

蜜柚多酚氧化酶的酶学特性与活性测定研究

纪淑娟¹, 尹竞男^{1,2}, 李家政²

(1. 沈阳农业大学 食品学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 国家农产品保鲜工程技术研究中心,

天津市农产品采后生理与贮藏保鲜重点实验室, 天津 300384)

摘要:以邻苯二酚为底物,采用分光光度法在 420 nm 处测定蜜柚多酚氧化酶(PPO)的活性,研究底物浓度、pH、温度及酶液浓度对 PPO 活性的影响,并建立了酶促褐变反应动力学方程。结果表明:蜜柚多酚氧化酶的酶促反应符合米氏方程所描述的单底物酶促反应动力学,以邻苯二酚为底物的最大反应速度为: $V_{\max}=22.452$ U/min, $K_m=128.2$ mmol/L。蜜柚多酚氧化酶作用的最适 pH 6.4,最适温度为 10℃。不同时间的蜜柚多酚氧化酶的平均活性呈逐渐下降的趋势。

关键词:蜜柚;多酚氧化酶;酶学特性;测定

中图分类号:S 666.3 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2010)17-0171-04

褐变是果蔬采后重要的生理变化现象^[1-2],并直接影响着果蔬贮藏的品质和商品价值。果蔬采后的褐变主要是多酚氧化酶(PPO)引起的^[3-5]。多酚氧化酶是一类含 Cu 元素的膜结合蛋白,它催化果蔬体内的多酚类物质氧化形成醌,后者自身缩合或与细胞内蛋白质结合,形成褐色或黑色物质。多酚氧化酶活性测定已成为采后果蔬生理研究的重要内容^[6-8]。但不同植物的多酚氧化酶的酶学特性差异很大^[9-12],因而对测定方法的要求也有所不同。课题组研究初步表明,蜜柚在贮藏后期具有较高的多酚氧化酶活性,并与果肉颜色变暗有直接的联系(待发表)。但蜜柚多酚氧化酶的酶学特性研究尚未见文献报道。该试验对蜜柚多酚氧化酶的基本酶学特性进行研究,并确定其最佳测定方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蜜柚:购于超市的鲜果,产地为福建漳州。果体大小均匀,色泽一直,外观良好,无机械外伤。邻苯二酚、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、三氯乙酸:均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 PPO 的提取 取 1 g 蜜柚果肉样品,冰浴研磨,加入预冷的磷酸缓冲液(pH 6.4)20 mL,在 4℃下离心(4 200 r/min)10 min,取上清液为蜜柚果肉 PPO 酶提

取液。

1.2.2 PPO 活性测定 采用比色法测定。将 1 mL(0.1 mol/L)邻苯二酚加入 4 mL 磷酸缓冲液(pH 6.4)中,加入 1 mL 酶液,立即于波长 420 nm 下测定吸光度的变化,每隔 20 s 记录 1 次,共记录 3 min。以不加酶提取液的反应液做对照,以每分钟吸光度变化 0.01 为 1 个 PPO 酶活性单位。

1.2.3 底物浓度对 PPO 活性的影响 在室温(18℃)下将 pH 6.4 的磷酸缓冲液 4 mL 加入 1 mL 邻苯二酚(浓度分别为 0.01、0.02、0.04、0.08、0.1 M)中,按 1.2.2 的方法测定不同底物浓度下的 PPO 活性。

1.2.4 PPO 最适 pH 配制不同 pH 的磷酸氢二钠—磷酸二氢钠缓冲液,取酶液 1 mL、0.1 M 邻苯二酚 1 mL 分别加入不同 pH 的磷酸缓冲液 4 mL,立即在 420 nm 下测定吸光度值。以不同 pH 但不加酶提取液的反应液做对照,测定方法同上。

1.2.5 PPO 最适反应温度和对温度的稳定性 参照段玉权等^[10]的方法,将 0.1 M 的邻苯二酚 1 mL、pH 6.4 的磷酸缓冲液 4 mL 和酶提取液 1 mL 混合,在不同温度水浴(0~90℃,间隔为 10℃)中分别保温 10 min 后,加三氯乙酸终止反应,反应液冷却至室温,在 420 nm 处测定吸光度值。对温度的稳定性测定是将 0.1 M 的邻苯二酚 1 mL、pH 6.4 的磷酸缓冲液 4 mL 混合液分别在 80℃、90℃水浴中分别保温 5、10、20 min,将反应液迅速冷却至室温,加入酶提取液 1 mL,参照 1.2.2 的方法测定残余酶的吸光度值变化。

1.2.6 不同 PPO 浓度下的平均酶活性的测定 在室温(18℃)、pH 6.4 条件下测定不同酶液浓度时产物吸光度随时间的变化。分别在 4.9、4.8、4.6、4.4、4.2 和 4.0 mL 磷酸缓冲液(pH 6.4)中加入 1 mL 0.1 M 的邻苯二酚,

第一作者简介:纪淑娟(1960-),女,博士,教授,现主要从事食品质量管理控制教学和研究工作。

通讯作者:李家政(1965-),男,博士,副研究员,现主要从事果蔬保鲜技术与开发。E-mail:lijzh163@163.com。

基金项目:科技部“十一五”科技支撑计划重点资助项目(2006BAD3001)。

收稿日期:2010-05-07

再分别加入 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 酶提取液,于不同反应时间测定波长 420 nm 下吸光度值。酶平均活性为测定时间内产物吸光度的平均变化率,以平均每分钟吸光度变化 0.01 为 1 个 PPO 酶活性单位。

2 结果与分析

2.1 底物浓度对 PPO 活性的影响

底物浓度对 PPO 活性的影响见图 1。当酶提取液含量为 1 mL 时,随着底物浓度从 10 上升到 60 mmol/L 上,酶反应活性逐渐增加。此后随底物浓度的继续上升,酶反应活性不再增加。说明底物浓度达到 60 mmol/L 时酶已完全被饱和,底物开始过量。此时,提高底物浓度增加不会增加酶促反应速率。

底物浓度达到 60 mmol/L 后,酶反应活性随底物浓度显略微下降的趋势。这种趋势说明底物浓度与 PPO 活性的关系遵从米氏方程的酶促反应动力学规律。将米氏方程: $V = V_{max} \cdot [s] / (K_m + [s])$ 转化成倒数形式: $1/V = K_m/V_{max} \cdot 1/[s] + 1/V_{max}$, 以 1/V 对 1/[s] 作

图(图 2),从图中直线的斜率和其在纵坐标上的截距可求得 K_m 为 128.2 mmol/L, V_{max} 22.452 U/min。米氏常数(K_m)是酶的基本特征常数,反映酶与底物结合与解离的性质, K_m 越大酶与底物结合的亲和力越小。文献报道,中华寿桃的多酚氧化酶的 K_m 为 23.8 mmol/L^[10],不同品种杨桃的多酚氧化酶的 K_m 在 3.79~6.8 mmol/L 之间^[13]。与这些多酚氧化酶相比,蜜柚多酚氧化酶的 K_m 值偏高,显示其反应时与底物亲和力较小。

2.2 pH 对蜜柚 PPO 活性的影响

以邻苯二酚为底物,蜜柚果肉的 PPO 活性与 pH 的关系见图 3。当 pH 低于 4 时,PPO 活性较低,此后随 pH 增加,酶活力逐渐增加。当 pH 6.4 时酶活性最大。pH>6.4 时,PPO 活性则迅速下降。这种规律与李桂琴^[8]、段玉权^[10] 等报道的结果基本一致。PPO 是结合 Cu 的蛋白质,在碱性条件下 Cu 很容易析出,从而直接影响其活性。

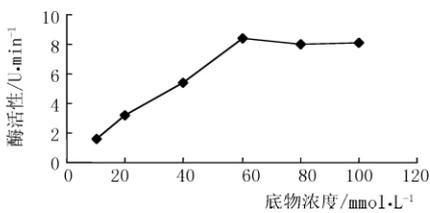


图 1 底物浓度对蜜柚 PPO 活性的影响

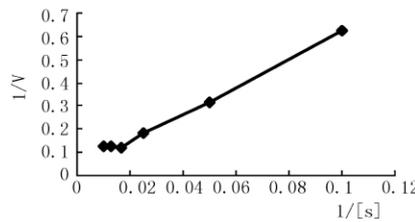


图 2 蜜柚 PPO 催化反应的双倒数曲线

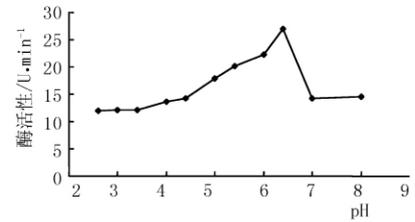


图 3 pH 对蜜柚果肉 PPO 活性的影响

2.3 温度对蜜柚 PPO 活性的影响

蜜柚的 PPO 比较耐低温。从温度对 PPO 活性的影响(图 4)可以看出,蜜柚 PPO 的最适反应温度为 10℃,但在 0℃下蜜柚的 PPO 仍具有很高活性,10℃后随温度升高 PPO 活性缓慢下降,当温度大于 70℃活性下降较迅速,但在 90℃时仍然保留少量的活力。谭兴杰等报道荔枝的 PPO 最适反应温度为 35℃^[9],蒋跃明报道荔枝的 PPO 最适反应温度为 65℃^[14],段玉权等报道中华寿桃 PPO 最适反应温度为 60℃^[10],孙丽华等则报道大麦芽 PPO 最适反应温度为 80℃^[11]。可见,不同果蔬或同种果蔬的不同品种间的 PPO 最适反应温度差异

很大。但蜜柚在 10℃下具有最高活性,这在其它多酚氧化酶中很少见。

从图 5 可以看出,蜜柚多酚氧化酶在 80℃和 90℃条件下维持 5 min,其相对活性分别降低到原来的 20%和 13%,维持到 10 min,酶活性降到 14%和 12%。继续加热,则酶活性似乎不再变化。

2.4 PPO 浓度对其活性的影响

在室温(18℃)、pH 6.4、底物含量为 1 mL(0.04 M)的条件下,不同酶液含量时产物吸光度随时间的变化见图 6。可以看出随着反应的进行,产物的吸光度不断增加。当酶含量为 0.1 mL 时,由于酶含量低,底物含量过量

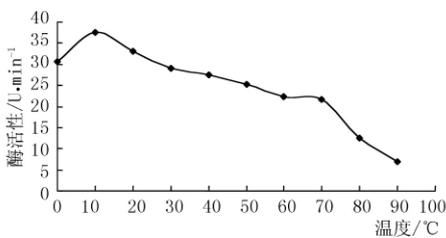


图 4 温度对蜜柚 PPO 活性的影响

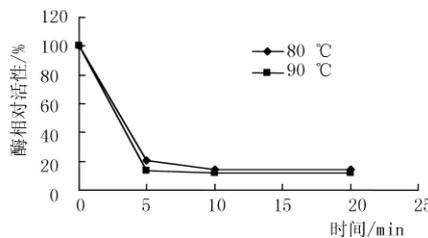


图 5 蜜柚 PPO 对热的稳定性

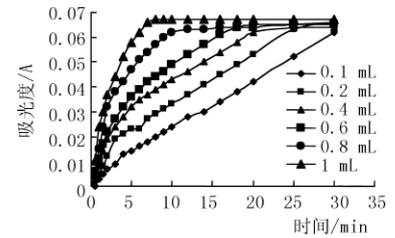


图 6 不同酶液含量的蜜柚 PPO 反应进程

很多,反应持续时间较长,至 30 min 时底物反应完毕,吸光度不再增加。随着酶含量的增加,反应速度加快,吸光度的增加速度随之加快,但反应时间逐渐减小。当酶含量为 1 mL 时,反应 7 min 时底物就反应完毕,吸光度不再增加。由于不同酶含量时底物含量一样,当反应结束时,各酶含量的吸光度基本一致。

从图 6 可以看出,刚开始时酶促反应速度较快,吸光度增加较快。此后反应速度进入平稳恒速期。酶液含量越低,底物相对过量越多,恒速期持续的时间越长。

在测定植物 PPO 活性时,常采用 2 种方法。一种方法是在反应开始后的很短时间间隔(如 15、30 s)测定产物吸光度变化,这种方法测定的是酶促反应的初始速度^[5,8,15]。另一种方法是测定反应一段时间后(如 5、10 min)的产物吸光度变化,这种方法测定的是反应一段时间后的平均酶促反应速度^[13,16]。图 7 为不同时间段的酶促反应的平均速度。可以看出,酶添加量为 0.1 mL 时,在整个反应时间的不同间隔测得的平均反应速度基本一致(仅成极小的下降趋势),随着酶量的增加,在不同时间间隔测得的平均反应速度越来越低,同时也越来越接近。到 30 min 时,所有酶量的平均反应速度都一样,看不出酶活力的差别了。

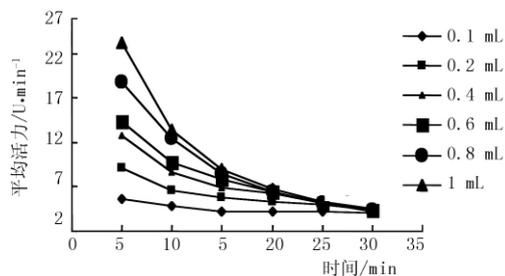


图 7 不同时间段的 PPO 平均活力

3 结论与讨论

图 1 的结果显示,底物浓度会影响酶促反应速度,从而影响酶活性测定结果。但底物过量后,底物浓度对酶促反应速度变化不大。因此,在测定 PPO 酶活性时,应要求底物浓度过量。对蜜柚而言,当 PPO 酶提取液为 1 mL 时,底物临苯二酚浓度达到 60 mmol/L(用量 1 mL)时开始过量。实际测试蜜柚 PPO 酶的活性时底物含量应远大于这个值。

测试蜜柚 PPO 酶的活性时应准确控制 pH,尤其是 pH>6.4 后,微小的 pH 增加就会对结果有极大的影响。测定的温度以 10℃ 为最佳。

在反应条件确定的条件下,在不同时间测定的 PPO 酶的平均活性呈逐渐下降的趋势。因此,测定 PPO 酶活性时,最好测定反应刚开始时的初始速度。但有时客

观条件限制只能测定反应一段时间后的平均速度。例如,在测定一定温度下的酶活性时,短时间内反应液温度不可能上升到设定的温度,必须要经过一段时间的加热过程,这时只能测定加热并反应一段时间后的平均速度^[10]。在这种情况下必须注意吸光度测定时间的选择。如果选择的测定时间过长,底物早已反应完毕,此时测定的平均值会明显偏小。在这种情况下测定 PPO 酶的平均活性,必须注意让底物过量较多,使反应不至于在短时间内结束。另外,在选定的测定时间之后,再延长几分钟测定一次反应液的吸光度。如果延长后吸光度继续增加,说明在选定的测定时间,底物未完全消耗。如果延长后吸光度不再增加,说明在选定的测定时间,底物可能完全消耗,需要将测定时间提前。

参考文献

- [1] 沈金玉,黄家音,李晓莉. 果蔬酶促褐变机理及其抑制方法研究进展[J]. 食品研究与开发,2005,26(6):150-156.
- [2] Jiang Y M, Li Y B, Li J R. Browning control, shelf life extension and quality maintenance of frozen lichi fruit by hydrochloric acid [J]. Journal of Food Engineering, 2004, 63: 147-151.
- [3] 徐晓春,吴振先,陈维信,等. 荔枝果皮褐变机理研究进展[J]. 保鲜与加工,2004(1):8-10.
- [4] 吴耕西,周宏伟,汪建民. 鸭梨酶促褐变的生化机制及底物鉴定[J]. 园艺学报,1992,19(3):198-202.
- [5] Coseteng M Y, Lee C Y. Changes in apple polyphenol oxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning [J]. Journal of Food Science, 1987, 52(4): 985-989.
- [6] Concellon A, Anon M C, Chaves A R. Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature [J]. Food Chemistry, 2004, 88: 17-24.
- [7] Unal M U. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*) [J]. Food Chemistry, 2007, 100: 909-913.
- [8] 李桂琴,刘坤,张玉星. 雪梨果肉多酚氧化酶的活性研究与纯化[J]. 食品科学,2007,28(12):297-300.
- [9] 谭兴杰,李月标. 荔枝果皮多酚氧化酶的部分纯化及性质[J]. 植物生理学报,1984,10(4):339-346.
- [10] 段玉权,董维,张明晶,等. 中国寿桃多酚氧化酶的特性研究[J]. 中国农业科学,2008,41(3):795-799.
- [11] 孙丽华,李秀琳,徐凯,等. 大麦发芽过程中多酚氧化酶学特性初步研究[J]. 中国酿造,2008,148(7):35-38.
- [12] Baik B K, Czuchajowska Z, Pomeranz Y. Comparison of polyphenol oxidase activities in wheats and flours from Australian and U. S. cultivars [J]. Journal of Cereal Science, 1994, 19: 291-296.
- [13] 胡艳妮,杨昌鹏,黄卫萍,等. 杨桃若干品种及贮藏期间多酚氧化酶活性的变化[J]. 安徽农业科学,2008,36(3):884-886.
- [14] 蒋跃明. 荔枝采后果皮褐变的研究[D]. 广州:中山大学,1999:1-35.
- [15] 徐芹,乔勇进,方强,等. 碛山酥梨多酚氧化酶学特性及抑制效应的研究[J]. 食品科学,2008,29(4):74-77.
- [16] 高梦祥,杨雪莲. 鸭梨多酚氧化酶的特性及抑制剂研究[J]. 食品研究与开发,2007,28(9):50-53.

番茄再生体系的建立

乔永旭

(唐山师范学院 生命科学系,河北 唐山 063000)

摘要:以“田园6号”番茄子叶和下胚轴为试材,研究激素的种类和浓度对愈伤组织诱导、愈伤组织继代、不定芽分化及生根的影响,并研究了各因素对番茄愈伤组织褐变的影响。结果表明:MS+IBA 0.8 mg/L+6-BA 2.0 mg/L 诱导所得愈伤最好,MS+IBA 1.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 最适于愈伤组织的继代,MS+IAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L 和 MS+IAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 分别在诱导外质体直接分化不定芽和愈伤组织分化不定芽上效果最佳,MS+IAA 0.5 mg/L 是诱导不定芽生根的理想培养基。外植体种类和光照强度均对愈伤组织的褐化有一定的影响,10 mg/L 的 VC 和 0.3% 的活性炭则能减缓愈伤组织的褐化。

关键词:番茄;愈伤组织;不定芽;生根;褐化

中图分类号:S 641.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)17-0174-03

番茄(*Lycopersicon esculintum* Mill)是我国重要的栽培蔬菜。其果实富含多种维生素、糖类、有机酸和无机盐^[1-2],有预防动脉硬化和清热解毒等功效,深受人们喜爱。生产上种子的繁殖存在着易混杂等缺点,随着植物组织培养技术的发展,以子叶、下胚轴和叶片为外植体,建立番茄高频再生系统已取得成功^[3],但同时也发现番茄再生体系具有基因型依赖性,不同的品种其再生的条件不同^[4]。要建立适合当地气候的番茄品种的再生体系,单单套用他人的结论是难以做到的,必须对其进行探索。该试验选用“田园6号”番茄为材料,用不同浓度的激素以优化培养基配方,建立番茄再生体系,为番茄的遗传育种提供技术参考。

作者简介:乔永旭(1978-),男,硕士,讲师,现研究方向为植物细胞工程和植物资源开发与利用。E-mail:qiaoyx123@163.com。
收稿日期:2010-04-27

1 材料与方法

1.1 试验材料

“田园6号”番茄种子由唐山市农业科学院提供。将其无菌条件下接种到 MS 基本培养基上(含有蔗糖 30 g/L,琼脂 7 g/L,pH 5.8。下同),培养条件为光照 12 h,光照强度 2 000 lx,培养温度(25±1)℃(培养条件下同)。待幼苗子叶完全展开时备用。

1.2 试验方法

1.2.1 再生体系的建立 将子叶切成 0.5 cm² 的叶块,下胚轴切成 0.5 cm 的茎段分别接种到诱导培养基中(表 1,基本培养基为 MS,下同)。每瓶接种 3 块(段),每个处理 10 瓶。待愈伤组织生长到 15 d 时,取生长良好的绿色愈伤继代和分化生芽(表 2),每种处理 5 瓶。待不定芽长至 1~2 cm 时,接种于生根培养基中(表 3),统计生根率。生根率%=(生根幼芽数/接种幼芽数)×100%;同时观察根的形态。

Properties and Measurement of Polyphenol Oxidase in Flesh of Miyou Pomelo Fruits

JI Shu-juan¹, YIN Jing-nan^{1,2}, LI Jia-zheng²

(1. Food College of Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161; 2. Tianjin Key Laboratory of Postharvest Physiology and Storage of Agricultural Products, National Engineering and Technology Research Center for Preservation of Agricultural Products, Tianjin 300384)

Abstract: The activity of polyphenol oxidase(PPO)in flesh of Miyou pomelo fruits was measured with spectrophotometer at 420 nm using catechol as substrate. The effects of the different substrate concentration, temperature, pH, substrate concentration on PPO activity were studied and the reaction kinetic equation was established. The results showed that the optimum temperature and pH were 10℃ and pH 6.4, respectively. The reaction kinetic of enzymatic reaction in this experiment was built according to Michaelis equation. The Vmax and Km were 22.452 U/min and 128.2 mmol/L, respectively. The average activity of PPO at different time decreases continuously.

Key words: pomelo; polyphenol oxidase; enzymatic properties; measurement