

‘鸭梨’果心多酚氧化酶提取方法的优化

程玉豆, 关军锋*

河北省农林科学院遗传生理研究所, 石家庄050051

摘要: 以‘鸭梨’为供试材料, 通过设定不同实验条件, 分析影响果心多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)提取效率的部分因素, 以期找到提取‘鸭梨’果心多酚氧化酶的最适条件。结果表明: 磷酸盐提取缓冲液的pH \geq 7.0, 提取缓冲液中分别含有0.2% Triton X-100、1% SDS、6%~8% PVP、2% PVPP以及每克果心鲜样中加入2 mg抗坏血酸时均能高效提取‘鸭梨’果心PPO。

关键词: ‘鸭梨’; 果心; 多酚氧化酶(PPO)

Optimization of Polyphenol Oxidase Extraction in the Core of ‘Yali’ Pear

CHENG Yu-Dou, GUAN Jun-Feng*

Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China

Abstract: The factors that affected the extraction of polyphenol oxidase (PPO) in the core of ‘Yali’ pear were studied by designing different assays to find optimal conditions for extracting. Results indicated that the pH of extractive buffer should be \geq 7.0, and the extractive buffer contained 0.2% Triton X-100, 1% SDS, 6%–8% PVP or 2% PVPP, or one gram of fresh core supplied with 2 mg ascorbic acid, respectively, could improve the extractive efficiency of PPO in the core of ‘Yali’ Pear.

Key words: ‘Yali’ pear; core; polyphenol oxidase (PPO)

‘鸭梨’为我国特有梨品种。在采后贮藏过程中, 由于急降温或衰老, 常导致果心褐变。在引起植物组织褐变的众多因素中, 多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)一直是研究者关注的焦点(Chevalier等1999; Coetzer等2001; Gooding等2001; Demek和Morris 2002)。PPO催化酚类物质氧化成邻醌, 邻醌再相互聚合或与蛋白质、氨基酸等作用生成高分子络合物而导致褐色素的生成(Nicolas等1994)。“鸭梨”果心呈较明显的酸性, 区别于果肉组织。因此, 制备酶提取液时应区别于一般植物材料。本文分析了影响‘鸭梨’果心PPO提取的因素, 探讨了适于‘鸭梨’果心PPO提取的条件, 为今后‘鸭梨’中PPO的研究提供基础材料。

材料与amp;方法

1 材料

供试材料白梨品种‘鸭梨’(*Pyrus bretschneideri* Rehd. cv. ‘Yali’)采自河北省晋州(北纬38.02, 东经115.02), 采摘后入库冷藏。

2 试剂和仪器

邻苯二酚购于Sigma公司, 其他试剂购于上海

生工生物工程技术有限公司。实验中所用仪器有: 离心机(Sigma3K15)、凝胶成像系统(SIM)、紫外分光光度计(UV-2100 spectrophotometer)、蛋白电泳仪(北京六一仪器厂)。

3 方法

3.1 果心pH值的测定

随机选取30个‘鸭梨’果心, 冰浴条件下匀浆器充分匀浆2 min, 冰浴中继续研磨5 min, 研磨充分后, 4 °C下5 000 \times g离心5 min, 测定上清液pH值, 实验重复3次。

3.2 果心PPO的提取

取1 g ‘鸭梨’果心, 加入3 mL 0.1 mol \cdot L⁻¹不同pH值的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)或含有不同浓度聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)、聚乙烯聚吡咯烷酮(polyvinylpolypyrrolidone, PVPP)、抗坏血酸(ascorbic

收稿 2012-06-07 修定 2012-07-17

资助 农业部现代农业(梨)产业技术体系专项资金(CARS-29-20)。

* 通讯作者(E-mail: junfeng-guan@263.net; Tel: 0311-87652118)。

acid)、十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)和曲拉通X-100 (Triton X-100)的磷酸盐缓冲液(pH 7.0), 冰浴条件下匀浆器匀浆1 min, 冰浴中继续研磨1 min, 研磨充分后, 4 °C下12 000×g离心15 min, 上清液即为PPO粗提液。

将冷藏150 d的‘鸭梨’, 根据肉眼观测果心褐变面积及颜色分为不褐变、轻微褐变、中度褐变3个级别, 取1 g ‘鸭梨’果心, 加入3 mL含有0、0.2% (V/V) Triton X-100的磷酸盐缓冲液(0.1 mol·L⁻¹, pH 7.0), 冰浴条件下匀浆器匀浆1 min, 冰浴中继续研磨1 min, 4 °C 12 000×g离心15 min, 上清液即为PPO粗提液, 上述实验均设计3次重复。

3.3 PPO活性测定

参照Thygesen等(1995)的方法并有所改进, 以邻苯二酚为底物, 将50 μL酶粗提液加入到25 °C预热反应液(含25 mmol·L⁻¹邻苯二酚的磷酸盐缓冲液, pH 6.0), 使终体积为4 mL。在420 nm波长下测定OD变化值, 将PPO提取液在420 nm下平均每分钟增加0.01OD值定义为1 U。

3.4 SDS-PAGE电泳

参照Laemmli (1970)的方法并有所改进, 采用不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳。浓缩胶浓度为4.5% (W/V), 分离胶浓度为12% (W/V), SDS浓度为0.1% (W/V), 80 V稳压电泳, 待样品进入分离胶后, 改为160 V电泳至溴酚蓝距凝胶底部约1 cm。上样蛋白浓度测定参照Bradford (1976)方法。

3.5 PPO染色

参照Yu等(1992)的方法。电泳完毕后, 将凝胶放在0.1 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(pH 6.0)中漂洗5 min后, 放入含有0.3 mol·L⁻¹邻苯二酚、90 mmol·L⁻¹对苯二胺的磷酸盐缓冲液(0.1 mol·L⁻¹, pH 6.0)显色, 条带清晰后终止显色, America SIM凝胶成像系统采图。

实验结果

1 不同pH值磷酸盐缓冲液对‘鸭梨’果心PPO提取效率的影响

实验发现, ‘鸭梨’果心呈酸性, 其pH值随着贮藏时间的延长而逐渐升高, 冷藏30、90和150 d时, 果心pH值分别为3.2~3.4、3.5~3.7和3.8~4.0, 显著低于果肉pH值(4.5~5.0)。在提取PPO过程中, 提取缓冲液pH值显著影响果心PPO粗提液pH值, 酶粗

提液pH值随着提取缓冲液pH值升高而显著上升(表1)。当提取缓冲液pH值为7.0时, 酶粗提液的pH值为6.56(表1), PPO提取效率最高(图1-A)。

表1 不同pH值磷酸盐缓冲液提取的酶提取液pH值

Table 1 The pH of enzyme liquid extracted by different pH of phosphate salt buffer

磷酸盐缓冲液pH值	酶粗提液pH值
6.0	4.79±0.01
6.2	5.23±0.04
6.4	5.65±0.01
6.6	6.03±0.04
6.8	6.33±0.04
7.0	6.56±0.01
7.2	6.71±0.02
7.4	6.83±0.02
7.6	6.94±0.05
7.8	7.03±0.05

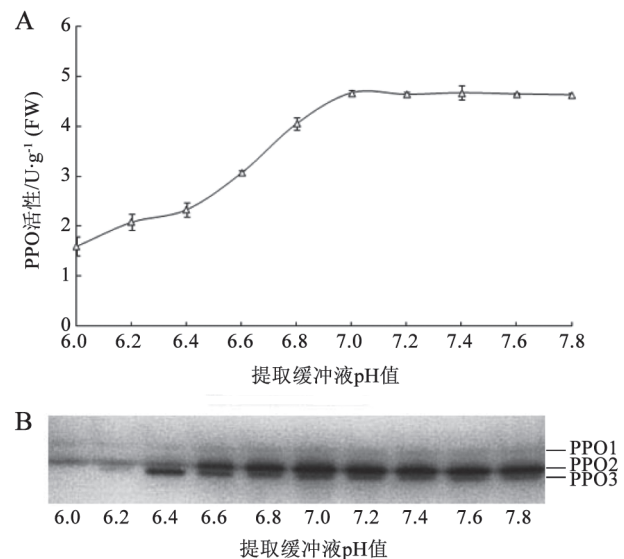


图1 不同pH值磷酸盐缓冲液对‘鸭梨’果心PPO活性的影响

Fig. 1 The effect of phosphate buffer with different pH on

PPO activity in core of ‘Yali’ pear

A: 不同pH值磷酸盐缓冲液提取的‘鸭梨’ PPO活性; B: SDS-PAGE电泳检测的PPO同工酶活性。

不同pH值提取缓冲液对‘鸭梨’果心PPO活性的影响明显不同。在pH≤7.0时, 随着提取缓冲液pH值的升高, PPO的活性也随之增加; 当提取缓冲液pH值范围为7.0~7.8时, PPO活性基本保持不变(图1-A)。同工酶电泳结果表明: ‘鸭梨’果心酶粗提

液中主要存在3种PPO,依次命名为PPO1、PPO2和PPO3。PPO1活性非常弱,受提取缓冲液pH值的影响较小;当提取缓冲液pH值范围为6.0~7.0时,PPO2活性随着pH值的升高逐渐增强,之后变化较小;PPO3活性在pH值高于6.2时才明显显现,并以pH值为6.4时活性最强(图1-B)。

2 PVP和PVPP对‘鸭梨’果心PPO提取效率的影响

PVP能有效地结合酚类物质,并通过与过氧化氢形成络合物,抑制PPO与酚类物质结合,从而减少褐变。用含有不同浓度PVP的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)提取PPO后检测表明,随着PVP浓度增加,PPO活性也随之增加。当PVP浓度在6%~8%时,PPO活性最高(约为未加PVP的3.8倍)(图2)。

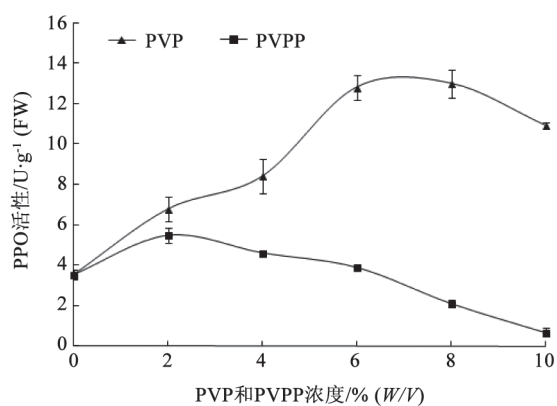


图2 PVP及PVPP对‘鸭梨’果心PPO活性的影响
Fig.2 Effects of PVP and PVPP on PPO activity of core in ‘Yali’ pear

与PVP相似, PVPP也能够有效的吸附提取液中的酚类物质,但其不能溶于水。用含不同浓度PVPP的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)提取PPO后,检测表明, PVPP在较低浓度(2%)时,显著提高PPO提取效率; PVPP浓度为4%~6%时,能略微提高PPO提取效率;当PVPP浓度较高(>6%)时,则明显降低PPO的提取效率(图2)。

3 抗坏血酸对‘鸭梨’果心PPO提取效率的影响

抗坏血酸作为还原剂能够抑制酚类物质被氧化。PPO的提取过程中,每克‘鸭梨’果心鲜样中分别加入不同浓度的抗坏血酸,酶活性测定结果表明,在抗坏血酸浓度低于2 mg·g⁻¹ (FW)时,随着抗坏血酸浓度的逐渐升高, PPO的提取效率也逐渐提高;当抗坏血酸的浓度>4 mg·g⁻¹ (FW)时, PPO的提取效率则随着抗坏血酸浓度的升高而降低(图3)。

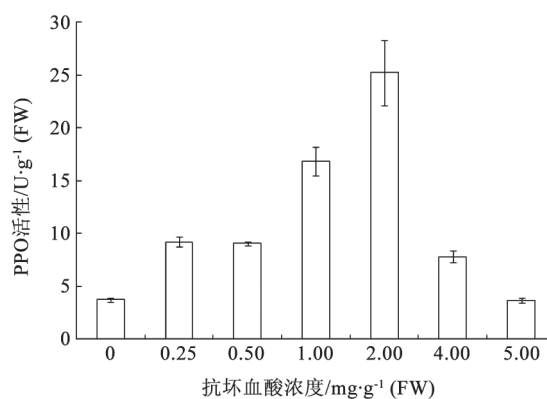


图3 抗坏血酸对‘鸭梨’果心PPO活性的影响
Fig.3 The effect of ascorbic acid on PPO activity of core in ‘Yali’ pear

4 SDS和Triton X-100对‘鸭梨’果心提取效率的影响

SDS能够破坏细胞膜,并使膜蛋白游离于提取液中。在磷酸盐提取缓冲液(pH 7.0)中加入不同浓度的SDS后, PPO活性检测及同工酶电泳结果表明,当SDS浓度为1% (W/V)时,酶粗提液中PPO活性最高(约为未加SDS的8.6倍)。当SDS浓度>1%时,则随着SDS浓度的增加, PPO活性呈逐渐下降趋势(图4-A、B)。

非离子去污剂Triton X-100的作用与SDS基本相似,但较为温和。利用上述方法,检测了不同浓度Triton X-100对PPO提取效率的影响。PPO活性及同工酶电泳结果表明,当Triton X-100浓度为0.2% (V/V)时, PPO活性约为不加Triton X-100的7.9倍,当Triton X-100浓度>0.2%时,随着浓度的增加, PPO提取效率逐渐降低(图4-C、D)。

5 不同褐变程度‘鸭梨’果心PPO活性的比较

Triton X-100能够有效破坏膜结构,将细胞中束缚态PPO转化为游离态,且作用较为温和,因此我们可将含0.2% Triton X-100提取液提取的PPO定义为细胞内总PPO。不同褐变级别‘鸭梨’果心PPO活性检测结果表明:随着果心褐变程度的加剧,游离态PPO (磷酸盐缓冲液提取, pH 7.0)活性呈明显的增加趋势,但不同褐变程度的果心总PPO活性并无显著差异(图5)。

讨 论

1 果心pH环境影响PPO提取效率及活性

pH值是影响PPO提取效率的关键因素之一。本实验证明,当磷酸盐缓冲液pH值为7.0时,酶粗

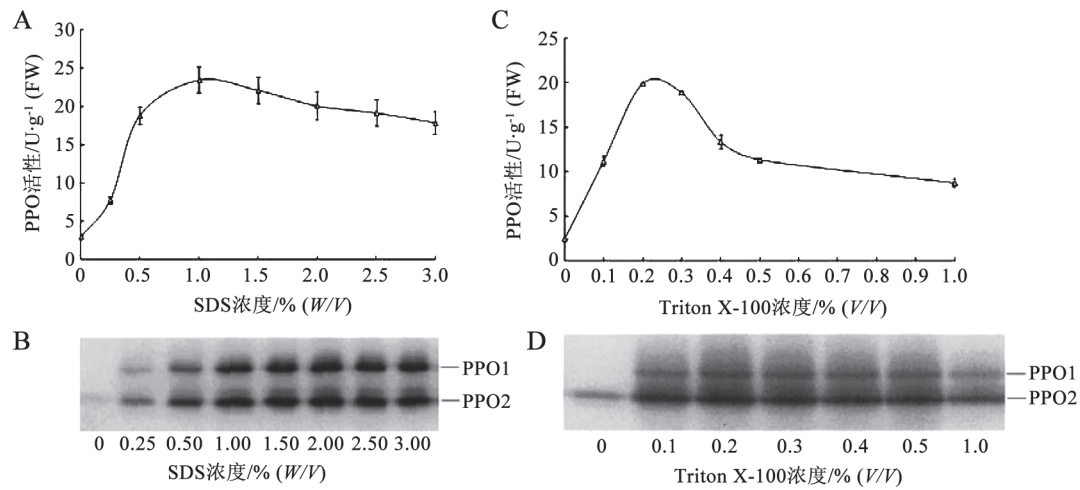


图4 SDS和Triton X-100对‘鸭梨’果心PPO活性的影响

Fig.4 Effects of SDS and Triton X-100 on PPO activity of core in ‘Yali’ pear

A: 不同浓度SDS提取的PPO活性; B、D: SDS-PAGE电泳检测的PPO同工酶活性; C: 不同浓度Triton X-100提取的PPO活性。

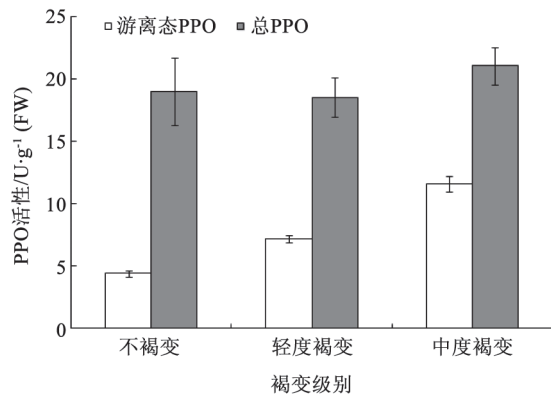


图5 不同褐变度‘鸭梨’果心PPO活性

Fig.5 The PPO activity extracted from different grade of brown core in ‘Yali’ pear

提液的pH值为6.56时(表1), PPO提取效率达到最大(图1-A)。这与文献中报道的PPO反应最佳pH值为6.6的结果接近(高梦祥和杨雪莲 2007)。因此, 在提取‘鸭梨’果心PPO的过程中应注意果心材料的特殊性, 掌握好材料与提取缓冲液的比例以及提取缓冲液的pH值, 将酶粗提液的pH值控制在最适范围内(约6.56)。

2 酚类物质及氧化作用对PPO提取及活性的影响

酚类物质作为PPO底物能够被氧化成醌, 醌能够与蛋白质作用生成高分子络合物, 影响PPO等酶类物质的活性(Nicolas等1994)。*‘鸭梨’*等果实中富含酚类物质, 因此, 在提取PPO时应有效的将其

去除。PVP与PVPP是一类重要的酚类物质吸附剂, 实验发现, 较高浓度PVP (6%~8%)能够有效地提高PPO的提取, 而较低浓度PVPP (约2%)能够改善PPO的提取效率, 当二者的浓度过高时, PPO的提取效率反而降低(图2), 推测可能是高浓度的吸附剂非特异地吸附蛋白及PPO等酶类, 从而降低了PPO的提取效率。

抗坏血酸作为还原剂能够抑制酚类物质被氧化(张福平和张喜春2010), 降低了酚、醌类物质与PPO的结合。实验发现, 当每克果心中加入2 mg抗坏血酸时, PPO的提取效率最高(图3)。而加入过量的抗坏血酸时PPO的提取效率则降低, 推测可能是在PPO活性测定过程中, 过量的抗坏血酸将PPO氧化的酚类物质重新还原, 从而影响了PPO活性的测定。

3 PPO存在状态影响其提取效率及活性

研究表明, 通常PPO主要以非活性态存在于质体中, 而它的底物酚类物质在液泡中, 这种空间隔离只有被打破后, PPO才表现出活性(Vaughn等1998)。在果实成熟后早期, PPO与酚类物质由于在空间上的隔离而不能相互作用, 因此不会产生褐变。随着果实逐渐衰老, 膜系统随之被破坏, 质体中束缚态PPO变成游离态PPO并被激活, 同时酚类物质从液泡中释放出来, 与PPO相结合并被氧化, 促进果实褐变(鞠志国等1988)。已有研究表明: 去垢剂通过改变潜伏态PPO的构象激活植物体内

PPO的活性(Mazzafera和Robinson 2000),此外, SDS和Triton X-100等去垢剂能有效地破坏膜系统,将束缚态PPO转变成游离态。本实验发现,提取液中加入适量的SDS或Triton X-100能显著提高PPO的提取效率,但浓度过高时PPO的提取效率则下降(图4)。推测可能是高浓度的SDS或Triton X-100使PPO等酶类可逆性的失活,造成PPO活性下降。‘鸭梨’果心中游离态PPO与总PPO的比值能够反映‘鸭梨’果心中PPO的形态及其与褐变程度的相关性(蒋跃明等1991)。本实验中,‘鸭梨’果心中游离态PPO含量随着褐变的加重逐渐增加,但PPO总量基本不变(图5)。因此,细胞中游离态PPO含量与褐变的关系可能更为密切。

总之,本实验较为系统地分析了影响‘鸭梨’果心PPO提取效率的相关因素,找到了适合于‘鸭梨’果心PPO提取条件,即:磷酸盐提取缓冲液的pH \geq 7.0;提取缓冲液中含有0.2% Triton X-100、1% SDS、6%~8% PVP或2% PVPP、每克果心鲜样中加入2 mg抗坏血酸均能够高效提取‘鸭梨’果心PPO。这为今后PPO功能的研究提供了重要的技术支持。

参考文献

- 高梦祥,杨雪莲(2007). 鸭梨多酚氧化酶的特性及抑制剂研究. 食品研究与开发, 28 (9): 50~53
- 蒋跃明,陈绵达,林植芳,陈芳(1991). 香蕉低温酶促褐变. 植物生理学报, 17 (2): 157~163
- 鞠志国,朱广廉,曹宗巽(1988). 莱阳茺梨果实褐变与多酚氧化酶及酚类物质区域化分布的关系. 植物生理学报, 14 (4): 356~361
- 张福平,张喜春(2010). 佛手瓜多酚氧化酶酶学特性研究. 食品科学, 31 (1): 161~164
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248~254
- Chevalier T, de Rigal D, Mbéguié-A-Mbéguié D, Gauillard F, Richard-Forget F, Fils-Lycaon BR (1999). Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. Plant Physiol, 119 (4): 1261~1269
- Coetzer C, Corsini D, Love S, Pavsek J, Tumer N (2001). Control of enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) by sense and antisense RNA from tomato polyphenol oxidase. J Agric Food Chem, 49 (2): 652~657
- Demek T, Morris CF (2002). Molecular characterization of wheat polyphenol oxidase (PPO). Theor Appl Genet, 104 (5): 813~818
- Gooding PS, Bird C, Robinson SP (2001). Molecular cloning and characterization of banana fruit polyphenol oxidase. Planta, 213 (5): 748~757
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227 (5259): 680~685
- Mazzafera P, Robinson SP (2000). Characterization of polyphenol oxidase in coffee. Phytochemistry, 55 (4): 285~296
- Nicolas JJ, Richard-Forget FC, Goupy PM, Amiot MJ, Aubert SY (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. Crit Rev Food Sci Nutr, 34 (2): 109~157
- Thygesen PW, Dry IB, Robinson SP (1995). Polyphenol oxidase in potato: a multigene family that exhibits differential expression patterns. Plant Physiol, 109 (2): 525~531
- Vaughn KC, Lax AR, Duke SO (1998). Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. Physiol Plant, 72 (3): 659~665
- Yu H, Kowalski SP, Steffens JC (1992). Comparison of polyphenol oxidase expression in glandular trichomes of *Solanum* and *Lycopersicon* species. Plant Physiol, 100 (4): 1885~1890