文章编号:1673-1689(2008)02-0055-06

鲜切莲藕组织中多酚氧化酶的分离纯化

潘永贵[1,2], 陈维信[2]

(1. 海南大学 食品学院,海南 儋州 571737; 2. 华南农业大学 园艺学院,广东省果蔬保鲜重点实验室,广东 广州 510642)

摘 要: 酶促褐变是影响鲜切莲藕加工贮藏的主要问题,多酚氧化酶(PPO)是引起酶促褐变的重要酶类。用磷酸缓冲液提取鲜切莲藕组织中的多酚氧化酶,并通过硫酸铵沉淀,DEAE-Sepharose 离子交换柱层析以及 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 疏水柱层析进行纯化。该酶被纯化了 95.66 倍,产率为 2.4%。经 SDS-PAGE 电泳确定为单一条带。同时研究表明,鲜切莲藕组织中 PPO 相对分子质量在 65 900~66 100 之间。

关键词: 鲜切莲藕; 多酚氧化酶; 纯化

中图分类号:S 609.3 **文献标识码**: A

Isolation and Purification of Polyphenol Oxidase from Fresh-Cut Lotus Root

PAN Yong-gui[1,2], CHEN Wei-xin[2]

(1. College of Food, Hainan University, Hainan 571737, China; 2. College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangdong Province Key Laboratory of Postharvest Physiology and Technology of Fruits and Vegetables, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Enzyme browning is one of the most reactions impacting quality of fresh-cut lotus root. Polyphenol oxidase is a key enzyme induing enzyme browning. Polyphenol Oxidase in fresh-cut lotus root was extracted by phosphate buffer and purified by ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography using DEAE Sepharose column, and Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow hydrophobic chromatography. PPO from fresh-cut lotus root was purified by 95.66 - fold and a 2.4% yield. The enzyme was determined to be homogenous by SDS-PAGE. The molecular weight of the fresh-cut lotus root PPO was estimated by SDS-PAGE ranged from 65 900 to 66 100 according to Sephadex G-100 gel fractionation.

Key words: fresh-cut lotus root; polyphenol oxidase; purification

---

鲜切果蔬由于其新鲜、方便等特点,市场需求量日益增加。与此相对应,鲜切果蔬已经成为了目前的研究热点之一。其中,莲藕组织脆嫩,容易切分,适合鲜切生产,但莲藕切分后极易发生褐变,严

收稿日期:2007-09-10.

基金项目:华南热带农业大学科技基金项目(Rnd0618);海南省热带园艺重点实验室开放课题资助项目(ch002).

作者简介: 潘永贵(1970-),男,山西阳泉人,工学博士,副教授,主要从事果蔬采后生理及贮运保鲜教学科研工作.

E-mail: yongui123@126.com

万方数据

重影响了产品的感官质量和商品价值。多酚氧化酶(PPO)是引起果蔬发生酶褐变的重要酶类。虽然,已经有多位研究者对莲藕组织中PPO的性质进行了研究,但是他们都是对莲藕组织中的PPO进行了简单的提取,而并没有进行纯化[1-4],因此这必然会影响到PPO的性质的准确性。同时,对酶的分离纯化是了解该酶性质及各组分间的协同关系及对其进行控制的前提[5]。

目前PPO粗提物的纯化最常使用的方法是采用不同饱和度的硫酸铵沉淀、SephadexG-75、G-100或G-200凝胶色谱以及DEAE-纤维素或DEAE-Sepharose离子交换色谱,这个过程中可使用透析、超滤、丙酮沉淀或Sephadex G-25色谱除去低分子杂质[6-10]。此外,在一些果蔬中还使用了疏水色谱层析[11-15]。例如在荔枝果实上,蒋跃明[14]采用Sephadex G-100、Q-Sepharose和等3步柱层析,纯化倍数达到108倍;段玉权等[15]采用Phenyl Toyopearl、Sephadex G-25和DEAE-Sepharose等柱层析对中华寿桃果肉中PPO进行分离纯化,纯化倍数达到110倍。虽然目前对果蔬组织中多酚氧化酶分离纯化的研究报道较多,从目前报道来看,尚未见有关对莲藕组织中的多酚氧化酶进行分离纯化的研究报道。此外,对鲜切莲藕组织中的PPO的研究也未见报道。因此,作者将重点对鲜切莲藕组织中的PPO进行分离纯化,从而为最终对鲜切莲藕组织中PPO性质的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料处理

直接从广东省番禺采摘运抵实验室后,挑选新鲜、无病害、无损伤、完整的莲藕果实,于10℃冷库中预冷过夜,于第2天进行去皮、切片处理,然后贮存于10℃下待组织出现褐变时进行多酚氧化酶的分离纯化。

1.2 PPO的分离纯化

1.2.1 酶的提取 取10℃下贮藏到第8天的鲜切莲藕片组织250 g,首先采用液氮速冻,按1∶2质量比例加入经过预冷(4℃)的0.1 mol/L、pH 6.8的磷酸缓冲液(内含5%的PVP),在高速组织捣碎机上捣碎,然后于4℃下浸提2 h,用4层脱脂纱布过滤,滤液于10 000 r/min、4℃下离心15 min,上清液即为多酚氧化酶粗酶液。

向粗酶液中边搅拌边加入固体硫酸铵至30%饱和度,4℃下静置2 h,于10 000 r/min、4℃下离心10 min,弃沉淀,继续向上清液中加入硫酸铵至70%饱和度,4℃下静置过夜,然后于10 000 r/min、4℃下离心15 min,弃上清液,将沉淀用尽量少的0.1 mol/L、pH值为6.8的磷酸缓冲液溶解,得到酶的提取液。然后将酶提取液用0.1 mol/L、pH 6.8的磷酸缓冲液透析过夜,中间换透析液2次,然后用amicon超滤杯浓缩至10 mL。

1.2.2 DEAE-Sepharose柱层析 DEAE-Sepharose层析柱(2.5 cm × 20 cm)首先用碱、酸和氯化钠分别清洗以后,用0.1 mol/L、pH值为6.8的磷酸缓冲液平衡,将1.2.1步骤所得的多酚氧化酶提取液上柱,首先用0.1 mol/L、pH值为6.8的磷酸缓冲液洗脱至A_{280}保持不变时,然后换用含0～0.5 mol/L NaCl的上述缓冲液从低浓度到高浓度进行离子强度线形梯度洗脱(3.5 mL/管,70 mL/h),然后收集有活性峰的洗脱液。

1.2.3 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow疏水柱层析 将1.2.2步骤收集的洗脱液首先加固体硫酸铵至1.5 mol/L的饱和度,然后于10 000 r/min、4℃下离心10 min,弃沉淀,上清液准备过柱。Phenyl Sepharose 6 Fast Flow疏水柱(2 cm×15 cm)首先用含1.5 mol/L硫酸铵的0.1 mol/L、pH 6.8的磷酸缓冲液平衡,然后将上述上清液上柱,首先用含1.5 mol/L硫酸铵的0.1 mol/L、pH 6.8的磷酸缓冲液洗脱至A_{280}保持不变时,然后换用含0～1.5 mol/L硫酸铵的上述缓冲液从高浓度到低浓度进行离子强度线形梯度洗脱(3.5 mL/管,70 mL/h),然后收集有活性峰的洗脱液,得到纯化的酶液。一部分用于凝胶电泳,一部分用于酶学性质研究。

1.2.4 纯化酶液的处理 将1.2.3步骤得到的纯化酶液首先用0.1 mol/L、pH值6.8的磷酸缓冲液透析过夜,中间换透析液2次,然后用聚乙二醇6000浓缩。

1.2.5 SDS-PAGE垂直板电泳 将1.2.4步骤得到的酶液进一步浓缩至固体,然后加入适量的裂解液(质量分数10%的SDS 1.25 mL,浓缩胶缓冲液50 μL,体积分数40%的甘油0.625 mL,水25 μL,质量分数0.5%的溴酚蓝0.4 mL)溶解,并用移液枪反复吸冲壁,稍微加热溶解,5 000 r/min离心,吸取上层转入小拇指管中,稍微加热(95℃,2 min),离心收集,得电泳样品液,贮于-20℃下备用。

SDS-PAGE垂直板电泳:参照张龙翔[16]的方法。采用浓缩胶为5 g/dL,电流10 mA;分离胶为12.5 g/dL,电流为15 mA。电极缓冲液为:质量分数0.1%的SDS,pH 8.3的Tris(0.05 mol/L)-甘氨酸(0.384 mol/L),每孔上样量均为20 μL。当溴

万方数据

酚蓝指示剂居前沿为 1 cm 时停止电泳。取出凝胶平板(从尾部撬出)，割去浓缩胶部分，于蒸馏水中浸摇 3 min，如此 2～3 次，用 0.1% 考马斯亮蓝 R250-45%甲醇-10% 冰乙酸溶液染色 2 h，然后于 7.5% 冰乙酸-5%甲醇溶液中不断振荡 4～5 h，脱色，0.5 h 换一次脱色液。

1.2.6 SDS-PAGE 垂直板电泳测定纯酶相对分子质量　按 1.2.5 的方法进行 SDS-PAGE 垂直板电泳，以溴酚蓝在 SDS-PAGE 电泳凝胶片上的前沿位置作为参数，计算各种标准相对分子质量蛋白与样品的相对迁移率 R_f 值，以标准蛋白相对分子质量的常用对数值(lg M_r)对 R_f 值制作标准曲线，根据 PPO 的 R_f 值求出其相对分子质量。标准相对分子质量蛋白质分别为：鸡蛋清溶菌酶(14 400)、胰蛋白酶抑制剂(20 100)、牛碳酸酐酶(31 000)、兔肌动蛋白(43 000)、牛血清蛋白(66 200)和兔磷酸化酶 B (97 400)。

1.2.7 葡聚糖 G-100 凝胶过滤测定 PPO 相对分子质量　葡聚糖凝胶柱 G-150(2 cm×50 cm)用蒸馏水洗涤后，用 20 mmol/L pH 值 7.0 磷酸缓冲液平衡，将纯酶浓缩，取 2 mL 过柱，以相同缓冲液洗脱，分部收集，体积流量为 2.8 mL/管，6 min/管。同时，取标准相对分子质量的蛋白质溶液(2 mg/mL)2 mL，按照上述方法，分别得到相应的洗脱体积(V_e)，以各标准相对分子质量蛋白的洗脱体积(V_e)对其相对分子质量的常用对数(lg MW)作标准曲线，依据木糖苷酶的洗脱体积(V_e)求得木糖苷酶的相对分子质量。标准相对分子质量蛋白如下：β-半乳糖苷酶(130 000)、牛血清白蛋白(67 000)、辣根过氧化物酶(40 000)，胰凝乳蛋白酶(25 000)。

1.3 PPO 活性和蛋白质含量的测定

PPO 活性测定参照林植芳[17]的方法。3 mL 反应液中含有 2.9 mL 0.1% 的邻苯二酚溶液(用 0.1 mol/L、pH 值 6.8 的磷酸缓冲液配制)和 0.1 mL 酶液。加入酶液后，测定 OD_{398} 值的变化，以每分钟 $\triangle OD_{398}$ 变化 0.001 表示一个酶活性单位。

蛋白质含量测定采用 Bradford(1976)染色法。取 50 μL 样品液加入 2.5 mL 的考马斯亮蓝 G250 溶液摇匀，放置 5 min 后，于 595 nm 处测定吸光度，根据标准曲线计算蛋白质含量。牛血清蛋白作为标准蛋白。

2 结果与讨论

2.1 PPO 的分离纯化

莲藕组织经过硫酸铵分步盐析后，进行 DEAE-Spharose 离子交换柱层析，如图 1 所示，出现了两个明显的蛋白峰和活性峰。其中，第 1 个峰为 0.1 mol/L、pH 值 6.8 的磷酸缓冲液洗脱出的峰，第 2 个峰为 0～0.5 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L、pH 值 6.8 的磷酸缓冲液进行离子强度线形梯度洗脱出现的峰。并且第一个酶活性峰远远大于第 2 个酶活性峰，而其蛋白峰却小于第 2 个蛋白峰，表明经过 DEAE-Spharose 离子交换柱层析，在用磷酸缓冲液洗脱时，大部分杂蛋白被吸附，而大部分 PPO 则被洗脱出来。因此，收集第 1 个活性峰，然后进一步进行 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 疏水柱层析，分离出 7 个蛋白峰，而只有 2 个具有 PPO 活性，并且第 2 个酶活性峰远远大于第 1 个酶活性峰(见图 2)，因此收集该活性主峰进一步进行下列研究。PPO 分离纯化过程中各参数的变化见表 1。

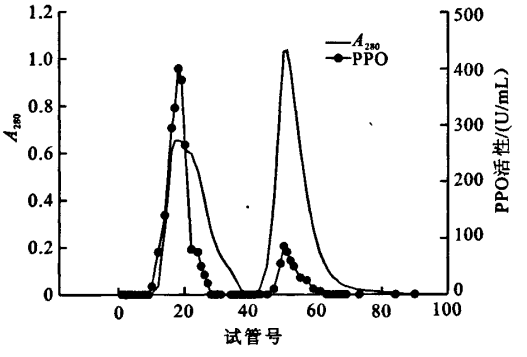


图 1　莲藕组织 PPO 的 DEAE 洗脱曲线

Fig. 1　DEAE-Sepharose column chromatography of PPO in lotus root

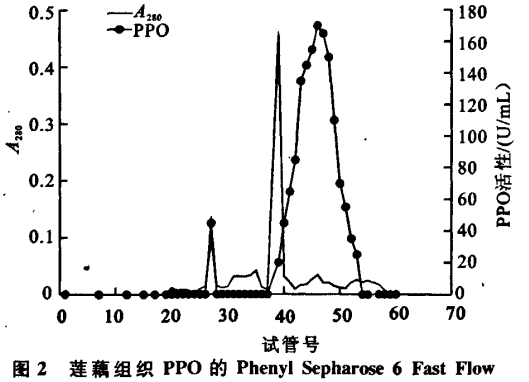


图 2　莲藕组织 PPO 的 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 洗脱曲线

Fig. 2　Phenyl Sepharose 6 Fast Flow column chromatography of PPO lotus root

作者在对莲藕组织的 PPO 进行分离纯化的过程中发现，PPO 经过 Sephadex G-75 或 G-100 后，

万方数据

表1 鲜切莲藕组织PPO分离纯化表

Tab. 1 Purification of PPO from fresh-cut lotus root

步骤	总体积/mL	总活性/(U/mL)	总蛋白/mg	比活性/(U/mg protein)	回收率/%	纯化倍数
粗提液	570	111150	348.14	0.32	100	1
30%硫酸铵	560	109200	257.22	0.42	98.20	1.31
70%硫酸铵	35	72318.75	70.43	1.03	65.06	3.22
DEAE-Sepharose	17	11815	1.21	9.76	10.63	30.5
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow	17	2975	0.10	30.61	2.40	95.66

活性大幅度降低，而硫酸铵对其活性有明显的保护作用，因此在莲藕组织中PPO的分离纯化过程中不宜脱盐。此外，在过DEAE-Sepharose柱时通常采用pH值8.0缓冲液进行平衡和pH值8.0的洗脱液进行洗脱。采用pH值6.8的缓冲液和洗脱液进行平衡和洗脱时，在起始加入酶液用平衡液洗脱过程中，具有PPO活性的酶大部分被洗脱出来，而大部分杂蛋白则被吸附在DEAE-Sepharose柱上，通过这级分离，不仅节约了时间，而且大大提高了PPO的纯化倍数，纯化倍数达到30.5倍。接着经过Phenyl Sepharose 6 Fast Flow疏水柱层析，该柱具有极高的分离性能，PPO纯化液进一步经过该柱后，纯化倍数达到95.66倍。

段玉权等[15]在对中华寿桃PPO分离纯化的研究中认为，样品抽提液中加入Triton X-100、PVP和PMSF可以获得极佳的分离效果。但是本研究中在加入Triton X-100和PMSF却发现PPO活性只有轻微的提高，这可能是材料差异所致。

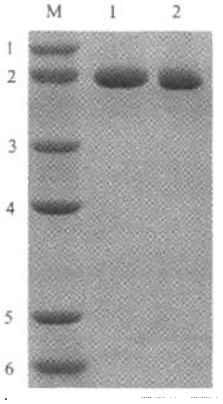
2.2 酶纯度鉴定

将纯化的多酚氧化酶液经过浓缩透析后，经聚丙烯酰胺凝胶电泳仅出现单一的蛋白带(见图3)，表明该酶已被纯化到电泳均一。

2.3 PPO的相对分子质量测定

2.3.1 SDS-PAGE垂直板电泳测定纯酶相对分子质量 采用SDS-PAGE法测定多酚氧化酶相对分子质量，结果如图4所示，从图中可以求出莲藕组织中多酚氧化酶相对分子质量约为65 900。

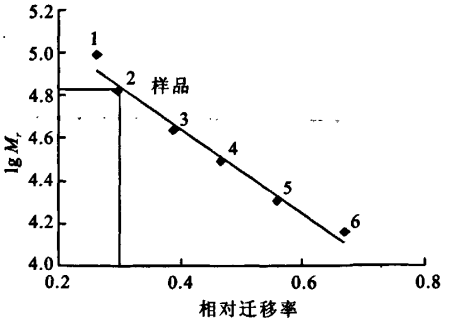
2.3.2 葡聚糖G-100凝胶过滤测定PPO相对分子质量 采用Sephadex G-100柱层析测定多酚氧化酶的相对分子质量，结果如图5所示。所得相对分子质量和洗脱体积的回归方程：$y=-0.085x+5.893\,9$，根据多酚氧化酶的体积126.3 mL，计算出该酶的相对分子质量约为66 100。



标准蛋白从上到下：1. 兔磷酸化酶B(97 400)；2. 牛血清蛋白(66 200)；3. 兔肌动蛋白(43 000)；4. 牛碳酸酐酶(31 000)；5. 胰蛋白酶抑制剂(20 100)；6. 鸡蛋清溶菌酶(14 400)

图3 莲藕组织PPO的SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE of the purified PPO of lotus root

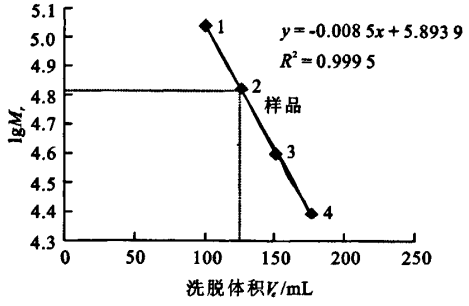


1. 兔磷酸化酶B(97 400)；2. 牛血清蛋白(66 200)；3. 兔肌动蛋白(43 000)；4. 牛碳酸酐酶(31 000)；5. 胰蛋白酶抑制剂(20 100)；6. 鸡蛋清溶菌酶(14 400).

图4 SDS-PAGE法测定莲藕组织PPO相对分子质量

Fig. 4 Estimation of molecular mass of PPO from lotus root by SDS-PAGE

万方数据



标准相对分子质量蛋白如下：1. β-半乳糖苷酶(130 000)；2. 牛血清白蛋白(67 000)；3. 辣根过氧化物酶(40 000)；4. 胰凝乳蛋白酶(25 000)

图 5　Sephadex G-100 凝胶过滤法测定莲藕组织多酚氧化酶相对分子质量

Fig. 5　Estimation of molecular mass of PPO from lotus root by Sephadex G-100 gel filtration

关于天然植物 PPO 相对分子质量的大小，报道不一。PPO 有活性的形式主要为 40 000～45 000、59 000、65 000～68 000[18-19]以及70 000～72 000[17]。蒋跃明[14]研究认为，荔枝果皮中 PPO 的相对分子质量为76 000。段玉权等[15]报道，中华寿桃果实中 PPO 的相对分子质量约为66 000。本研究表明，鲜切莲藕组织中 PPO 相对分子质量65 900～66 100之间，和上述报道相近。PPO 分子大小的不同可能因酚类底物氧化产物的反应或酶蛋白本身的分解所致[17]。

3　结　语

作者采用磷酸缓冲液提取鲜切莲藕组织中的多酚氧化酶，并通过硫酸铵盐析沉淀，DEAE-Sepharose 离子交换柱层析以及 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 疏水柱层析进行纯化后，经 SDS-PAGE 电泳确定为单一条带，表明该酶已被纯化到电泳均一。在整个过程中，该酶纯化了 95.66 倍，产率为 2.4%。同时研究表明，鲜切莲藕组织中 PPO 相对分子质量在 65 900～66 100 之间。

参考文献(References)：

[1] 李宁，郁志芳，赵友兴，等. 莲藕多酚氧化酶的酶学特性[J]. 江苏农业学报，2002，18(1)：63－64.
LI Ning，YU Zhi-Fang，ZHAO You-Xing，et al. Enzymological property of polyphenoloxidase (PPO) in lotus root[J]. **Jiangsu Journal of Agricultural Sciences**，2002，18(1)：63－64. (in Chinese)

[2] 杨明，汪志君. 莲藕中多酚氧化酶特性的研究[J]. 江苏农学院学报，1996，17(1)：47－51.
YANG Ming，WANG Zhi-Jun. Study on characters of polyphenol oxidase in lotue root[J]. **Journal of Jiangsu Agricultural College**，1996，17(1)：47－51. (in Chinese)

[3] 王三虎，骆粟波，熊旭红，等. 莲藕中多酚氧化酶主要特性及护色的研究[J]. 河南职业技术师范学院学报，1994，22(1)：50－53.
WANG San-Hu，LUO Sù-Bo，XIONG Xu-Hong，et al. Studies on polyphenol oxidase main chracters in Lotus root and prevention of discoloration[J]. **Journal of Henan Vocation-technical Teachers College**，1994，22(1)：50－53. (in Chinese)

[4] 胡军. 莲藕中多酚氧化酶的特性及莲藕的护色[J]. 食品与发酵工业，1989，(3)：47－51.
HU Jun. The characters of potyphenol oxidase in lotus root and prevention of discoloration of lotus root[J]. **Food & Fermentation Industry**，1989，(3)：47－51. (in Chinese)

[5] 孟广荣，杨树林，曾亮亮，等. 内切 β-葡聚糖苷酶的分离纯化及酶学性质[J]. 食品与生物技术学报，2006，25(2)：24－27.
MENG Guang-Rong，YANG Shu-Lin，ZENG Liang-Liang，et al. Purif ication and properties of an Endo-β-glucanase[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2006，25(2)：24－27. (in Chinese)

[6] Benjamin N O，Montgomery M W. Polyphenol oxidase of royal ann cherries：purification and characterization[J]. **J Food Sci**，1973，38：799－806.

[7] Roudsari M H，Signoret A，Crouzet J. Eggplant polyphenoloxidase：purification，characterization properties[J]. **Food Chem**，1981，7：227－235.

[8] Siddia M，Sinha N K，Cash J N. Partial purification of polyphenol oxidase from plums[J]. **J Food Biochem**，1996，20：111－123.

[9] Zhou H W，Feng X. Polyphenol oxidase from yali pear[J]. **J Sci Food Agric**，1991，57：307－313.

[10] 塔卡基，杨方琪，高福成. 广东芝麻香蕉加工中的酶促褐变研究(Ⅰ)：多酚氧化酶的提取、分离及其特性研究[J]. 无锡轻工业学院学报，1994，13(1)：10－20.

万方数据

Alex Koku M, YANG Fang-qi, GAO Fu-chen. Recheachs on guangdong zhima banana browning(Ⅱ)——Effect of some additives on polyphenoloxidases[J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**, 1994,13(1):10－20. (in Chinese)

[11] Das J R, Bhat S G, Gowda L R. Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the kew cultivar of indian pineapple fruit[J]. **J Agric Food Chem**, 1997, 45: 2031－2035.

[12] Janovitz-Klap A, Richard F, Nicolas J. Polyphenoloxidase from apple partial purification and some properties[J]. **Phytochem**, 1989, 28: 2903－2908.

[13] Richard-Forget F C, Goupy P M, Nicolas J J. New approaches for separating purifying apple polyphenol oxidase isoenzymes: hydrophobic, metal chelate affinity chromatography[J]. **J Chromatogr**, 1994, 667: 141－153.

[14] 蒋跃明. 荔枝果皮褐变的研究[D]. 广州：中山大学,1999.

[15] 段玉权,冯双庆,马秋娟,等. 中华寿桃果肉多酚氧化酶的纯化研究[J]. 中国农业科学,2004, 37(4):588－591.
DUAN Yu-quan, FENG Shuang-qing, MA Qiu-Juan, et al. Purification of polyphenol oxidase of zhonghuashoutao peach flesh[J]. **Scientia Agricultura Sinica**, 2004,37(4):588－591. (in Chinese)

[16] 张龙翔,张庭芳,李令媛. 生化实验技术与方法[M]. 北京:科学出版社. 1985: 112－118.

[17] 林植芳, 李双顺, 张东林,等. 采后荔枝果实氧化和过氧化作用的变化[J]. 植物学报, 1988, 30 (4) : 382－387.
LIN Zhi-fang, LI Shuang-sun, ZHANG Dong-lin, et al. The changes of oxidation and peroxidation in postharvest litchi fruit[J]. **Acta Botanica Sinica**, 1988, 30 (4) : 382－387. (in Chinese)

[18] 彭世清. 植物 PPO 的研究进展[J]. 热带农业科学,2000, (3):61－66.
PENG Shi-qing. Review on plant polyphenol oxidase (PPO)[J]. **Chinese Journal of Tropical Agriculture**,2000,(3):61－66. (in Chinese)

[19] Soderhall K. Isolation and partial purification of polyphenol oxidase from daucus carota L[J]. **Cell Cultures**, 1985, 78: 730－733.

(责任编辑:杨 萌)



万方数据