桑叶多酚氧化酶活性研究

袁娅利 胡玥婵 郭丽彬 柳 娜 田国政*

(湖北民族学院生物科学与技术学院,湖北 恩施 445000)

摘 要:以新鲜桑叶为材料,考察不同温度、pH值、底物浓度、激活剂、抑制剂对桑叶PPO活性的影响。结果表明:桑叶PPO酶活性的最适温度为40℃,最适pH值为6.0,最适底物浓度为0.02moL/L的焦性没食子酸;高温(70℃)短时间(2min)处理能明显抑制酶的活性;蔗糖、硫酸铝和硼酸溶液对桑叶PPO活性有一定激活作用,在0.1moL/L时激活率分别达到75%、73%、88%;抗坏血酸、柠檬酸、亚硫酸钠对桑叶PPO活性有一定抑制作用,亚硫酸钠、柠檬酸在0.1moL/L时抑制率分别达到80%、87%,抗坏血酸的浓度在0.6moL/L时抑制率达到了86%。为深入研究桑叶PPO的酶学特性及应用研究奠定了基础。

关键词:桑叶;多酚氧化酶;活性研究

DOI:10.14051/j.cnki.xdyy.2019.04.003

自然界中,大多数植物经常会发生褐变,引起植物褐变的原因是多酚氧化酶(*PolyphenolOxidase,PPO*)与底物接触发生氧化还原反应,在有氧的条件下催化酚类物质形成醌类物质,从而生成黑色素,引起植物褐变,在食品行业里PPO易导致食品产品质量恶化。1894年Betrand首次研究了PPO,发现它是一种酶蛋白。1937年Kubowitz在Warburg实验室中第1次分离出PPO[1,2]。研究发现,PPO不仅对植物的褐变产生影响,还会影响植物的抗病性,参与植物的次生代谢,产生毒性物质杀死病原菌,PPO活性高会加强嫁接伤口处呼吸作用,加速伤口木质化,从而降低成活率[3],PPO有防御昆虫[4]的功能。PPO的作用有利有弊。

桑叶是桑科植物桑(*Morus.aLba.L*)的叶,约占桑树地上部产量的64%,不仅用作养蚕饲料,且为药食同源类植物[5],富含有生物碱、黄酮和多糖类化合物以及多种酶类物质,对糖尿病、高血糖和高血压等疾病的预防和治疗疗效显著[6]。目前,对桑叶PPO的研究较少,对桑叶PPO活性[7]、桑叶PPO引起植物褐变的机理[8]、桑叶PPO的分离提纯[9]等研究有报道,但有很大的局限性。通过对恩施地区桑叶PPO的深入研究有利于桑叶的深度开发,充分利用桑叶PPO的性质,应用到农业、食品等行业中,提高农业产品的经济价值,降低因植物褐变引起的损失。

1 材料与方法

1.1 主要材料与设备

试验材料:幼嫩桑叶采摘于湖北民族学院综合实验楼后山。

试验仪器:AL204电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司 上海)、UV-2550紫外可见光分光光度计(尤尼柯仪器有限公司 上海)、CR21高速冷冻离心机 日本日立公司)、Seven Easy pH计(梅特勒-托利多仪器有限公司 上海)、-80℃超低温冰箱(日本日立公司)。

1.2 方法

1.2.1 原料预处理。取幼嫩的新鲜桑叶,贮存于-80℃超低温冰箱。取1g桑叶,加入2g二氧化硅及5mL 0.01 moL/L磷酸缓冲液(pH值6)冰浴研磨。收集研磨液定容至50mL在4℃下12000 r/min离心30 min,上清液4℃保存备用。

1.2.2 桑叶PPO活性测定方法。在3.9mL磷酸缓冲溶液(pH值7.0)中,加入1.0mL 0.02moL/L焦性没食子酸溶液及0.1mLPPO粗酶提取液,混匀作为反应体系。以0.1mL磷酸缓冲液(pH值7.0)代替粗酶提取液的溶液加入反应体系作为空白对照,在420nm波长下吸光度值A[10]。A值每1min内变化0.01为1个酶活力单位(U)。则比酶活力计算公式如下:

比酶活力=U/V=100A/V

式中:U=总酶活力,V=粗酶提取液体积,A=吸光度值变化。

1.2.3 pH值影响桑叶PPO活性的测定方法。在3.9mL磷酸缓冲溶液(pH值5.0,6.0,6.5,7.0,7.2,7.5,8.0,9.0)中,加入1.0mL 0.02moL/L焦性没食子酸溶液及0.1mL PPO粗酶提取液,混匀作为反应体系,溶液置于室温下反应5min后测定酶的残留活性。

1.2.4 pH值对桑叶PPO活性稳定性测试。在3.9mL PB溶液(pH值5.0,6.0,6.5,7.0,7.2,7.5,8.0)中,加入0.1mL PPO粗酶提取液,混匀作为反应体系,将溶液置于4℃冷藏48h后加入1.0mL 0.02moL/L焦性没食子酸溶液,测定酶的残留活性。

1.2.5 温度影响桑叶PPO活性的试验方法。在3.9mL pH值7.0的PB溶液中,加入1.0mL 0.02moL/L的焦性没食子酸溶液和0.1mL的桑叶PPO酶液,混匀后分别在20、30、40、50、60、70℃下反应5min,在420nm下测定酶的残留活性,前6min每1min测1次,6min后每2min测1次,直至反应稳定。

1.2.6 温度对桑叶PPO活性稳定性测试。将定量的酶液分别在20、30、40、50、60、70℃的水浴中加热10min。后在3.9mLpH值7.0的PB溶液中,加入1.0mL 0.02moL/L的焦性没食子酸溶液,分别在20~70℃水浴中加热的桑叶PPO酶液0.1mL,混匀后在420nm下测定酶的残留活性,前6min每1min测1次,6min后每2min测1次,直至反应稳定。

1.2.7 激活剂、抑制剂影响桑叶PPO活性的试验方法。在3.9mLpH值7.0的PB溶液中,加入1.0mL 0.02moL/L的焦性

基金项目:湖北民族学院大学生创新项目,项目编号:2017CX168。
作者简介:袁娅利(1994-),女,贵州盘县人,大学本科,大学学号:071541004;郭丽彬,大学学号:071541010;胡玥婵,大学学号:0715410007;柳娜,大学学号:071541012。
通信作者:田国政(1964-),湖北鹤峰人,高级实验师,从事天然产物开发与利用。

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

没食子酸溶液、0.1mL 的桑叶 PPO 酶液和 1mL 不同浓度的试剂，混匀后在室温下测定酶活性。具体试验方案见表 1。

表 1 不同激活剂、抑制剂对桑叶 PPO 活性的影响

名称(mmoL/L)	浓度				
蔗糖	0.01	0.05	0.1	0.15	0.2
硝酸铝	0.01	0.05	0.1	0.15	0.2
硼酸	0.01	0.05	0.1	0.15	0.2
抗坏血酸	0.2	0.6	0.8	1	0.1
柠檬酸	0.01	0.1	0.15	0.2	0.05
亚硫酸钠	0.01	0.1	0.15	0.2	0.05

1.2.8 底物浓度影响桑叶 PPO 活性的试验方法。在 3.9mLpH 值 7.0 的 PB 溶液中，加入 0.1mL 的桑叶 PPO 酶液和 1.0mL 不同浓度（0.006moL/L、0.008moL/L、0.01moL/L、0.02moL/L、0.04moL/L、0.06moL/L、0.08moL/L）的焦性没食子酸溶液，混匀后在室温下测定酶活性。

2 结果与分析

2.1 pH 值对桑叶 PPO 活性的影响

如图 1 可知，桑叶 PPO 的最适 pH 值为 6. 0，当 pH 值 5.0～ 6.0 时，随着 pH 值的升高桑叶的 PPO 活性上升，上升幅度达到了 66%；当 pH 值 6.0～9.0 时，随着 pH 值的上升桑叶 PPO 活性下降，至 pH 值 9.0 时，酶活性降至 0.049U，降低幅度达到了 88%。

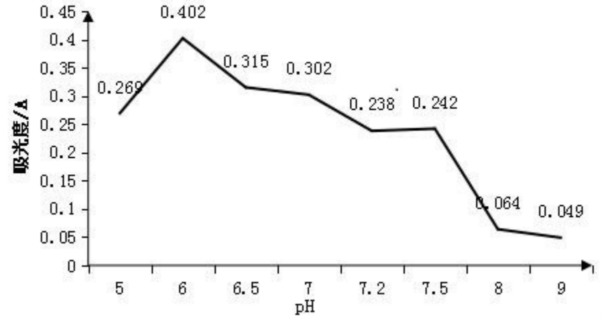

图 1 pH 值对桑叶 PPO 活性的影响

2.2 温度对桑叶 PPO 活性的影响

如图 2 可知，桑叶 PPO 的最适温度为 40℃，当 20~40℃时，随着温度的升高桑叶的 PPO 活性上升，上升幅度达到了 53%；当 40~70℃时，桑叶 PPO 活性慢慢下降，下降了 92%，温度为 70℃时酶活性降至 0.019U。故最适温度为 40℃。

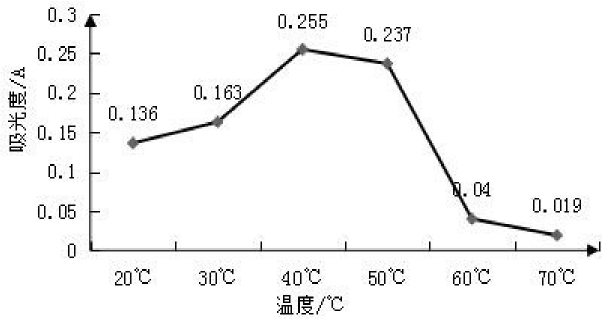

图 2 温度对桑叶 PPO 活性的影响

2.3 桑叶 PPO 活性的稳定性

2.3.1 温度对桑叶 PPO 活性的稳定性测试。由图 3 可得，为保证在最短的时间内最大限度地抑制桑叶中酶的活性，以减少高温对营养活性 PPO 的活性保留率随着温度的升高而逐渐下降，其在 20℃ 的条件下处理 10 min 后稳定性最强。温度分别为 30、40、50、60、70℃ 时，可以有效抑制 PPO 活性。另外，70 ℃下桑叶的 PPO 的活性损失非常严重，几乎无保留。

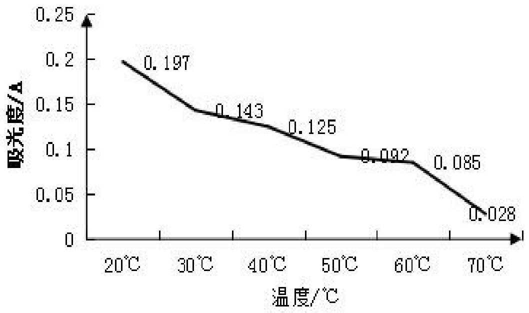

图 3 温度对桑叶 PPO 活性的稳定性测试

2.3.2 pH 值对桑叶 PPO 活性的稳定性测试。如图 4 可知，桑叶 PPO 的最适 pH 值为 6. 0，当 pH 值 5. 0～7. 0 时，桑叶 PPO 活性随着 pH 值得升高而升高，呈现一个上升趋势，上升了 20%；当 pH 值 7.0～8.0 时，桑叶 PPO 活性慢慢下降，下降了 55%，pH 值为 8.0 时酶活性降至 0.0145U。

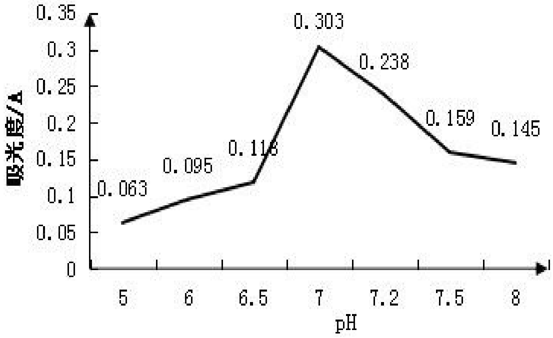

图 4 pH 值对桑叶 PPO 活性的稳定性测试

2.4 抑制剂对桑叶 PPO 活性的影响

2.4.1 抗坏血酸对桑叶 PPO 活性的影响。由图 5 可知，抗坏血酸对桑叶 PPO 抑制作用明显，当抗坏血酸的浓度在 0.2～0.6mmoL/L 范围内，随着抑制剂浓度的增加，酶的活性降低，抗坏血酸的浓度从 0.6mmoL/L 对桑叶 PPO 抑制作用开始缓慢，抗坏血酸的浓度在 0.6mmoL/L 是抑制率达到了 86%。

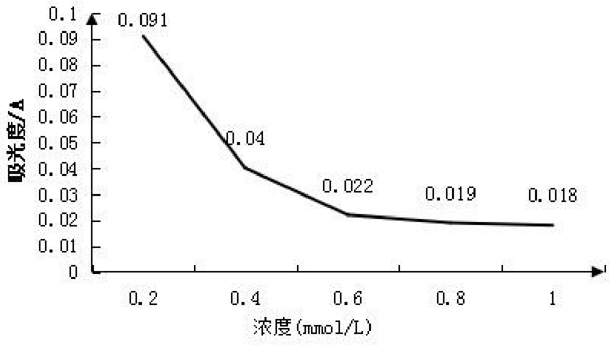

图 5 抗坏血酸对桑叶 PPO 活性的影响

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4.2　柠檬酸、亚硫酸钠对桑叶PPO活性的影响。由图6可知，柠檬酸、亚硫酸钠对桑叶PPO都有一定的抑制作用，亚硫酸钠的抑制作用较柠檬酸明显，当亚硫酸钠和柠檬酸的浓度在0.01～0.1mmoL/L范围内，随着抑制剂浓度的增加，酶的活性降低较快，亚硫酸钠的浓度在0.1mmol/L时，抑制率达到87%，柠檬酸的浓度在0.1mmoL/L时，抑制率达到80%。当抑制剂浓度超过0.1mmoL/L以后，抑制作用变缓。

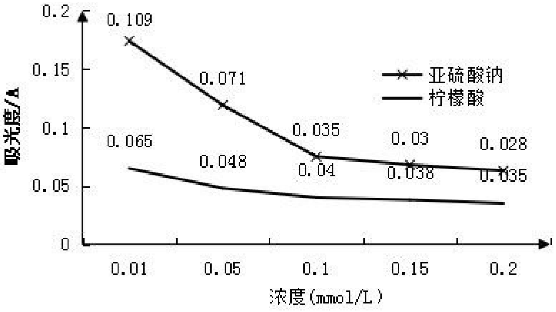

图6　柠檬酸、亚硫酸钠对桑叶PPO活性的影响

2.5　激活剂对桑叶PPO活性的影响

2.5.1　蔗糖、硼酸和硝酸铝对桑叶PPO活性的影响。由图7可知，蔗糖、硼酸和硝酸铝对桑叶PPO都有一定的激活作用，蔗糖的激活作用较硼酸和硝酸铝明显，当三者的浓度在0.01～0.1mmoL/L范围内，随着激活剂浓度的增加，酶的活性增加较快，硼酸的浓度在0.1mmoL/L时激活率达到88%，蔗糖的浓度在0.1mmoL/L时激活率达到75%，硝酸铝的浓度在0.1mmoL/L时激活率达到73%。当激活浓度超过0.1mmoL/L以后，激活作用变缓。

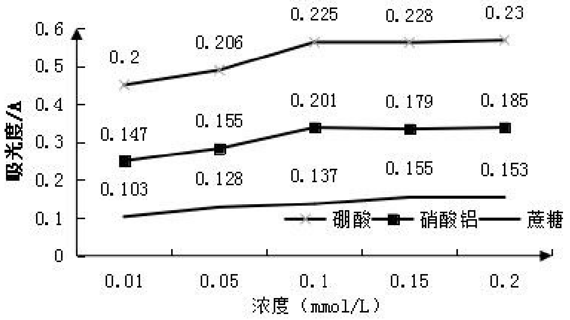

图7　蔗糖、硼酸和硝酸铝对桑叶PPO活性的影响

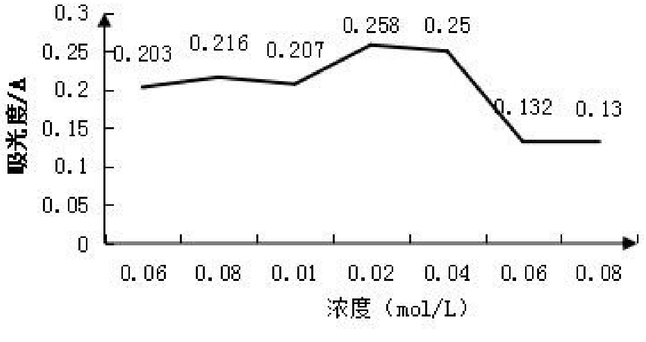

图8　底物浓度对桑叶PPO的影响

2.6　底物浓度对桑叶PPO活性的影响

由图8可知，从0.006～0.02moL/L时，桑叶PPO活性随着浓度上升而之间上升，呈现一个正比的趋势，上升了78%；从0.02～0.08moL/L时，桑叶PPO活性随着浓度上升而逐渐下降，下降了50%。所以最适的底物浓度为0.02moL/L的焦性没食子酸。

3　结论

通过对桑叶多酚氧化酶活性的研究发现，不同条件下对桑叶PPO活性的影响不同，PPO活性的最适温度为40℃，当温度升高至70℃处理2min能明显抑制酶的活性，可把70℃作为控制发生酶促褐变的关键因素和温控指标；pH值对桑叶PPO活性的影响比较明显，通过调节反应体系pH值可抑制桑叶酶促褐变的发生，其酶活性最适的pH值为6.0，升高或降低pH均降低酶的活性；最适底物浓度为0.02moL/L的焦性没食子酸；在桑叶PPO活性的稳定性测试中，当pH值<6.5、pH值>7.2时，桑叶PPO的活性明显受到抑制；在对桑叶PPO活性的稳定性测试中，短时间高温(70℃)处理明显地抑制桑叶PPO的活性；进一步研究表明，蔗糖、硫酸铝和硼酸溶液对桑叶PPO活性有一定激活作用，硼酸的浓度在0.1mmoL/L时激活率达到88%，蔗糖的浓度在0.1mmoL/L时激活率达到75%，硝酸铝的浓度在0.1mmoL/L时激活率达到73%；抗坏血酸、柠檬酸、亚硫酸钠对桑叶PPO活性有一定抑制作用，亚硫酸钠的浓度在0.1mmoL/L时抑制率达到87%，柠檬酸的浓度在0.1mmoL/L时抑制率达到80%，抗坏血酸的浓度在0.6mmoL/L是抑制率达到了86%。抑制剂和激活剂有明显影响酶的活性，且存有明显的剂量效应。本研究为桑叶的开发以及桑叶PPO的利用提供了依据。

参考文献

[1] 李荣林，方辉遂.一个世纪以来对多酚氧化酶研究的进展[J].福建茶叶，1997(4)

[2] 谢春艳，宾金华，陈兆平.多酚氧化酶及其生理功能[J].生物学通报，1999(6)

[3] 代丽，宫长荣，史霖等.植物多酚氧化酶研究综述[J].中国农学通报，2007(6)

[4] Siraprapa Mahanil,Jutharat Attajarusit,Michael J.Stout,et al.Overexpression of tomato polyphenol oxidase increases resistance to common cutworm [J].Plant Science,2008,174 (4):456-466.

[5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(第一部) [M].北京:中国医药科技出版社, 2010.Chinese Pharmacopoeia Commission.Pharmacopoeia of the People's Republic of China (part I) [M].Beijing:China Medical Technology Press,2010.

[6] 周吉银，王稳，周世文.桑药用资源的降糖作用机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志，2010(11)

[7] 王清，王蒂.温度、pH对马铃薯多酚氧化酶活性的影响[J].中国马铃薯，2003(3)

[8] 叶梅.植物组织褐变的研究进展[J].重庆工商大学学报，2005(14)

[9] 黄涛.桑叶多酚氧化酶分离纯化及其酶学性质的研究[D].广西大学，2008

[10] 孙小静，刘军，邹宇晓等.桑叶多酚氧化酶和过氧化物酶的酶学特性[J].Science of Sericulture.2014(5)

(责任编辑　王蔓)

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net