



槟榔果仁多酚氧化酶分离纯化及其酶特性研究

郭宇婷, 潘永贵*, 张正科, 张伟敏
(海南大学食品学院, 海口 570228)

摘要: 以槟榔果仁为试材, 经pH6.8磷酸缓冲溶液(PBS)提取多酚氧化酶(PPO)粗酶液, 采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀后, 进一步通过DEAE-Sepharose Fast Flow和Phenyl Sepharose 6 Fast Flow柱层析, 获得PPO纯化酶液。经鉴定其纯度达到电泳纯, 相对分子质量为29.2 ku。在此基础上, 对提取的PPO进行酶学特性研究, 结果表明, 槟榔果仁中PPO最适温度为20 ℃, 最适pH为7.0; 以邻苯二酚为底物, 该酶的最大反应速度($V_{\max}$)为140.84 U/mL·min, K_m 为3.22 mmol/L。

关键词: 槟榔果仁; PPO; 分离纯化; 酶特性

中图分类号: R 284.2

文献标志码: A

文章编号: 1005-9989(2018)11-0235-05

DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2018.11.039

Isolation, purification and characterization of polyphenol oxidase from areca nut kernel

GUO Yu-ting, PAN Yong-gui*, ZHANG Zheng-ke, ZHANG Wei-min

(College of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou 570228)

Abstract: Using areca nut kernel as test material, polyphenol oxidase (PPO) crude enzyme solution was extracted by pH 6.8 phosphate buffer solution (PBS). After $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractional precipitation, and then through DEAE-Sepharose Fast Flow and Phenyl Sepharose 6 Fast Flow column chromatography, the purified PPO solution was obtained, indicating the presence of PPO enzyme in the areca nut kernel. Its purity was confirmed to be pure by electrophoresis and its relative molecular mass was determined to be 29.2 ku. On this basis, the enzymatic characterization of the extracted PPO were studied, the results showed that the optimum temperature of PPO in areca nut kernel is 20 ℃, the optimum pH is 7.0, and the maximum reaction rate of the enzyme ($V_{\max}$) is 140.84 U/mL·min with catechol as the substrate, K_m is 3.22 mmol/L.

Key words: areca nut kernel; polyphenol oxidase; isolate and purification; enzyme characterization

槟榔(*Areca catechu* L.)为我国四大南药之首, 同时也是世界三大口腔嗜物之一, 国内主产地在

海南。虽然, 目前市场上槟榔干果制品较多, 但是仍然有许多消费者更喜欢食用槟榔鲜果, 然而

收稿日期: 2018-06-26

*通讯作者

基金项目: 海南省自然科学基金项目(318MS014)。

作者简介: 郭宇婷(1996—), 女, 硕士研究生, 主要从事果蔬采后生理及保鲜的研究工作。



每年(4~7)月处于槟榔鲜果空档期^[1-2]。因此, 槟榔保鲜技术研究越来越受到重视。但是研究发现, 槟榔鲜果在采后贮藏过程中存在果仁褐变问题, 直接影响到了产品品质。而目前少量的相关研究主要关注槟榔果肉褐变问题, 研究发现槟榔果肉褐变产物与酚类物质和PPO反应引起的酶促褐变产物相似^[3], 而关于槟榔果仁褐变仅在褐变控制方面发现茉莉酸甲酯处理鲜食槟榔可以显著抑制果仁褐变^[4], 但对于褐变机制的研究尚未见到相关报道。但是从类似的果实内部褐变问题研究较多的菠萝和梨果实中发现, 菠萝内部褐变是菠萝果实内源PPO与酚类物质在有氧条件下发生的酶促褐变, 且病果的PPO活性比正常果实普遍偏高^[5-6]。对于梨果实, 研究者对果实中的褐变底物和酶做了大量研究, 酪氨酸和漆酶是梨中主要的PPO, 催化绿原酸等酶促底物产生褐变, 且酪氨酸活性下降有助于减轻褐变的发生^[7-8]。进一步通过对鸭梨多酚氧化酶基因克隆及其反义转化而获得低多酚氧化酶活性的转基因鸭梨植株, 则有望从根本上解决黑心病的发生^[9]。

酶促褐变是果蔬采后生理褐变的主要原因, 多酚氧化酶(PPO)是果蔬酶促褐变的关键酶^[10-11]。因此, 要确认槟榔果仁贮藏过程中褐变是否属于酶促褐变, 就需要明确槟榔果仁中是否存在PPO。所以本研究的目的就在于确定槟榔果仁中是否存在PPO, 并对其酶特性进行研究。从而为最终揭示槟榔果仁褐变机制提供基础, 也为今后进一步控制槟榔果仁褐变寻求理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 材料与试剂 无机械损伤及病虫害的新鲜槟榔: 市售; DEAE-琼脂糖凝胶、苯基-琼脂糖凝胶: Solarbio公司; 磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、邻苯二酚、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、硫酸铵、柠檬酸、氢氧化钠、磷酸、甘氨酸、十二烷基硫酸钠(SDS)、过硫酸铵、Tris、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、四甲基乙二胺、考马斯亮蓝G₂₅₀、溴酚蓝: 分析纯。

1.1.2 仪器设备 CAHT-50L超纯水器: 北京中科智恒科技有限公司; DS-1高速组织捣碎机: 上海精科实验有限公司; TGL-16M高速冷冻离心机: 上海卢湘仪离心机仪器有限公司; T6系列紫外-

可见分光光度计: 北京普析通用仪器有限责任公司; DHL-2型恒流泵: 上海精科实业有限公司; HD-A电脑采集器、HD-3紫外检测仪: 南京大学; RDY双胶迷你垂直电泳仪: 北京荣阳经典科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 PPO粗酶液的提取 参照潘永贵^[12]的方法略作改动。取新鲜的槟榔果仁组织50 g, 按1:2比例加入冷却至4 ℃内含5% PVP的0.1 mol/L磷酸缓冲溶液(PBS)中(pH6.8), 置于高速组织捣碎机中快速捣碎, 浆液于4 ℃下浸提2 h, 4层脱脂纱布过滤, 滤液于高速冷冻离心机中10000 r/min离心15 min, 上清液即为PPO粗酶液。

1.2.2 PPO分离纯化

1.2.2.1 硫酸铵分级沉淀 取上述PPO粗酶液于冰浴中, 向其中缓慢加入(NH₄)₂SO₄至30%饱和度, 4 ℃下静置2 h, 然后在4 ℃、10000 r/min下离心10 min, 收集上清液。继续向其中缓慢加入(NH₄)₂SO₄至70%饱和度, 4 ℃下静置过夜。然后于4 ℃、10000 r/min下离心15 min, 收集沉淀, 用少量0.1 mol/L、pH6.8的PBS将沉淀溶解得到酶的提取液。然后将酶提取液装入透析袋中, 按酶提取液体积的100倍加入相同pH的PBS到透析装置中, 于4 ℃下透析过夜, 中间每隔4 h更换一次透析液。

1.2.2.2 DEAE-Sepharose Fast Flow柱层析 在Mishra BB^[13]方法的基础上略作修改, DEAE-琼脂糖凝胶FF层析柱(2 cm×25 cm)用初始缓冲液(按凝胶:缓冲液=3:1的比例)配成匀浆装柱, 然后用(2~3)倍体积0.1 mol/L、pH6.8的PBS平衡柱子, 将取1.2.2.1所得的多酚氧化酶提取液3 mL上柱, 用含(0~0.5)mol/L NaCl溶液(0.1 mol/L, pH6.8的PBS配制)采用自动梯度混合仪分别进行线性梯度洗脱(1.2 mL/min, 3.0 mL/管), 于280 nm下检测酶活性峰, 然后收集有活性峰的洗脱液。

1.2.2.3 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow柱层析 苯基-琼脂糖凝胶FF层析柱(2 cm×15 cm)首先用含1.5 mol/L (NH₄)₂SO₄溶液(0.1 mol/L, pH6.8的PBS配制)平衡, 然后将1.2.2.2收集的洗脱液—4 ℃透析, 冷冻干燥制成酶粉, 然后溶于1.5 mol/L (NH₄)₂SO₄溶液1 mL中上样过柱, 换用含(1.5~0.5)mol/L (NH₄)₂SO₄的上述缓冲液分别从高浓度到低浓度进行线性洗脱(0.6 mL/min, 3.0 mL/管), 确定



具有PPO活性的洗脱峰并收集。将得到纯化的酶液冷冻干燥后用于凝胶电泳鉴定其纯度。

1.2.3 PPO活性 配制3 mL 0.5 mol/L邻苯二酚(采用pH6.8, 0.1 mol/L的PBS配制), 然后向其中加入纯化酶液0.2 mL, 测定 ΔOD_{398} 的变化, 以每分钟吸光值变化0.001表示一个酶活性单位(U)。

1.2.4 PPO纯度鉴定及其相对分子质量 参照何凤平^[14]的方法稍作修改。采用浓度为12%分离胶, 5%的浓缩胶, 电流强度为15 mA的聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)垂直板电泳鉴定上述提取酶的纯度及其相对分子质量。以Marker的迁移率为横坐标, 相对分子质量的常用对数值(1gMr)为纵坐标绘制标准曲线图, 根据PPO的相对迁移率 R_f 值计算其相对分子质量。

1.2.5 PPO性质研究

1.2.5.1 PPO最适反应温度 首先取3 mL 0.5 mol/L邻苯二酚(采用pH6.8, 0.1 mol/L的PBS配制)分别放于10、15、20、30、35、40、50、60 °C和70 °C下保持10 min, 然后取0.2 mL酶液分别加入其中, 按照1.2.3中的方法测定PPO活性, 每个温度重复3次。

1.2.5.2 PPO热稳定性 将纯化的PPO酶液分别放置于20、30、40、50、60、70 °C和80 °C下保温10 min, 然后每隔10 min取出一次, 冷却到室温。按照1.2.3中方法测定PPO活性, 以未保温时的酶活性为100%, 计算PPO相对酶活性。

1.2.5.3 PPO最适pH 将0.2 mL纯化的PPO酶液在常温下分别放置于pH为3、4、5、6、6.5、7、7.5、8、9和10的缓冲溶液中, 按照1.2.3中方法测定各pH条件下PPO活性。

1.2.5.4 PPO的pH稳定性 将0.2 mL纯化的酶液加入到3 mL的pH分别为3、4、5、6、6.5、7、7.5、8、9和10的缓冲液中, 于最适温度下分别放置1 h, 然后按1.2.3酶活性测定方法测定各pH条件下残余的PPO活性, 以各pH条件下所测得的最大酶活性为100%, 计算PPO相对酶活。

1.2.5.5 米氏常数(K_m)和最大反应速率(V_{max}) 用pH6.8、0.1 mol/L的PBS分别配制0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1 mol/L不同浓度的邻苯二酚溶液, 在PPO最适反应条件下加入0.2 mL纯化的酶液, 测定PPO活性; 然后利用Lineweaver-Burk双倒数作图法, 求出米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max} 。

2 结果与分析

2.1 PPO分离纯化

2.1.1 DEAE-Sepharose Fast Flow层析 经PBS浸提得到槟榔果仁PPO粗酶液, 然后采用 $(NH_4)_2SO_4$ 分级沉淀后初步纯化, 所得酶液经透析后, 进行DEAE-Sepharose Fast Flow柱层析。由图1可知, 洗脱过程中出现了3个洗脱峰。其中, 前2个洗脱峰没有PPO酶活性, 仅第3个洗脱峰具有PPO酶活性, 由此确定PPO在第3个洗脱峰中。因此, 收集第3个洗脱峰的酶液, 经过透析冷冻干燥24 h后, 进行Phenyl Sepharose 6 Fast Flow柱层析。

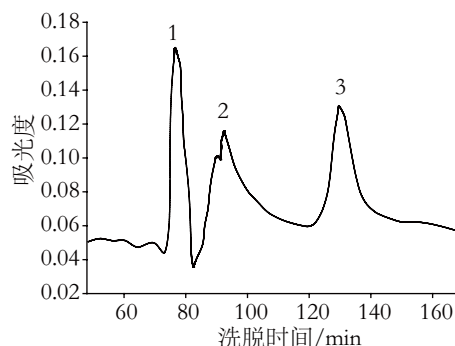


图1 槟榔果仁PPO的DEAE-琼脂糖凝胶洗脱曲线

2.1.2 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow层析 将经过DEAE-Sepharose柱层析之后所得的PPO酶液进行Phenyl Sepharose 6 Fast Flow层析, 如图2所示, 洗脱液中只出现了一个洗脱峰, 且具有很高的PPO活性。表明该酶已经分离纯化到层析纯, 将上述具有PPO酶活性的洗脱峰酶液收集, 然后进行SDS-PAGE电泳鉴定其纯度。

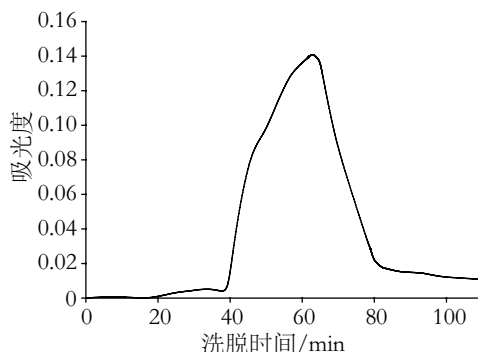


图2 槟榔果仁PPO的苯基-琼脂糖凝胶洗脱曲线

2.1.3 槟榔果仁PPO纯化结果 如表1所示, PPO经过各级纯化步骤, 最终的纯化倍数为4.11倍, 回收率为7.8%, 比活力达78.15 U/mg。

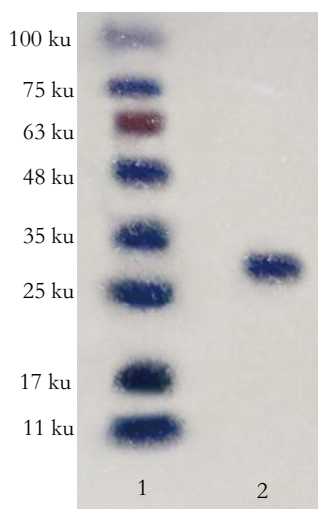


表1 槟榔果仁PPO纯化结果

步骤	PPO总酶活/U	总蛋白/mg	比活力U/mg	提纯倍数	回收率/%
粗酶液	2523.07	74.21	19.03	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀	1465.43	58.10	25.22	1.32	58.08
DEAE-琼脂糖凝胶层析	618.01	10.75	57.49	3.02	24.49
苯基-琼脂糖凝胶层析	196.95	2.52	78.15	4.11	7.8

2.2 SDS-PAGE纯度鉴定及相对分子质量测定

PPO经过2次柱层析后得到的酶液经电泳鉴定出现单一蛋白条带,说明经过DEAE-琼脂糖凝胶和苯基-琼脂糖凝胶柱层析所得到的PPO已经被纯化到电泳纯。采用SDS-PAGE法测定多酚氧化酶相对分子质量,结果如图3所示。从图3可以求出槟榔果仁中多酚氧化酶分子量为29.2 ku。



注: 1. 标准蛋白Maker; 2. 纯化PPO酶。

图3 槟榔果仁PPO的SDS-PAGE

2.3 槟榔果仁PPO动力学特性

2.3.1 PPO最适反应温度及热稳定性 如图4所示,在(10~20)℃之间,随着温度的升高,PPO酶

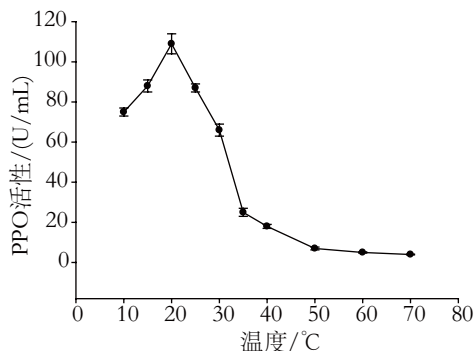


图4 温度对槟榔果仁PPO活性的影响

活性逐渐增高,在20℃时PPO酶活性达到峰值。随后,酶活性迅速下降,40℃后酶活性下降趋缓,到70℃时酶活性仅为最高酶活的3.67%。因此,20℃为槟榔果仁PPO的最适反应温度,这与对莲藕、紫薯和莴笋^[15-16]的研究结果一致。

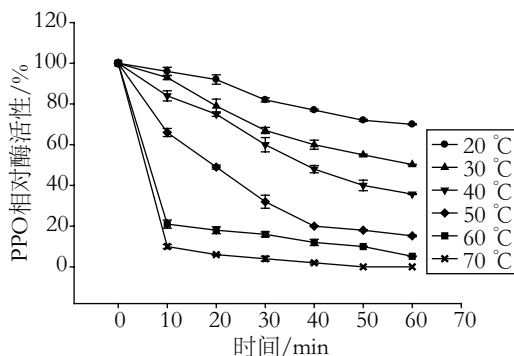


图5 槟榔果仁PPO热稳定性

图5为不同温度和时间下PPO相对酶活性变化情况。由图5可知,在20℃下,槟榔果仁PPO相对酶活性下降较慢,经过1 h后,其相对酶活性仍为起始的70%;在(30~60)℃下,刚开始酶活性下降较快,保温40 min后逐渐减缓。在红枣、鳄梨和香蕉等果蔬中PPO也有类似情况出现^[17]。而70℃下,10 min内酶相对活性就骤降到起始的10%;50 min时,酶活性已基本检测不到,表明槟榔果仁PPO耐热性较差。其可能原因是温度过高引起蛋白质变性,导致酶活性丧失。

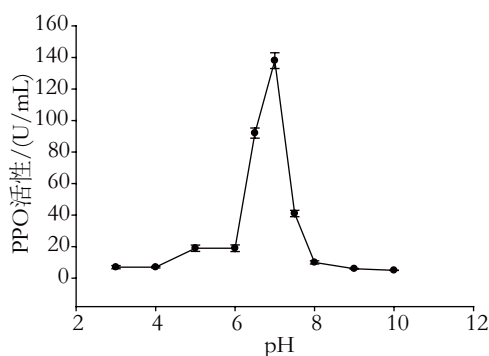


图6 pH对槟榔果仁PPO活性的影响

由图6可看出,pH3~6之间时,PPO酶活性极低,pH6~7时酶活性迅速增大,当pH为7.0时,PPO酶活性达到最高为138 U/mL。随后,随着pH升高,酶活性迅速下降,pH大于8时,酶活性几乎为零,因此PPO的最适pH为7.0。比较不同果蔬的最适pH发现,大多数果蔬PPO在pH5.5~7.0之间较为稳定,枇杷、芦蒿PPO的最适pH为6.5,杏



和葡萄最适pH为7.0^[18]，与槟榔果仁PPO相似，但不同于菠萝^[6]的最适pH4.8。

对于槟榔果仁PPO pH稳定性而言，pH6.5~7.5范围内PPO酶活稳定性相对较高，pH4~6.5范围内随着pH逐渐增高稳定性也随之增大，在pH7~10范围内随着pH增大，稳定性逐渐下降(图7)。

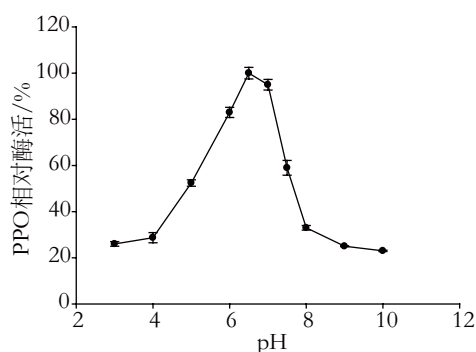


图7 槟榔果仁PPO pH稳定性

2.3.2 不同底物浓度对槟榔果仁PPO活性的影响

如图8所示，在最适温度和最适pH条件下，随着底物浓度的增大，PPO酶活性呈现上升趋势且反应速率与底物浓度呈现线性关系，此时的反应为一级反应；当底物浓度大于0.05 mol/L时，酶反应速率缓慢增加，(0.07~0.1)mol/L范围内，浓度增加PPO活性已保持不变，说明酶已经达到饱

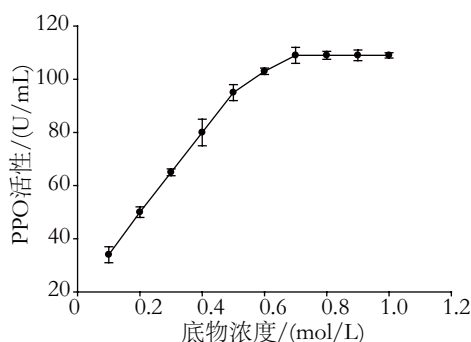


图8 不同底物浓度对槟榔果仁PPO活性的影响

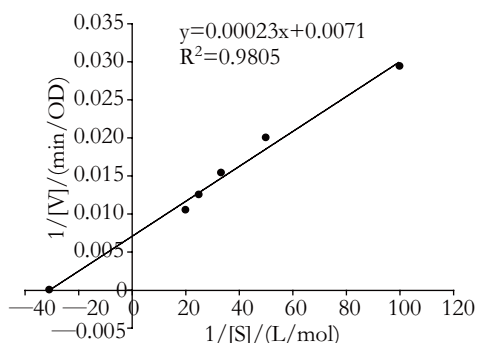


图9 槟榔果仁PPO Lineweaver-Burk双倒数曲线

和，反应速率趋于最高值。这一结果与槟榔芋^[19] PPO反应趋势一致。

如图9所示，根据不同浓度的邻苯二酚与槟榔果仁PPO反应的Lineweaver-Burk双倒数曲线作图，拟合曲线的线性回归方程为： $y=0.00023x+0.0071$ ($R^2=0.9805$)，计算得到PPO的 $V_{\max}=140.84$ U/mL·min、 $K_m=3.22$ mmol/L。说明底物邻苯二酚与槟榔果仁PPO有较强的亲和力。其 K_m 值与鲜切芦荟^[18] $K_m=4$ mmol/L接近，表明二者的PPO均与底物亲和力较强。而与红枣PPO米氏方程 $V_{\max}=0.29$ U/mL·min、 $K_m=76$ mmol/L相差较大^[17]，对比表明槟榔果仁PPO与酚类底物更容易发生作用，且最大反应速率较大。

3 结论

槟榔果仁经过pH6.8的磷酸缓冲液浸提得到的粗酶液，然后经硫酸铵分级沉淀和采用DEAE-Sephacrose Fast Flow以及Phenyl Sepharose 6 Fast Flow柱层析，最终得到纯度达到层析纯和电泳纯的PPO，其相对分子质量为29.2 ku；此时比活力可达78.15 U/mg，回收率7.8%，提纯4.11倍。对纯化后PPO的动力学性质研究表明，槟榔果仁中该酶的最适温度为20℃，在温度低于40℃的范围内较为稳定。最适pH为7.0，在pH为6.5~7.5的范围内较为稳定。以邻苯二酚为底物时，该酶 K_m 为3.22 mmol/L， $V_{\max}$ 为140.84 U/min·mL。

参考文献：

- [1] 谢龙莲,张慧坚,方佳.我国槟榔加工研究进展[J].广东农业科学,2011,38(4):96-98
- [2] Peng W, Liu Y-J, Wu N, et al. Areca catechu L. (Arecaceae): A review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology[J]. Journal of Ethnopharmacology,2015,164:340-356
- [3] 蒋跃明,陈芳,张东林,等.槟榔褐变底物的初步研究[J].热带作物学报,1992,(02):93-96
- [4] 李喜宏,张姣姣,郝晓磊,等.茉莉酸甲酯对鲜食槟榔冷害调控研究[J].现代食品科技,2016,(12):260-267
- [5] 罗惠华,林炎坤.菠萝黑心病发病机制——(一)果内酶促褐变[J].基因组学与应用生物学,1993,(3):1-8
- [6] 李江明.菠萝果实采后黑心病的发生机制研究[D].湛江:广东海洋大学,2014
- [7] 鞠志国,朱广廉,曹宗巽.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[J].植物生理学报,1988,(4):46-51

(下转第245页)

