

芋头多酚氧化酶的酶学性质研究

李利华

(陕西理工学院化学与环境科学学院, 陕西汉中 723000)

摘要: 以邻苯二酚为底物, 采用分光光度法研究了芋头多酚氧化酶(PPO)的酶学特性。结果表明: 芋头 PPO 的最适温度 pH 为 7.5, 最适温度为 40 °C; 90 °C 高温处理 2 min, 可使酶完全失活; PPO 催化的酶促褐变反应符合米氏动力学方程, 相应动力学参数 $K_m=0.0221$ mol/L, $V_{max}=46.08$ U/min; 4 种抑制剂对 PPO 活性均有不同程度的抑制作用, 抑制效果由强到弱顺序为: 抗坏血酸>亚硫酸氢钠>L-半胱氨酸>柠檬酸; 金属离子 Sn^{2+} 对 PPO 活性具有较强的抑制作用, Al^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Co^{2+} 对 PPO 活性有一定的抑制作用, Zn^{2+} 对 PPO 活性具有激活作用, Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 对 PPO 活性几乎没有影响。

关键词: 芋头; 多酚氧化酶; 酶学特性

文章编号: 1673-9078(2013)4-737-740

Enzymatic Properties of Taro Polyphenol Oxidase

LI Li-hua

(Chemical and Environmental Sciences, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China)

Abstract: Enzymological characterization of polyphenol oxidase (PPO) from taro was investigated using catechol as reaction substrate. The results showed that the optimal pH and temperature for this enzyme were 7.5 and 40 °C, respectively. The total enzyme activity was almost lost after thermal treatment at 90 °C for 2 min. The kinetics of PPO reaction was in accord with the Michaelis-menten equation, with K_m and V_{max} values of 0.0221 mol/L and 46.08 U/min, respectively. Four kinds of inhibitors had different effect on PPO with their inhibition effect order being of ascorbic acid>NaHSO₃>L-Cysteine>citric acid. Mental ion of Sn^{2+} showed strong inhibitory effect on the enzyme. Al^{3+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} and Co^{2+} had certain inhibitory effects on the enzyme. The inhibition effects of Fe^{3+} , Fe^{2+} and Mn^{2+} on enzyme were not significant. In addition, the enzyme can be activated by Zn^{2+} .

Key words: taro; polyphenol oxidase; enzyme properties

芋头 (*Colocasia esculenta* (L.) schott), 英文名 Taro, 又称芋艿, 属南星科多年生草本植物芋的地下块茎, 是一些热带或亚热带地区人们的主要食品。芋头性甘辛、性平, 生则有毒, 入肠胃经, 具有益胃宽肠、通便解毒、补中益肝肾、消肿止痛等功效, 具有极高的食用价值和保健作用, 深受人们的喜爱^[1-2]。然而, 芋头组织中含有多酚氧化酶(PPO), 在加工过程中极易发生酶促褐变, 褐变不仅影响产品外观品质, 而且严重影响其商品价值, 制约芋头的加工业发展。因此, 褐变是芋头类深加工过程中亟待解决的一个问题。目前, 国内外有关果蔬类多酚氧化酶的研究报道较多, 已有研究表明^[3-6]: 果蔬种类、品种不同, 其 PPO 的性质不尽相同, 有的甚至相差很大。而有关芋头中多酚氧化酶酶学特性的研究报道较少^[7-8], 以致对该酶的性质尚有不明之处, 对控制该果实的酶褐变缺乏理论依据和理想的方法。本实验以芋头为原料, 研究芋头

中PPO的酶学特性, 旨在为鲜切芋头的深加工、贮藏保鲜中防止褐变提供理论依据。

1 实验部分

1.1 材料、试剂及仪器

芋头: 采挖于汉中郊区菜园 (新鲜、组织完整、无机械损伤), 贮存于4 °C备用; 柠檬酸、磷酸氢二钠、邻苯二酚、抗坏血酸、L-半胱氨酸、亚硫酸氢钠等均为国产分析纯; TU-1810紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限公司; GR-200型电子天平, 日本A & D公司; TDL-5通用台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; TGL-16M台式高速冷冻离心机 长沙湘仪离心机有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 PPO粗酶液的提取

新鲜芋头洗净、去皮, 称取20.0 g置于研钵中, 加入预冷的pH=6.8柠檬酸-磷酸盐缓冲液80 mL和少许石英砂, 冰浴研磨匀浆, 4 °C条件下浸提20 min, 然后在高速冷冻离心机中离心, 10000 r/min、25 min,

收稿日期: 2012-12-06

基金项目: 陕西省教育厅科研资助项目 (11JK0596)

作者简介: 李利华(1977-), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 天然产物化学

取上清液即为粗酶液，置冰浴中备用。

1.2.2 PPO活性测定

参照文献方法^[9]并稍作修改。取pH 6.8的磷酸盐缓冲溶液3.5 mL, 0.1 mol/L邻苯二酚1.0 mL, 摇匀, 30 °C水浴中预热5 min, 取出后迅速加入芋头PPO粗酶液0.5 mL, 摇匀, 在420 nm波长下每30 s记录一次吸光度随时间的变化。一个相对酶活性单位(U)定义为: 在上述测定条件下, 每分钟引起吸光度改变0.001单位所需酶量^[10]。

1.2.3 PPO最适pH的测定

分别配置不同pH值(3.0~9.0)的磷酸盐缓冲液, 酶反应液组成和酶活力测定条件同“1.2.2”, 确定芋头PPO作用的最适pH条件。

1.2.4 PPO最适温度的测定

取最适pH条件下磷酸盐缓冲溶液3.5 mL和0.1 mol·L⁻¹邻苯二酚溶液1.0 mL, 混匀, 分别在不同温度(20~80 °C)的水浴中保温5 min, 取出后迅速加入PPO粗酶液0.5 mL, 按照“1.2.2”的方法测定PPO的活力, 确定PPO作用的最适温度。

1.2.5 PPO的热稳定性

取最适pH条件下磷酸盐缓冲溶液3.5 mL与PPO粗酶液0.5 mL混合, 分别在不同温度(70~90 °C)水浴中保温0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 min, 冷却到室温后, 迅速加入0.1 mol/L邻苯二酚溶液1.0 mL, 按照“1.2.2”的方法测定PPO的残余酶活力。

1.2.6 底物浓度与PPO活性的关系

分别以浓度为0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mol/L的邻苯二酚作为底物, 在最适pH条件下按照“1.2.2”的方法测定PPO的活力, 确定PPO作用的最适底物浓度。根据Lineweaver-Burk双倒数作图法求得米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max} 。

1.2.7 抑制剂对PPO活性的影响

用最适pH值的磷酸盐缓冲溶液配制不同浓度的抗坏血酸、L-半胱氨酸、亚硫酸氢钠、柠檬酸溶液, 依次加入最适pH条件下的磷酸盐缓冲溶液3.5 mL、0.1 mol/L邻苯二酚溶液1.0 mL、各不同浓度抑制剂0.5 mL和PPO粗酶液0.5 mL, 按照“1.2.2”的方法测定PPO活力。以不加抑制剂所测酶活力为100%, 计算PPO相对酶活。

1.2.8 金属离子对PPO活性的影响

分别配制0.5 mmol/L的MgCl₂、MnSO₄、ZnSO₄、CaCl₂、CuCl₂、CoCl₂、FeSO₄、FeCl₃、SnCl₂、AlCl₃, 测定时依次加入最适pH条件下的磷酸盐缓冲溶液3.5 mL、0.1 mol/L邻苯二酚溶液1.0 mL、各不同浓度抑制剂0.5 mL和PPO粗酶液0.5 mL, 按照“1.2.2”的方

法测定PPO活力。以不加抑制剂所测酶活力为100%, 计算PPO相对酶活。

1.2.9 数据统计与分析

利用Excel 2007统计分析所有数据, 计算标准偏差并制图, 结果均平行测定3次。

2 结果与讨论

2.1 芋头PPO的反应进程

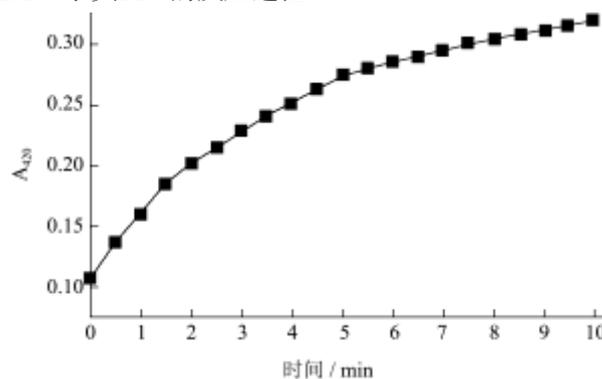


图1 芋头PPO的反应进程曲线

Fig.1 Enzymatic reaction curve of PPO from taro

由图1可知, 在反应最初2 min内吸光度值几乎成线性增加, 说明芋头PPO酶促褐变反应速度较快, 产物生成量与时间呈正比关系, 随着时间的延长, 曲线斜率逐渐降低并趋于平坦, 这可能与酶作用底物的消耗和产物的积累对酶的抑制有关。为了正确测定酶促反应速度并避免各种因素的干扰, 本实验确定在2 min内测定酶活有实际意义。

2.2 pH值对PPO活性的影响

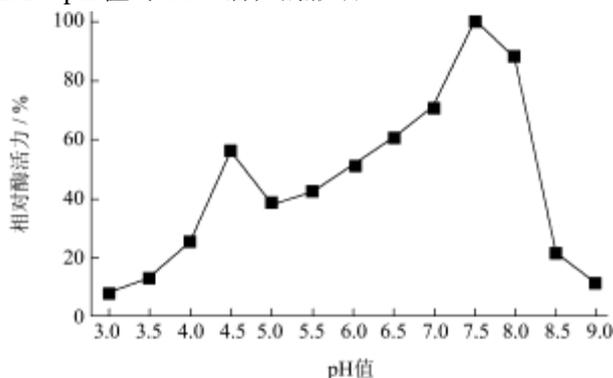


图2 pH值对芋头PPO活力的影响

Fig.2 Effect of pH on the activity of taro PPO

由图2可知, 芋头PPO的酶活最适pH为7.5, 但在pH=4.5附近还有一个小峰, 这表明芋头PPO中可能存在着PPO的同工酶^[11], 这与王佳宏等^[7]的研究结果一致; 当pH≤3.5或pH≥8.5时, PPO已基本失活。这是由于PPO是含铜蛋白质, PPO的活性与酸碱度密切相关的, 在pH小于3的酸性环境中, 酶中的铜被解离出来, 使酶失活; 而在pH大于8.5的碱性环境下, 铜会解离成

氢氧化铜,使酶失活^[12],所以通过调节pH可以有效防止褐变。

2.3 温度对 PPO 活力的影响

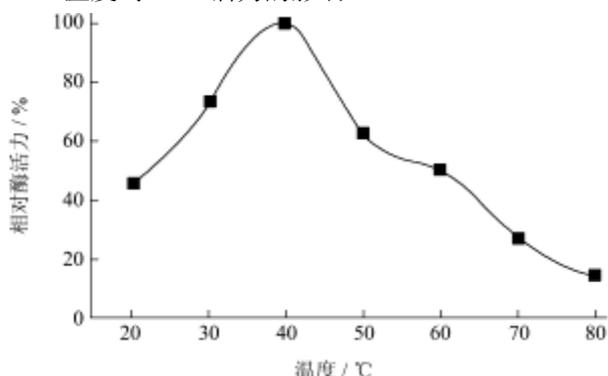


图3 温度对芋头 PPO 活力的影响

Fig.3 Effect of temperature on the activity of taro PPO

由图3可知,在20~40 °C范围内,酶活随温度的升高而逐渐增强,当温度40 °C时酶活力达最大值,由此可见芋头PPO反应的最适温度为40 °C。随着温度的继续升高,酶活力开始迅速下降;当温度升高到80 °C时,PPO基本失活,酶活力仅为40 °C的14.29%,这可能与温度升高使酶蛋白发生变性有关。

2.4 PPO的热稳定性

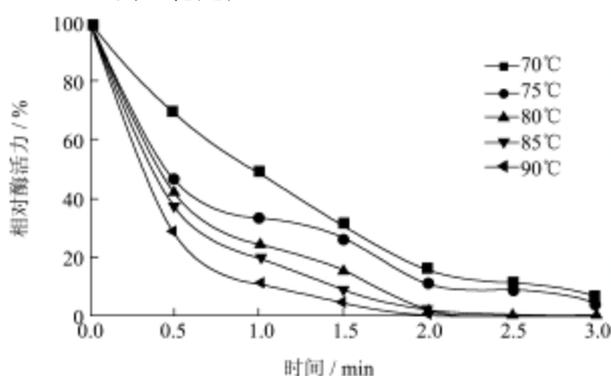


图4 热处理对芋头多酚氧化酶 PPO 活力的影响

Fig.4 Effect of heat treatment on the activity of taro PPO

由4可知,在70~90 °C的高温条件下,随着时间的延长,PPO酶活力均呈下降趋势,且温度越高,对酶破坏作用越大;70~75 °C热处理3 min,PPO相对酶活力为8.89~11.11%之间,80~85 °C处理2.0 min,PPO相对酶活力仅为4.44%左右,而90 °C处理2.0 min,PPO几乎完全失活。所以可以采用热处理的方法来抑制芋头PPO酶活,但若热处理方法不当,会影响芋头的品质。

2.5 底物浓度对PPO活性的影响

图5是邻苯二酚底物浓度[S]对芋头PPO酶活力的影响。由图5可知,当底物浓度[S]在0.02~0.08 mol/L时,酶活力随底物浓度增加而显著上升。随着[S]的进一步增大,酶活力增加幅度逐渐趋于平缓,且在底物

浓度为0.10 mol/L时达到酶活力达最大值,浓度再增加反而酶活力略有下降,这可能是PPO有效活性被结合后产生的抑制效果,符合典型的酶反应特征,因此底物浓度与PPO活性的关系遵循Michealis-Menten的酶促动力学。根据Lineweaver-Burk方程,以1/[S]为横坐标,1/V为纵坐标作图,见图6,求得米氏常数 $K_m=0.0221$ mol/L,最大反应速率 $V_{max}=46.08$ U/min。

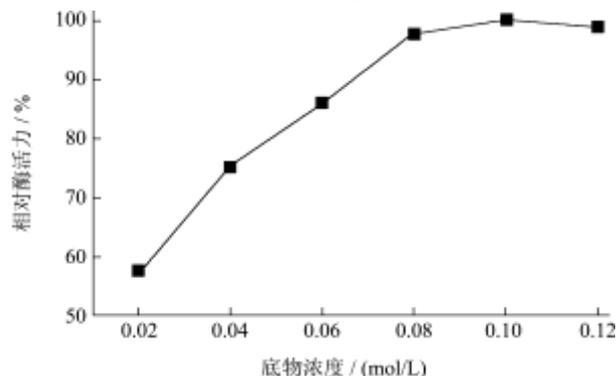


图5 底物浓度对芋头 PPO 活力的影响

Fig.5 Effect of substrate concentration on the activity of taro PPO

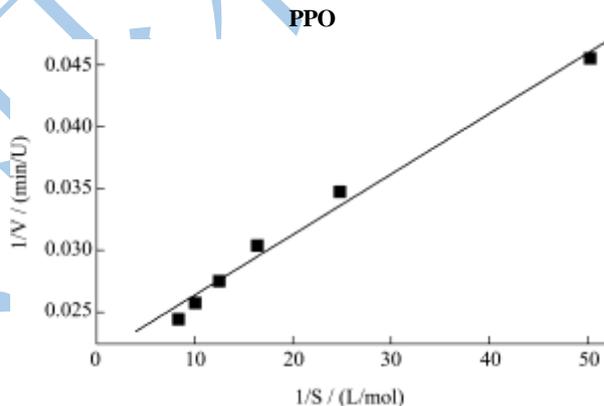


图6 芋头 PPO 的 Lineweaver-Burk 图

Fig.6 Lineweaver-Burk plot of enzyme-catalyzed reaction of taro PPO

2.6 抑制剂对PPO活性的影响

2.6.1 亚硫酸氢钠和抗坏血酸对酶活性的影响

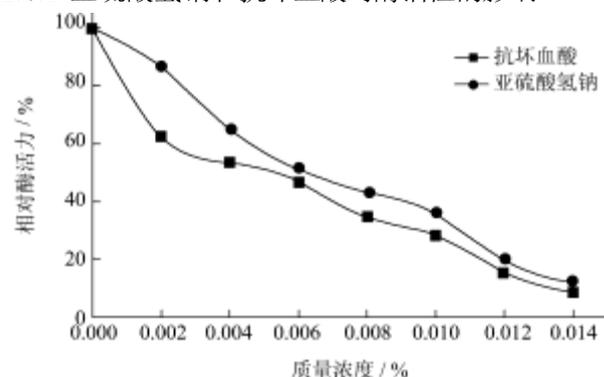


图7 亚硫酸氢钠和抗坏血酸对芋头 PPO 活力的影响

Fig.7 Effect of NaHSO₃ and ascorbic acid on the activity of taro PPO

由图7可知,随着亚硫酸氢钠和抗坏血酸浓度的增加,芋头PPO活性显著降低,说明抑制剂的抑制效果与酶液用量呈量效关系,且当亚硫酸氢钠和抗坏血酸浓度达到0.014%时,PPO残余酶活分别为:11.76%和8.51%,由此可见两种抑制剂对芋头PPO酶活均有较强的抑制作用,且抗坏血酸的抑制效果强于亚硫酸氢钠。

2.6.2 L-半胱氨酸对酶活性的影响

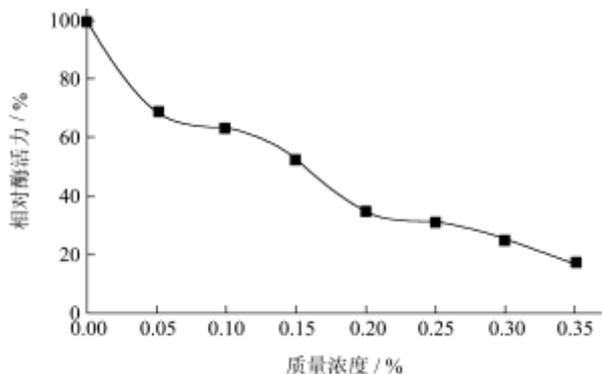


图8 L-半胱氨酸对芋头PPO活力的影响

Fig.8 Effect of L-Cysteine on the activity of taro PPO

由图8可知,芋头PPO酶活随着L-半胱氨酸浓度的增加而逐渐降低,当L-半胱氨酸浓度达0.35%时,PPO残留相对酶活仅为16.67%,说明L-半胱氨酸对杏鲍菇PPO酶活具有一定的抑制作用。

2.6.3 柠檬酸对酶活性的影响

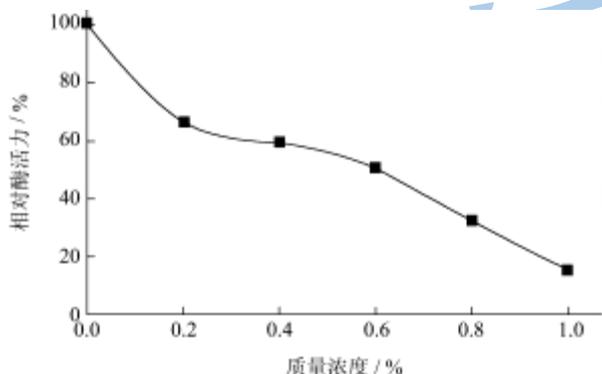


图9 柠檬酸对芋头 PPO 活力的影响

Fig.9 Effect of citric acid on the activity of taro PPO

由图9可以看出,随着柠檬酸浓度的增大,对PPO的抑制作用也随之增大,柠檬酸浓度为1.0%时,PPO相对酶活力仅为15.76%,这说明高浓度的柠檬酸对酶促褐变具有一定的抑制作用,原因可能是高浓度的柠檬酸使体系pH降低,从而使PPO活性降低。

由于不同抑制剂抑制PPO酶促褐变的机理不同,以上四种抑制剂对芋头PPO酶活的抑制能力由强到弱依次为:抗坏血酸>NaHSO₃>L-半胱氨酸>柠檬酸。

2.7 金属离子对酶活性的影响

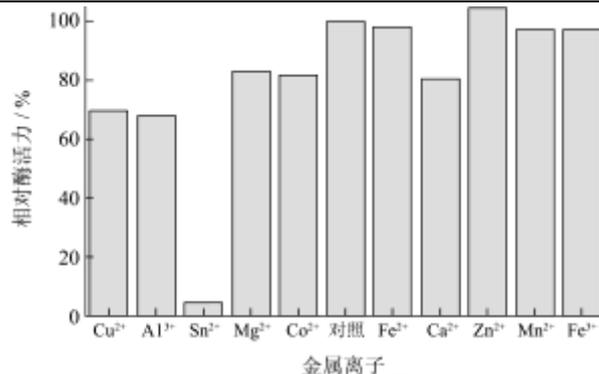


图10 金属离子对芋头 PPO 活力的影响

Fig.10 Effect of Metal ions on the activity of taro PPO

由如图10可看出,金属离子Sn²⁺对芋头PPO酶活具有强烈的抑制作用,可使PPO酶活降至4.7%,其次是Al³⁺和Cu²⁺,可使芋头PPO酶活降至70%左右,金属离子Mg²⁺、Ca²⁺和Co²⁺可使芋头PPO酶活降至80%左右,金属离子Fe³⁺、Fe²⁺、Mn²⁺对芋头PPO酶活几乎没有影响,而Zn²⁺对芋头PPO的酶活力具有激活作用。

3 结论

3.1 芋头PPO最适pH为7.5,但在pH为4.5处有一小峰,这与王佳宏的研究结果一致,表明芋头中可能存在同工酶。芋头PPO最适温度为40℃,当温度高于60℃时,PPO的相对酶活较低。芋头PPO热稳定性较差,在90℃高处理2.0min,PPO几乎完全失活。

3.2 PPO酶促褐变反应动力学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V_{max}=46.08 U/min, K_m=0.0221 mol/L。

3.3 四种不同抑制剂NaHSO₃、抗坏血酸、L-半胱氨酸和柠檬酸均能抑制芋头PPO酶活力,各抑制剂抑制能力由强到弱依次为:抗坏血酸>NaHSO₃>L-半胱氨酸>柠檬酸。

3.4 各金属离子对芋头PPO酶促褐变的影响为:Sn²⁺对芋头PPO的酶活力具有较强的抑制作用,Cu²⁺、Ca²⁺、Co²⁺、Mg²⁺和Al³⁺对芋头的酶活力有一定抑制作用,Zn²⁺对芋头PPO的酶活力具有一定的激活作用,Fe³⁺、Fe²⁺和Mn²⁺对芋头的酶活力几乎没有作用。

参考文献

[1] 陈涵贞,李文福,姚辛,等.火焰原子吸收光谱法测定芋头中10种金属元素[J].光谱实验室,2011,28(2):685-688

[2] 王瑜,高畅,张娜,等.芋头多糖的提取及生物活性的研究[J].食品工业科技,2006,27(6):73-75

[3] 沈金玉,黄家音,李晓莉.果树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

- [4] GAWLIK-DZIKI U, ZOTEK U, S'WIECAM. Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.) [J]. Food Chemistry, 2008, 107(1): 129-135
- [5] MARRERO A, ADEL A K. Optimal temperature and modified atmosphere for keeping quality of fresh-cut pineapples [J]. Postharvest Biology and Technology, 2006, 39(2): 163-168
- [6] 张国庆,董明,李娜,等.宣木瓜多酚氧化酶酶学特性与抑制剂研究[J].食品科学,2011,32(10):288-291
- [7] 王佳宏,郁志芳,杜传来.芋艿褐变底物及多酚氧化酶特性研究[J].食品工业科技,2008,29(2):141-145
- [8] 何士敏,严德兵,李昌满,等.芋中多酚氧化酶的某些催化特性检测[J].植物生理学通讯,2006,42(6):1173-1175
- [9] 高路.紫甘薯多酚氧化酶最适底物研究[J].粮食与油脂, 2010,10:141-145
- [10] 王镜岩,朱圣庚,徐长法.生物化学(上册)[M].第3版.北京:高等教育出版社,2002
- [11] 李璟琦.菊芋块茎多酚氧化酶特性[J].西北农业学报,2010, 19(8):185-187
- [12] 宋金隆,赵树欣,张黎明,等.鲜茶叶、苹果及马铃薯多酚氧化酶活性的比较[J].现代食品科技,2009,25(11):1258-1261