

## 八棱海棠*MdPPO2B*基因的表达及功能分析

沈雪芳<sup>1,2</sup>, 韩晴<sup>2</sup>, 高建杰<sup>3</sup>, 彭日荷<sup>3</sup>, 王波<sup>3</sup>, 高志红<sup>1</sup>, 姚泉洪<sup>1,3,\*</sup>, 章镇<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>南京农业大学园艺学院, 南京210095; <sup>2</sup>上海市农业科学院作物育种栽培研究所, 上海201403; <sup>3</sup>上海市农业科学院生物技术研究所, 上海201106

**摘要:** 多酚氧化酶(PPO)是一种含多个铜离子的氧化还原酶, 可催化酚类物质氧化为醌类物质。我们从八棱海棠中克隆到一个PPO的同源基因*MdPPO2B*, 构建该基因酵母分泌表达载体并转化到毕赤酵母GS115中。SDS-PAGE电泳结果显示, 表达蛋白*MdPPO2B*的分子量约为66.4 kDa。以邻苯二酚作为底物, 该酶的最适pH和温度分别为6.5和40 °C。除Cu<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>和Li<sup>+</sup>外, 4 mmol·L<sup>-1</sup>的Fe<sup>3+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>对酶活力表现出较强的抑制作用。在最适条件下, 当苯酚浓度达600 μmol·L<sup>-1</sup>时, 反应4 h, *MdPPO2B*表达菌株可降解80%的苯酚。表明该基因在工业污水处理中具有广阔的应用潜力。

**关键词:** 多酚氧化酶; 八棱海棠; 酶学性质; 苯酚降解

## Expression and Functional Analysis of *MdPPO2B* from *Malus robusta*

SHEN Xue-Fang<sup>1,2</sup>, HAN Qing<sup>2</sup>, GAO Jian-Jie<sup>3</sup>, PENG Ri-He<sup>3</sup>, WANG Bo<sup>3</sup>, GAO Zhi-Hong<sup>1</sup>, YAO Quan-Hong<sup>1,3,\*</sup>, ZHANG Zhen<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; <sup>2</sup>Crop Breeding and Cultivation Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; <sup>3</sup>Agro-Biotechnology Research Center, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

**Abstract:** Polyphenol oxidase (PPO) is one of oxidoreductase enzymes, which catalyzes the phenols to diquinones. A putative PPO gene (*MdPPO2B*) was cloned from *Malus robusta* and exogenously expressed in *Pichia pastoris* GS115. SDS-PAGE showed that *MdPPO2B* has a molecular mass of approximately 66.4 kDa. With catechol as substrate, it was showed that the optimum pH and temperature for *MdPPO2B* was 6.5 and 40 °C, respectively. Except for Cu<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Li<sup>+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> inhibited the enzyme activity at a concentration of 4 mmol·L<sup>-1</sup>. The *MdPPO2B* degraded 80% phenol after incubated for 4 h under the optimum condition. In short, our original research on *MdPPO2B* may provide reference for the application of microorganism in industrial wastewater.

**Key words:** polyphenol oxidase; *Malus robusta*; enzymatic characteristics; phenol degradation

八棱海棠(*Malus robusta* Rehd.)又名海红, 蔷薇科苹果属落叶乔木, 是苹果属乔木山定子和海棠果的杂交种, 至今已有千余年的栽培历史。八棱海棠根系发达, 植株强壮, 具有抗寒抗旱、耐盐碱和耐贫瘠等特点, 常作为苹果嫁接的砧木。众多研究表明, 苹果等水果的褐变现象是其体内释放的酚类物质在多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)的作用下氧化产生醌类的结果(李萍等2008)。褐变不仅影响果蔬的风味、营养、加工和外观品质, 而且还降低耐贮性。

PPO是一类含铜的膜结合蛋白, 可以催化一元酚转化为二元酚, 二元酚再氧化为醌类物质。PPO广泛分布于植物体内的质体中, 是六大酶中第一大氧化还原酶。根据PPO催化的底物不同和底物中酚羟基的位置和数目可以将PPO分为三大类:

单酚氧化酶、双酚氧化酶和漆酶(Park等1997; Kruger等1994; Hatcher和Kruger 1993)。PPO基因已从苹果、茶树、草莓、马铃薯、茶叶、莲、莲藕、鸭梨、紫竹、香蕉、橄榄等植物中克隆获得, 并在序列和生物信息学分析方面展开研究, 但相关的功能研究并不多(Beecher和Skinner 2011; John等2011)。韩国延世大学(Yonsei University)的Kim等(2001)克隆了一个苹果PPO基因, 并进行了初步的表达模式分析。Hunt等(1993)、Shallar (1992)、

收稿 2015-09-10 修定 2015-10-30

资助 上海市种业发展项目[沪农科种字(2013)第13号]、上海市科学技术委员会科研计划项目(13395800300)。

\* 共同通讯作者(E-mail: yaoquanhong88@163.com, Tel: 021-62203180; E-mail: zhangzh@njau.edu.cn, Tel: 025-84395724)。

Cary等(1992)分别克隆出2个编码番茄分生组织66.3 kDa的PPO基因(*cP2/A7*、*gP2/B*)、2个编码蚕豆叶片68 kDa的PPO基因(*pPPO-A1*和*pPPO-B5*)、2个编码马铃薯叶片67 kDa的PPO基因(*PPO-P1*和*PPO-P2*)。

PPO作为氧化还原酶,参与植物色素的生成并且还与植物抗逆、生长发育有关,可能促进乙烯的代谢。此外,人们还发现了PPO在光合作用、抗病虫等方面的生理功能。PPO可催化木质素及醌类化合物形成,构成保护性屏障而使细胞免受病菌的侵害(马长青等2013)。PPO是酚酸类物质降解的关键酶(程鹏等2013),可以催化一元酚转化为二元酚,二元酚再氧化为醌类物质。酚类有机污染物的微生物修复就是利用这一特性,达到降解有毒酚类的作用。本研究首次从八棱海棠克隆到一个PPO的同源基因*MdPPO2B*,将其转化到毕赤酵母菌株GS115中,成功地筛选到阳性克隆菌株。以收集到的粗酶液为材料,对其蛋白进行纯化,研究其酶学性质、动力学和酚类物质降解,旨在为研究分泌表达八棱海棠PPO基因的毕赤酵母工程菌株对有机污染物的分解功能以及果蔬生产和加工过程中的褐化现象提供理论依据。

## 材料与方 法

### 1 材料

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)菌株GS115购自Invitrogen (USA); 转毕赤酵母的*MdPPO2B*阳性表达菌株为本实验室筛选。丙烯酰胺(acrylamide)、甲叉双丙烯酰胺(bis-acrylamide)和尿素(urea)购自Sigma Chemical公司。胶回收试剂盒(QIAquick Gel Extraction Kit)购买于Qiagen公司。酵母培养基BMY以及其他培养基都是按照毕赤酵母表达指南(Invitrogen, USA)进行配制。电击仪器Bio-Rad Genepulser购自美国Hercules。其他化学试剂购买于上海国药公司(Sinopharm Chemical Reagent)。

### 2 *MdPPO2B*基因克隆

八棱海棠多酚氧化酶基因*MdPPO2B*的克隆采用RT-PCR技术,抽提八棱海棠幼苗的总RNA,反转录合成cDNA,以合成的cDNA第一链为模板,加

入1对特异引物,进行RT-PCR扩增。*MdPPO2B*基因的扩增引物为: R23853, 5'-GAATTCGGATC-CATGACTTCATCTCCCTTACC-3'; R23854, 5'-GAGCTCTTAGGTAGTATTAATCAGCTCAAT-GCTAAACCCCTCCGATGG-3'。RT-PCR扩增反应体系为20  $\mu$ L。反应程序如下: 95  $^{\circ}$ C预变性3 min; 95  $^{\circ}$ C变性30 s, 59  $^{\circ}$ C退火30 s, 72  $^{\circ}$ C延伸90 s, 30个循环; 72  $^{\circ}$ C延伸10 min。将回收的PCR产物和pMD18-ST载体连接,转化大肠杆菌,挑取白色阳性菌落并进行酶切鉴定,最后测序验证目的基因的序列准确性。

### 3 毕赤酵母转化

将带有*MdPPO2B*基因的表达载体pPIC9K进行*SalI*单酶切,使其线性化,然后通过电击方法转化进酵母细胞内。将毕赤酵母细胞涂布于选择培养基(SD+0.8 mol·L<sup>-1</sup>山梨醇+5%葡萄糖+2%琼脂)上,置于28  $^{\circ}$ C培养72 h。用接菌棒接种单菌落到40孔板内,加入50  $\mu$ L BMY进行甲醇诱导蛋白表达,甲醇终浓度为1%, 250 r·min<sup>-1</sup>震荡培养24 h后,每隔1 d取一次上清液,用邻苯二酚溶液进行阳性测定,筛选出活性最高的菌株。

### 4 *MdPPO2B*的纯化和活性测定

采用硫酸铵沉淀法纯化*MdPPO2B*蛋白。在4  $^{\circ}$ C条件下,边搅拌菌体裂解液,边缓慢加入硫酸铵粉末,至终浓度为75%左右,使蛋白沉淀。透析袋在使用前煮沸15 min。将沉淀得到的蛋白质液装入透析袋中,用0.02 mol·L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲液(pH 7.0)透析24 h,期间更换3次缓冲液。16 099 $\times$ g离心25 min,得到的上清液即为PPO粗液。在4  $^{\circ}$ C冰箱中将酶液注入镍柱纯化,纯化时,洗涤缓冲液0.6 mol·L<sup>-1</sup> NaCl、20 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸钠盐缓冲液、50 mmol·L<sup>-1</sup>咪唑, pH 7.5; 结合缓冲液为含10 mmol·L<sup>-1</sup>咪唑、20 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸钠盐缓冲液, pH 7.5; 溶解缓冲液含0.6 mol·L<sup>-1</sup> NaCl、20 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸钠盐缓冲液、250 mmol·L<sup>-1</sup>咪唑, pH 7.5。

测定PPO活性时,150  $\mu$ L的酶促反应体系含50  $\mu$ L 0.2 mol·L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液(pH 6.0)、50  $\mu$ L 0.1 mol·L<sup>-1</sup>的反应底物邻苯二酚、酶液50  $\mu$ L,在40  $^{\circ}$ C水浴中反应10 min,然后置于冰上终止反应。在420 nm处测得对邻苯二酚底物的氧化量。1个PPO单位(U)是1 min转化1  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>邻苯二酚,使产物邻

苯二酚自由基浓度从a增加至b(张鹏2007)。酶活力计算公式如下: 酶活力 $= [1\ 000 \times 0.1844 \times (A_2 - A_1) \times 60 \times \text{稀释倍数}] / t$ 。其中,  $A_1$ 和 $A_2$ 分别为反应开始和结束时的吸光值,  $t$ 为反应时间, 酶活力单位为 $\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (蛋白)。

## 5 MdPPO2B的酶学性质测定

### 5.1 最适pH和温度

采用蛋白粗酶液, 以邻苯二酚为底物, 分别配制 $0.2\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\ \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 和 $0.1\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸(pH 2.2~5.5)、 $0.2\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 6.0~8.0)。反应时间10 min。150  $\mu\text{L}$ 的反应体系中含不同pH值的缓冲液50  $\mu\text{L}$ 、邻苯二酚( $0.1\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 50  $\mu\text{L}$ 、酶液50  $\mu\text{L}$ 。最适温度采用10、20、30、40、50、60、70、80  $^{\circ}\text{C}$ 共8个温度梯度, 反应体系同最适pH, 对照使用100  $^{\circ}\text{C}$ 反应30 min的失活酶液。计算3次重复的相对酶活力(Krzysztof等2009), 取平均值。

### 5.2 温度稳定性

将酶液分别置于30、40、50、60  $^{\circ}\text{C}$ 水浴中, 反应0、10、20、30、40、50和60 min后, 迅速放于冰上终止反应, 于4  $^{\circ}\text{C}$ 下11 180 $\times g$ 离心5 min。其他操作参照第4节, 计算3次重复的相对酶活力, 取平均值。

### 5.3 金属离子和抑制剂对酶活影响

采用 $0.2\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 6.0)配制终浓度为 $4\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{LiCl}$ 、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{CuSO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{ZnCl}_2$ 和 $\text{MnSO}_4$ 。研究不同抑制剂对PPO影响时, 使用的化合物为二硫苏糖醇(DTT)、抗坏血酸(VC)、柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、L-半胱氨酸、 $\text{NaCl}$ 、醋酸, 选用0.5、1、10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三个浓度, 分别用 $0.2\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 6.0)配制。其他操作参照第4节, 以最大酶活力为100%, 计算3次重复的相对酶活力, 取平均值。

### 5.4 MdPPO2B底物的特异性

以邻苯二酚和焦性没食子酸为底物, 反应体系为150  $\mu\text{L}$ , 其中酶液10  $\mu\text{L}$ , 邻苯二酚和焦性没食子酸的浓度为 $0.1\sim 1\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Kátia等2008)。缓冲液使用pH 6.0的磷酸盐缓冲液。以100  $^{\circ}\text{C}$ 反应30 min后不具有活性的酶液作为对照。反应前40  $^{\circ}\text{C}$ 活化10 min, 再将底物加入到混合液中。参照上述

步骤测定酶活。邻苯二酚和焦性没食子酸分别在420和334 nm处测定吸光值, 以 $\text{OD}_{420}$ 和 $\text{OD}_{334}$ 制作饱和曲线, 然后根据双倒数作图法绘制米氏曲线。重复3次反应, 取平均值。

## 6 苯酚的降解

将表达MdPPO2B的酵母和空载体pPIC9K的对照酵母菌液OD值调至0.1, 吸取5  $\mu\text{L}$ 接种于BMY平板上(含终浓度1%甲醇、1%甘油和3种不同浓度酚类化合物), 于27  $^{\circ}\text{C}$ 培养2 d左右, 每隔24 h加入甲醇诱导。3种酚类物质分别为 $8.5\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯酚、 $45\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4,6-三氯苯酚(trichlorophenol, TCP)和 $4\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  2,6-二甲基苯酚(dimethylphenol, DMP)。

用高效液相色谱技术(high performance liquid chromatography, HPLC)检测PPO降解苯酚的效果。200  $\mu\text{L}$ 的反应体系包括酶液50  $\mu\text{L}$ 、 $4\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{CuSO}_4$ 、 $0\sim 10\ 000\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的苯酚。缓冲液使用pH 6.0的磷酸盐缓冲液。40  $^{\circ}\text{C}$ 反应8 h, 每隔1 h分析苯酚降解效率。分析柱为C18反相柱, 微孔滤膜过滤反应混合液后进行HPLC分析。HPLC分析条件为: 流动相为甲醇和水(30:70, V/V), 流动相流速为 $1\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温为30  $^{\circ}\text{C}$ 。进样量为20  $\mu\text{L}$ , 检测波长为225 nm。

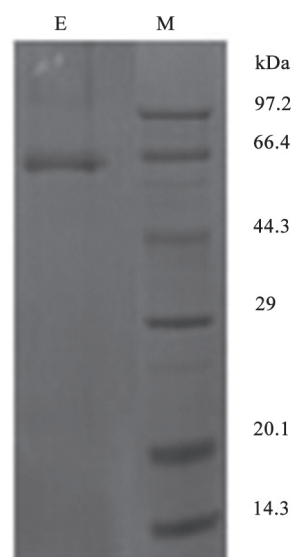


图1 SDS-PAGE检测MdPPO2B  
Fig.1 Detection of MdPPO2B by SDS-PAGE  
M: 蛋白分子量Marker; E: 纯化的蛋白。

```

1      GGATCCATGACTTTCATCTCCCTTACCAOCAAACCTCTCAATGGTGGCCCTGCACTOACCACAACCAOCCCTC
      M T S S P L P P T S T M V A L H S T T T T L
73     TTCCGCTCTOCTTTATTCOCAAACAAGTCCCTGACTCCACTGCAACGAAAAOCCAACAATGCCTTGCGGGT
      F R S P L F P N K S L T P L Q R K P K Q C L A G
145    AGAGTCCGCTGCAAAGCAACAAAAGGTGACAATGATAACCTAGATCAGGGCCTAGCAAGACTCGACAGGAGG
      R V R C K A T K G D N D N L D Q G L A R L D R R
217    AACATCCTGATAGGTTTAGCCGCGGGGTCTCTAOGTAAGGTAGGAAACCCATTGCTTTTGCOCACCA
      N M L I G L C A G C L Y G K V G N P F A F A A P
289    ATATCCGCCCAGACTTGAOCACGTGTCTOCTGCTAGCAAGCCAGAOGGTCCACCATGATGTTGCOCA
      I S A P D L T T C V P A S K P D G S T I D C C P
361    CCTACCAOCCAGCAATCATCGACTTTGAACCTCCOACTCAGGOCCTCOGCACTAGGCOOCTGCOCCAG
      P T T T T I I D F E L P D S G P L R T R P A A Q
433    GACGTTGCAAAAGACCCGTAATACTTGGCCAAAACAAAATGCCGTGAGATGATGGGGCACTTCCAGAC
      D V A N D P E Y L A K Y K N A V E M M R A L P D
505    GACGACCCGCGCAGTCAOCCACAACAGGCGATGGTACACTGCTCATACTCCGAOCTGGATACCCACAAGTC
      D D P R S H A Q Q A M V H C S Y C D G G Y P Q V
577    GGATATTCAGATTGGAGATCCAAGTTCACCTCTGTGGCTATTCTTCCOCTTCCATOGTTGGTAOCTCTAC
      G Y S D L E I Q V H F C W L F F P F H R W Y L Y
649    TTCTATGAGAAAATCATGGCGGAGCTCATTGGGGAOCAAACCTTCCOCTTCCOCTTCTGAACTGGGACGGC
      F Y E K I M G E L I G D Q T F A L P F W N W D A
721    CCAGCTGCGATGTACATTCCTGAAATTTTCACTGATAOCCGCTCATCOCTTTAOCACCACTACAGAAATATA
      P A C M Y I P E I F T D T T S S L Y D Q Y R N I
793    GCGCATCAGOCCOCCAGCTCCTGGACTTGAATTATGCGGGACCGAOGATGAOCTGCAOCCGCGCACCGA
      A H Q P P K L L D L N Y G G T D D D V D D A T R
865    ATCAATGAGAAOCTAACAOAGATGTACAAGCAGATGGTGTGCAATGCCACTTCTCACAGATATTCTACGGA
      I N E N L T T M Y K Q M V S N A T S H R L F Y G
937    GAGCCCTACAGOCAGGGACGAACCCAGATCCTGGOCGGAAACATTGACAOCCACTOCCOATAACAATATT
      E P Y S A G D E P D P G A C N I E T T P H N N I
1009  CACCTTTGGGTTGGCGAOCACCAOCCAGOCAAAACGGGAGGACATGGGAOCTTTTACTCTGOCGCGAGGGAT
      H L W V G D P T Q P N G E D M G T F Y S A A R D
1081  COGGTGTTTTACTCTCAOCCATTCCAACGTGGACOCATGTGGTCTATATATAAAGATAAGTTGGGTGGTACG
      P V F Y S H H S N V D R M W S I Y K D K L G G T
1153  GACATAGAAAATAOCCATTGGCTGGACGACAGTCTTCTTCTACGAOAGAAAAGAAATCTCGTACGCGTC
      D I E N T D W L D A E F L F Y D E K K N L V R V
1225  AAGATTCCGACTOCTGACACGAAAAAACTOCCGTATGTGTACGAOAGAAATGCTCGATCCOCTGGTTG
      K I R D S L D T K K L G Y V Y D E N V S I P W L
1297  GATTGAAAGCCGACGGCTOCTAAGTCGACAAAATAAGAGAAAGGCTAOCGTTTCACTTCTGATCTTTCTACA
      D S K P T A R K S T N K R K A T V S S S D L S T
1369  ACGTCCCTGCTACACTATOGGATATAATCAGCCTGAGGTGATGAGGCOGTCTAAGACAAAAOCCGACAGCT
      T F P A T L S D I I S V E V M R P S K T K R T A
1441  GOCAGAAAGGCGCAGGATGAGGTGCTGGTATTAAGGGGATTGACTTTGCOGGAAATGAAACTGTGAAG
      A Q K K A Q D E V L V I K G I E F A G N E T V K
1513  TTCGAGTGTATGTGAACGATGAOCCGACTOCTGGCCGGGAAAAGACAAGTCGGAGTTTCTGGGAGTTTT
      F D V Y V N D D A D S L A C K D K S E F A G S F
1585  GTTCAOCTGOCACATAAGCATAAGAAGAATATTAAOCCAAOCCGCTGAGCAATTACAAGCTTGTGGAA
      V H V P H K H K K N I K T N L R L S I T S L L E
1657  GAGTTGATCCGAGACAGAACAGTTTGGTAGTGACTTTGGTCCGAAAAGTTGGAAAGGGCCAAATCACC
      E L D A E T D N S L V V T L V P K V G K G P I T
1729  ATCCGAGGTTTAGCATTGACCTGATTAATACTACCTAAGAGCTC
      I G G F S I E L I N T T -

```

图2 *MdPPO2B*基因cDNA全长序列及其推导的氨基酸序列Fig.2 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *MdPPO2B*



## 实验结果

### 1 MdPPO2B的分离纯化

使用硫酸铵对粗酶液进行浓缩和沉淀, 用镍柱低温纯化沉淀到的粗酶, 获得纯化的重组蛋白, 用于12% SDS-PAGE电泳验证蛋白分子量。结果显示, 纯化后的重组蛋白条带单一, 并且大小与生物信息学预测相一致(图1)。说明MdPPO2B基因在以酵母菌株GS115作为宿主的分泌表达系统中转化和表达成功。用Bradford染料结合法对纯化后的蛋白进行蛋白定量, 经测定MdPPO2B的蛋白含量为 $0.0302 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。经PCR扩增后, 最终得到长度为1 773 bp的cDNA序列, 可翻译一条由586个氨基酸残基组成的多肽, 阴影部分为推测的分泌信号肽序列(图2)。

### 2 MdPPO2B最适pH值

由图3可见, 当酶反应体系pH为6.5时, 酶活力到达最高, 为100%, 即MdPPO2B的最适pH为6.5; 当体系pH低于6.0或高于7.0时, 酶活力逐渐下降; pH值为3.5时, 酶活力趋于0, PPO基本丧失酶活力。说明MdPPO2B最适pH为中性或近中性。

### 3 MdPPO2B的最适温度和热稳定性

如图4-A所示, MdPPO2B最适温度呈倒钟型形状, 在30~50 °C范围内, 仍保持较高的酶活, 当酶反应温度为40 °C时, 酶活力到达最高, 为100%, 即该酶的最适反应温度为40 °C。MdPPO2B酶液经30、40、50、60 °C共4个温度处理60 min, 每10 min测一次残余酶活。MdPPO2B在30~40 °C可以保持较高的稳定性, 30和40 °C处理60 min后, 仍能保持90%的酶活; 50 °C下处理60 min后, MdPPO2B剩余酶活力为40%; 当温度达60 °C时, MdPPO2B的活性迅速降低, 为20%左右。这说明MdPPO2B的热稳定性较差, 不耐热(图4-B)。

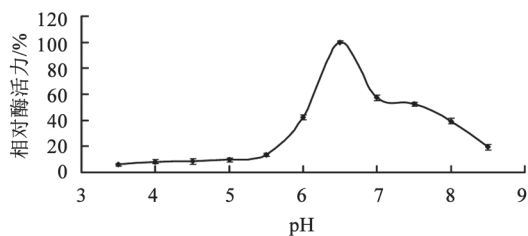


图3 pH值对MdPPO2B活力的影响

Fig.3 Effect of pH on MdPPO2B activity

### 4 金属离子和抑制剂对MdPPO2B活力的影响

不同金属离子对MdPPO2B活性的影响如图5-A所示, 与不添加金属离子的对照相比, 反应体系中添加 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 和 $\text{Li}^{+}$ 对酶活力表现出较强的促进作用, 残余的酶活力分别是170%、120%、120%、120%左右, 其中 $\text{Cu}^{2+}$ 促进作用最强;  $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 对酶活力表现出较强的抑制作用, 残余酶活分别是20%、30%、20%; 反应体系中添加 $\text{Ca}^{2+}$ 的相对酶活力为98%左右, 说明该离子对酶活力影响不大。

由图5-B可见,  $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下的大多数抑制剂对酶活力影响不大, 而在添加柠檬酸条件下酶活率仍然高达50%以上; 当抑制剂浓度达到 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, EDTA、柠檬酸对MdPPO2B活性的影响较大, 可抑制50%以上的酶活力, 其中柠檬酸对MdPPO2B活性抑制率达到80%左右, 表现出明显的抑制作用, 而添加NaCl后依然能保持几乎100%的酶活力; 当抑制剂浓度达到 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 除NaCl和醋酸外, 其余抑制剂酶活抑制率达50%以上。

### 5 MdPPO2B两种底物的酶动力学参数

根据PPO底物具有非特异性且种类多的特点, 以最常用的PPO底物邻苯二酚、焦性没食子酸来

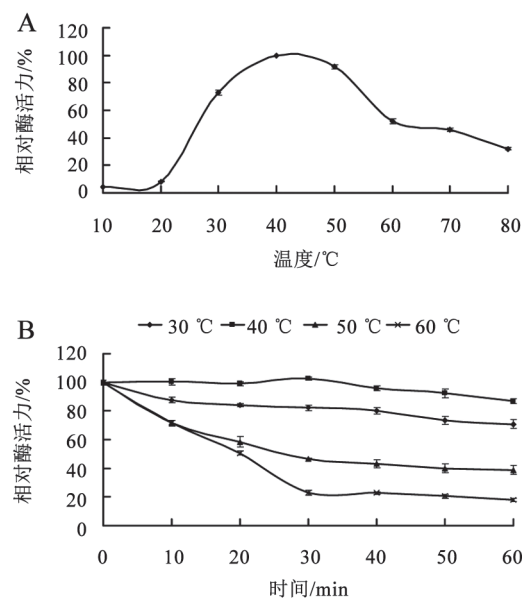


图4 温度对MdPPO2B活力(A)和稳定性(B)的影响

Fig.4 Effect of temperature on activity (A) and stability (B) of MdPPO2B

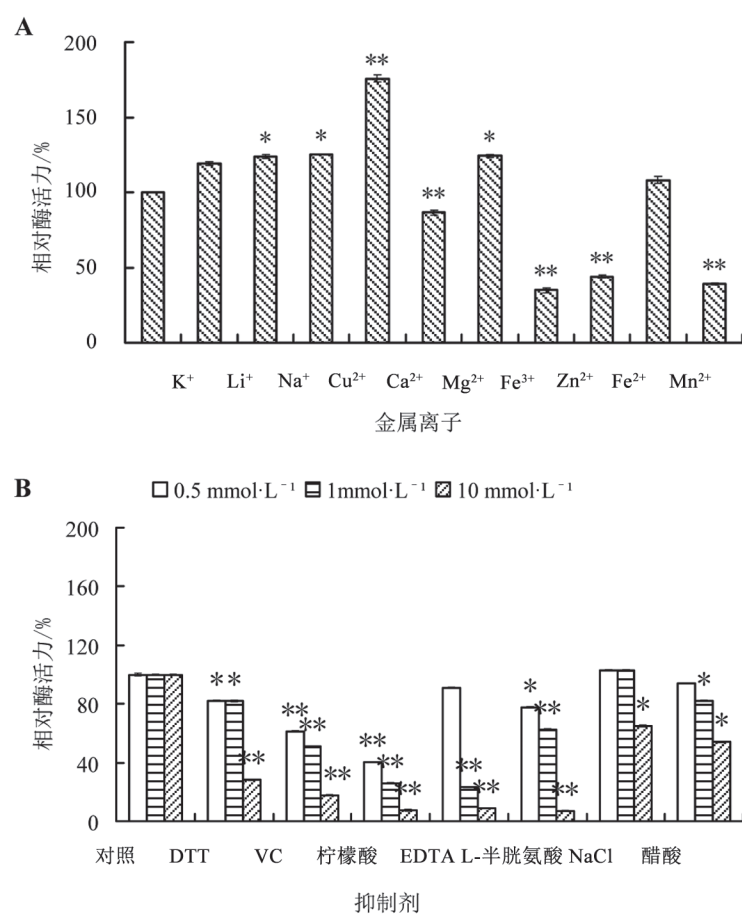


图5 不同金属离子(A)和抑制剂(B)对MdPPO2B活力的影响  
Fig.5 Effect of metal ions (A) and inhibitors (B) on MdPPO2B activity  
\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

研究MdPPO2B动力学参数。通过Lineweaver-Burk作图法分别以邻苯二酚和焦性没食子酸为底物测定 $K_m$ 、 $V_{max}$ 及 $V_{max}/K_m$ 等参数。 $K_m$ 值反映了酶和各种底物的亲和力大小,大多数酶的 $K_m$ 值在 $10^{-6}$ ~ $10^{-1}$  mol·L<sup>-1</sup>,  $K_m$ 值越小,酶与底物的亲和力越大。从表1可以看出,以邻苯二酚和焦性没食子酸作为底物时, MdPPO2B的 $K_m$ 值分别为0.161和7.920 mmol·L<sup>-1</sup>,表明邻苯二酚可与MdPPO2B较强烈地结合,是MdPPO2B的最适底物。

## 6 MdPPO2B对苯酚的降解

比较转MdPPO2B基因和pPIC9K空载体的酵母菌株对苯酚、2,4,6-TCP、2,6-DMP三种酚类化合物的降解能力,结果表明:在含有甲醇的SD培养基上,两种酵母菌株都生长正常,而在含苯酚、2,4,6-TCP、2,6-DMP的平板上,转入空载体pPIC9K的酵母菌株生长受到了抑制,而表达

MdPPO2B的酵母菌株仍保持正常的生长趋势(图6-A)。HPLC分析的结果显示,随反应时间增加,反应体系中苯酚残余量在下降。当苯酚浓度为 $600 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,反应时间1 h时,苯酚残余量为50%左右;当反应4 h时,苯酚残余量仅剩20%左右,降解效果显著(图6-B)。这说明MdPPO2B提高了毕赤酵母对这些酚类化合物的抗性。

## 讨 论

酶是具有生物活性的蛋白质,其活性与环境pH值关系密切。pH主要通过以下过程影响酶活力:(1) pH过酸或过碱影响蛋白构象,从而使酶变性失活;(2)当pH变化不剧烈时,会影响酶分子的解离状态;(3) pH会影响分子中某些基团的解离,这些基团的离子状态与酶活力中心构象和酶的专一性密切相关。酶学特性研究表明, MdPPO2B对pH

表1 以邻苯二酚和焦性没食子酸为底物的MdPPO2B动力学参数

Table 1 Kinetic constants of MdPPO2B with catechol and pyrogallol as substrate

底物	$K_m/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	$V_{\max}/\text{U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白)	$V_{\max}/K_m$
邻苯二酚	0.161	6714.00	41613.62
焦性没食子酸	7.920	0.93	0.12

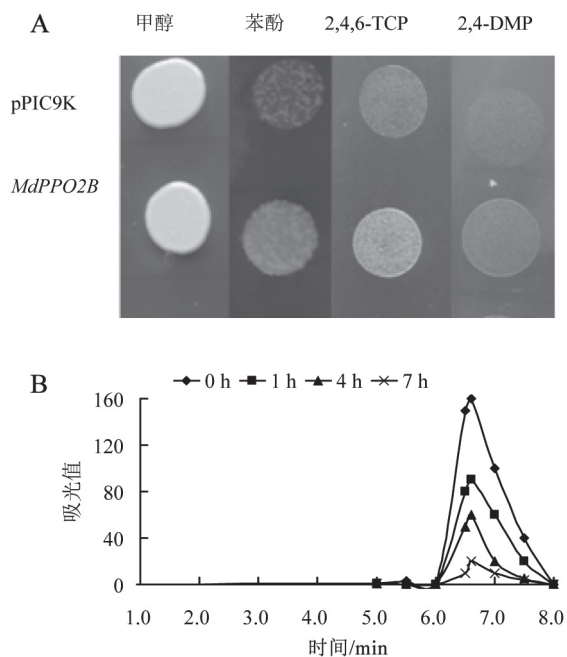


图6 含MdPPO2B基因的酵母菌株对酚类化合物的降解效果

Fig.6 Phenolic compounds were degraded by yeast strain containing MdPPO2B

A: SD板上的降解效果; B: HPLC分析。

的变化较敏感, 强酸或强碱环境均影响酶的催化反应。MdPPO2B在酸性条件下的活性较低, pH 3.5~5.5处相对酶活不足20%。

利用褐变抑制剂处理是目前果蔬贮藏和加工过程中抑制果蔬褐变最常用的方法之一(Bhande等2007), 关于抑制酶促褐变的化合物很多, 且很小的剂量就可以使酶彻底失活。但相当一部分抑制剂会产生有毒物质, 如亚硫酸盐能产生对人体有毒物质SO<sub>2</sub>, 剂量必须严格控制一定范围内, 且有时因为浓度而效果不理想, 一般不提倡使用。本研究发现, 使用抗坏血酸和L-半胱氨酸、柠檬酸等对PPO活性的抑制效果较好。考虑到抗坏血酸、L-半胱氨酸存在于大部分果蔬中且是人体健康不可缺少的营养成分, 生产成本低, PPO活力抑制效果理想, 适宜作为八棱海棠加工过程中PPO的抑制

剂。另外, 有研究发现ClO<sub>2</sub>对苹果PPO有明显的抑制作用(Fu等2007), 高压二氧化碳处理能大大降低甜菜PPO的热稳定性(Liu等2008), 而γ-射线对新鲜甘蓝汁PPO的活力没有影响(Kim等2007)。

金属离子一般以酶的辅助因子和激活剂两种形式参与酶促反应, 通过检测不同金属离子对八棱海棠PPO活性影响, 发现金属离子不同对PPO酶活力抑制效果各不同, Cu<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>对PPO酶活力有促进作用, 而Zn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>则抑制酶活力。张力等(1998)研究发现Fe<sup>2+</sup>离子对漆酶的催化活性表现出抑制作用, 并研究了抑制位点和抑制特点, 与本研究结果不一致。柠檬酸之所以对PPO活性产生抑制作用, 是因为PPO是一种以铜离子为辅基的金属蛋白, 柠檬酸中的3个羧基与PPO的铜离子发生螯合作用, 达到抑制酶活力的目的; 其次, 柠檬酸通过调节反应体系的pH, 使得八棱海棠PPO远离最适作用范围而活性降低。金属离子对八棱海棠PPO活性的影响较复杂, 从中找不到可循规律, 但它们间的关系紧密, 其与酶作用的具体机理尚需进一步研究。

生产中, 酚类化合物普遍存在于如炼钢、石油炼制、塑化、造纸、医药、农用化学品、印染等行业的工业废水中(Ha等2000; Grady 1990)。酚类化合物经过糖基化作用后, 对生物体的毒性一般都降低。表达MdPPO2B基因的酵母菌对苯酚、2,4,6-TCP、2,6-DMP的抗性要高于转入pPIC9K空载体的酵母菌。这可能由于MdPPO2B基因对酚类化合物产生糖基化作用后降低了对酵母菌的毒性。关于微生物降解酚类化合物的研究已见报道, 并且成效显著。Gaitan等(2011)的研究表明, 当浓度为15 mg·L<sup>-1</sup>的2,4,6-TCP反应4 h后, 来自Trametes pubescens的漆酶降解率达到84.2%。在本研究中, 当苯酚浓度增加至600 μmol·L<sup>-1</sup>时, 4 h后MdPPO2B的苯酚降解率达80%左右, 降解浓度远远高于前者, 且该酶具有很好的稳定性和持久

性。总之,对*MdPPO2B*基因的研究可以为以后的植物污染物修复提供重要的参考依据。

### 参考文献

- 程鹏, 马晓红, 史益敏(2013). 低温解除休眠过程中喇叭水仙鳞片中酚酸类物质代谢及相关酶活性的变化. 植物生理学报, 49 (2): 137~143
- 李萍, 成仿云, 张颖星(2008). 防褐剂对牡丹组织褐化发生、组培苗生长和增殖的作用. 北京林业大学学报, 30 (2): 71~76
- 马长青, 柏素花, 戴洪义(2013). ‘嘎拉’苹果多酚氧化酶基因*MdPPO*的克隆与表达分析. 植物生理学报, 49 (8): 803~810
- 张力, 花建丽, 王光辉, 李先春, 汪德先(1998). 生命金属离子对漆酶催化活性的影响. 江西师范大学学报(自然科学版), 22 (3): 238~242
- 张鹏(2007). 以ABTS为底物测定漆酶活力的方法. 印染助剂, 24 (1): 43~45
- Beecher B, Skinner DZ (2011). Molecular cloning and expression analysis of multiple polyphenol oxidase genes in developing wheat (*Triticum aestivum*) kernels. J Cereal Sci, 53 (3): 371~378
- Bhande SD, Ravindra MR, Goswami TK (2007). Respiration rate of banana fruit under aerobic conditions at different storage temperatures. J Food Eng, 19 (11): 32~39
- Cary JW, Lax AR, Flurkey WH (1992). Cloning and characterization of cDNAs coding for *Vicia faba* polyphenol oxidase. Plant Mol Biol, 20: 245~253
- Fu YC, Zhang KL, Wang YN, Du JH (2007). Effects of aqueous chlorine dioxide treatment on polyphenol oxidases from golden delicious apple. LWT-Food Sci Technol, 40 (8): 1362~1368
- Gaitan IJ, Medina SC, Gonzalez JC, Rodriguez A, Espejo AJ, Osma JF, Sarria V, Alméciga-Díaz CJ, Sánchez OF (2011). Evaluation of toxicity and degradation of a chlorophenol mixture by the lacase produced by *Trametes pubescens*. Bioresour Technol, 102 (3): 3632~3635
- Grady CPL Jr (1990). Biodegradation of toxic organics: status and potential. J Environ Eng, 116: 805~828
- Ha SR, Vinitnanthar S, Ozaki H (2000). Bioregeneration by mixed microorganisms of granular activated carbon loaded with a mixture of phenols. Biotechnol Lett, 22: 1093~1096
- Hatcher DW, Kruger JE (1993). Distribution of polyphenol oxidase in flour millstreams of Canadian common wheat classes milled to three extraction rates. Cereal Chem, 70: 51~55
- Hunt MD, Eannetta NT, Yu H (1993). cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. Plant Mol Biol, 21: 59~68
- John MM, James EB, Petrea H, Kenneth DK, Deanna N, Philip LB (2011). Allelic variation of polyphenol oxidase genes impacts on Chinese raw noodle color. J Cereal Sci, 54 (3): 387~394
- Kátia NM, Jorge AWG, Pedro VO, Carmen CT (2008). Inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in green coconut water by microwave processing. J Food Eng, 88 (2): 169~176
- Kim D, Song H, Lim S (2007). Effects of gamma irradiation on the radiation-resistant bacteria and polyphenol oxidase activity in fresh kale juice. Radiat Phys Chem, 76 (7): 1213~1217
- Kim JY, Seo YS, Kim JE, Sung SK, Song KJ, An GH, Kim WT (2001). Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple. Plant Sci, 161 (6): 1145~1152
- Kruger JE, Hatcher DW, DePauw RA (1994). Whole seed assay for polyphenol oxidase in Canadian prairie spring wheat and its usefulness as a measure of noodle darkening. Cereal Chem, 71 (4): 324~326
- Liu X, Gao YX, Peng XT (2008). Inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in red beet (*Beta vulgaris* L.) extract with high pressure carbon dioxide. Innov Food Sci Emerg, 9 (4): 24~31
- Park WJ, Shelton DR, Martin TJ (1997). Variation in polyphenol oxidase activity and quality characteristic among hard white and hard winter wheat sample. Cereal Chem, 74 (1): 7~11
- Shallar T, Hennig N, Gutfinger T, Hareven D, Lifschitz E (1992). The tomato 66.3 kD polyphenol oxidase gene: molecular identification and developmental expression. Plant Cell, 4: 135~147
- Waliszewski KN, Márquez O, Pardo VT (2009). Quantification and characterisation of polyphenol oxidase from vanilla bean. Food Chem, 117 (2): 196~203