生化代谢过程的研究还相当缺乏, 制约了其产业化发展(王佳宏等 2005; 姜绍通等 2001)。多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)是植物体中普遍存在的一类铜结合酶, 其催化多酚氧化成醌, 醌再聚合成有色物质, 从而引起植物的褐变。PPO酶促褐变与果蔬加工、组织培养以及植物的抗病性关系密切, 因此PPO的研究有一定的实用价值(赵伶俐等 2005; 陈艳乐等 2006)。从总体上讲, 芋头PPO的报道甚少, 本文对其一些催化特性进行了检测, 旨在为芋头的栽培和产品加工中防止芋头酶促褐变提供参考。

材料与方法

芋 [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] 从重庆涪陵市市场购得。制备PPO酶液时, 选取新鲜芋头5个, 洗净、去皮、擦干、剁碎, 称取5g碎沫放入研钵中, 加入15 mL 0.2 mol·L⁻¹ pH 7.6的磷酸缓冲液, 再加少许石英砂, 冰浴研磨后用磷酸缓冲

液定容至100 mL。转入离心管, 以2 578×g离心15 min, 取上清液即为酶液(李敏等 2005; 邵远志和李文 2006)。选择测定波长时, 取1 mL 0.2 mol·L⁻¹ pH 6.8的磷酸缓冲液和1 mL 0.2 mol·L⁻¹的邻苯二酚溶液, 迅速加入酶液0.5 mL。立即混合均匀, 于波长350~520 nm范围内, 用U-1800型紫外可见分光光度计(日立公司)每间隔10 nm测定吸光值。选吸光值最大的波长为测定波长。

以邻苯二酚为底物时, 芋的PPO催化反应产物的最大吸收波长为410 nm。这与我们用扫描法测定其反应产物的最大吸收峰为410 nm相一致, 也与陈乃富(2003)和杨颖等(2005)的结果一致。

用U-1800型紫外可见分光光度计测定PPO活性时, 取1 mL 0.2 mol·L⁻¹的邻苯二酚溶液放入光径为1 cm的比色皿中, 再将2 mL酶液加入到4 mL 0.2 mol·L⁻¹ pH 7.6的磷酸缓冲液中, 混合后取1.5 mL迅速注入比色皿中, 于波长410 nm处测定吸光值。以蒸馏水代替酶液作为空白对照。加入酶液后记录OD值的变化, 以反应初速度(最初直线段)为酶活性, 以 $\Delta\text{OD}\cdot\text{min}^{-1}$ 表示[参照陈乃富(2003)和鲍金勇等(2005)文中的方法并做了修改]。

收稿 2006-07-13 修定 2006-11-15

资助 涪陵师范学院重点建设实验室项目。

*E-mail: heshimin5589@sina.com, Tel: 023-87807191

** 涪陵师范学院生命科学系2002级本科生。

结果与讨论

1 pH对PPO活性的影响

由图1可知, 芋的PPO活性最适pH值为7.6, 在pH 6.8时有一小高峰。若测定时间延长, 即由原来的0~10 s延长到0~30 s, pH 6.8的PPO活性大于pH 7.6的, 因此不能认定芋的PPO活性的最适pH值为6.8。因为pH 7.6下达到峰值的时间比pH 6.8的短。芋的PPO对pH变化较敏感,

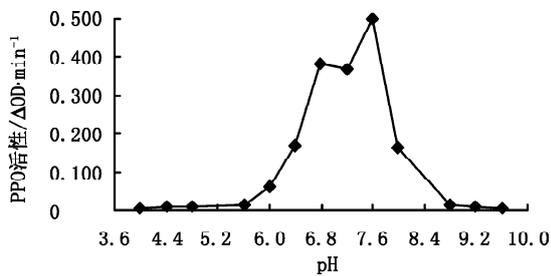


图1 pH对PPO活性的影响

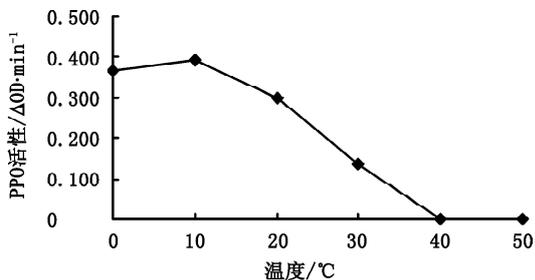


图2 温度对PPO活性的影响

pH 小于 5.6 或大于 8.8 时, 其活性都基本上丧失。

2 温度对PPO活性的影响

由图2可知, 芋头PPO不耐高温, 其最适温度为10℃, 0℃下有较高活性, 高于10℃时活性迅速下降。这与李敏等(2005)和雷东锋等(2004)在马铃薯中得到的PPO活性变化结果一致。

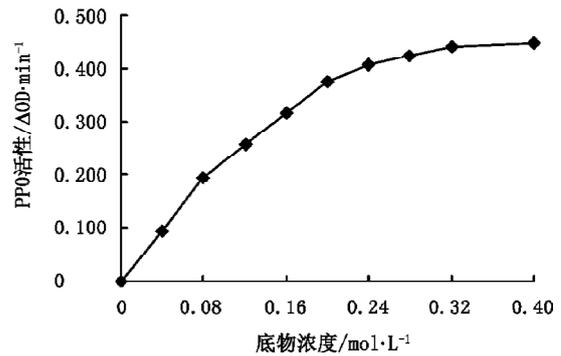


图3 底物浓度对PPO活性的影响

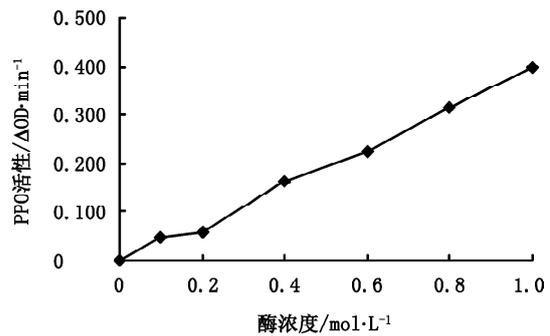


图4 酶浓度对PPO活性的影响

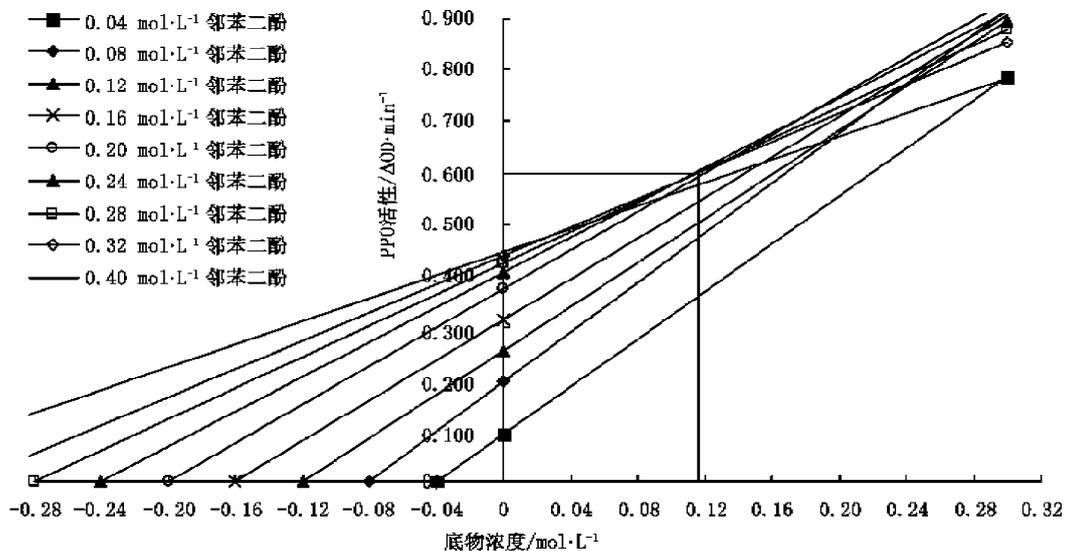


图5 Eisenthal和Cornish-Bowden直线图

3 PPO酶促反应动力学

由图3可知, 底物浓度对反应速率的影响呈明显的双曲线特征。在做产物生成的时间扫描时, 见到产物生成后立即被还原, 体系中颜色变化为: 无色—黄色—无色—红色, 这可能是由于酶液纯度不够所致, 具体原因有待进一步研究。在较低的酶浓度下, 酶浓度与反应速率呈线性增长(图4)。由于计算酶活力的时间很短, 因此我们认为氧不是反应限制性因素, 可近似地看成是米氏方程所描述的单底物酶促反应动力学。用Eisenthal和Cornish-Bowden直线性作图法对其作图(Chazarra等2001), 其相应的动力学参数 $K_m=0.115 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $V_{\max}=0.600 \text{ OD}\cdot\text{min}^{-1}$ (图5), 其动力学方程为: $v=(6.00\times 10^{-1}\cdot[S])/(0.115+[S])$ 。其中, v 为PPO酶促反应的速度, $[S]$ 为底物浓度。

4 抑制剂和激活剂对PPO活性的影响

由图6和图7可知: 硫脲和抗坏血酸均强烈抑制PPO活性, 抗坏血酸的抑制程度高于硫脲且表现出滞后性。此外, $0.04\sim 4.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的十二烷基硫酸钠(SDS)激活效果基本相当, 且其活性随着加入时间的长短变化并不明显(图8)。高浓度SDS有明显的激活作用, 但其随着时间的进程

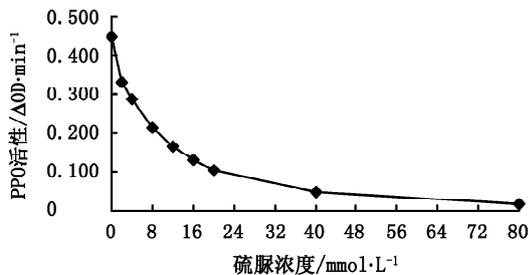


图6 硫脲对PPO活性的影响

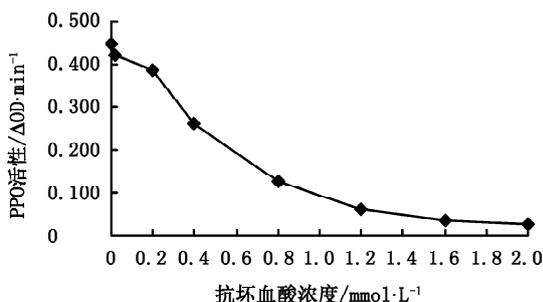


图7 抗坏血酸对PPO活性的影响

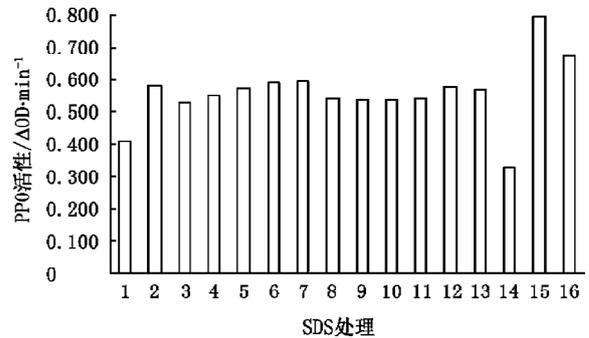


图8 SDS对PPO活性的影响

1: 对照; 2: $0.04 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS处理; 3、4: $0.10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS处理0.5、9 min; 5、6、7: $0.20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS处理0.5、9、18 min; 8、9、10: $0.40 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS处理0.5、9、18 min; 11、12、13: $2.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS处理0.5、9、18 min; 14、15、16: $4.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS处理0.5、9、18 min。

表现出不稳定性, 其原因尚不清楚, 有待进一步研究(Golan-Goldhirsh和Whitaker 1984)。

参考文献

- 鲍金勇, 赵国建, 梁淑如, 杨明珊, 杨公明(2005). 香蕉皮多酚氧化酶过氧化物酶特性的研究. 食品科技, (11): 7~9
- 陈乃富(2003). 蕨菜多酚氧化酶的酶学性质. 云南植物研究, 25(6): 705~710
- 陈艳乐, 陶月良, 明镇寰(2006). 沙藏、维生素C和亚硫酸氢钠对薯蓣块茎贮藏期间褐变的影响. 植物生理学通讯, 42(1): 24~26
- 姜绍通, 罗志刚, 潘丽军(2001). 甘薯中多酚氧化酶活性的测定及褐变机制. 食品科学, 22(3): 19~22
- 雷东锋, 冯怡, 蒋大宗(2004). 植物中多酚氧化酶的特征. 自然科学进展, 14(6): 606~611
- 李敏, 刘磊, 郭玉蓉, 陈德蓉, 李永才(2005). 马铃薯多酚氧化酶的特性研究. 甘肃农业大学学报, (2): 189~192
- 邵远志, 李文(2006). 温度、抗坏血酸、柠檬酸和氯化钠对采后红毛丹果实几种生理指标与品质的影响. 植物生理学通讯, 42(2): 203~206
- 王佳宏, 郁志芳, 陆胜民, 杜传来, 周娴(2005). 鲜切芋艿褐变特性研究. 食品科学, 26(9): 80~82
- 杨颖, 王璋, 许时婴(2005). 百合中多酚氧化酶的部分性质. 研究与探讨, 26(9): 99~101
- 赵伶俐, 范崇辉, 葛红, 刘洪涛(2005). 植物多酚氧化酶及其活性特征的研究进展. 西北林学院学报, 20(3): 156~159
- Chazarra S, García-Carmona F, Cabanes J(2001). Hysteresis and positive cooperativity of iceberg lettuce polyphenol oxidase. Biochem Biophys Res Commun, 289: 769~775
- Golan-Goldhirsh A, Whitaker JR(1984). Effect of ascorbic acid sodium bisulfite and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. J Agr Food Chem, 32: 1003~1009