

藕带过氧化物酶的分离纯化及酶学性质

Studies on purification and properties of peroxidase in lotus sprout

邓波 邓放明

DENG Bo DENG Fang-ming

(湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南长沙 410128)

(College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

摘要: 研究藕带中过氧化物酶(POD)的提取和纯化技术,以及温度、pH 值和部分化学物质对 POD 酶活性的影响。结果表明:藕带中的过氧化物酶提取物经过 40% 饱和度的硫酸铵除杂、80% 饱和度的硫酸铵沉淀、DEAE-52 纤维素柱层析(100 mL, 0.1 mol/L NaCl 的 pH 7.2 的磷酸缓冲溶液洗脱)、葡聚糖凝胶 G-75 柱层析(pH 7.2 的磷酸缓冲溶液洗脱)进行分离纯化后,经 SDS—PAGE 鉴定为单一带,其分子量约为 42 kD,纯化倍数及蛋白质产率分别为 32.68 倍和 2.11%。藕带中 POD 的最适温度为 40 °C,最适 pH 值为 5.0。温度高于 80 °C 基本失活,pH 值小于 2.0 或大于 8.0 也基本失活。抗坏血酸对 POD 有明显的抑制作用;尿素、SDS、KSCN 对 POD 具有轻微的抑制作用;草酸在低浓度时对 POD 具有激活作用,高于 0.01 mol/L 时有明显的抑制作用。

关键词: 藕带;过氧化物酶;分离纯化;酶学性质

Abstract: Study on peroxidase (POD) extraction and purification technology of lotus sprout, as well as temperature, pH value and part of the chemical's impact on POD enzyme activity. Peroxidase from the lotus root was purified using ammonium sulfate precipitation, DEAE-52 and G-75 column chromatography, SDS-PAGE analysis showed that the purified POD had a single polypeptide with a molecular weight is about 42 kD, the final purification fold and protein yield were 32.68 and 2.11%, respectively. The POD of the optimum temperature and pH were 40 °C and 5.0. At a temperature higher than 80 °C and pH value of less than 2.0 and greater than 8.0 were basically undetectable activity. Ascorbic acid obvious inhibited POD activity, SDS and KSCN had a slight inhibitory effect on POD activity, and oxalic acid enhanced POD activity at low concentration, significantly inhibited more than 0.01 mol/L.

作者简介: 邓波,男,湖南农业大学在读硕士研究生。

通讯作者: 邓放明(1962—),男,湖南农业大学教授,博士。

E-mail: fmdenghnau@sina.com

收稿日期: 2015-12-07

Keywords: lotus sprout; POD; purification; enzymatic property

藕带又称藕尖、藕稍、藕鞭,是莲藕(*Nelumbo nucifera Gaertn.*)幼嫩的根状茎,是由顶端的几个节点和顶芽组成,会逐渐生长发育成藕^[1]。过氧化物酶(oxidase, POD)广泛地存在于植物组织中,能够催化由过氧化氢参与的各种氧化反应,导致植物组织褐变^[2-5],影响其外观和风味^[6-7]。

近年来,国内外对于番薯^[8]、莲藕^[9]、甘薯叶^{[10]10-20}、苦瓜^[11]、荔枝果皮^[12]、蕹菜叶片^[13]、苹果^[14]、水芹菜^[15]等果蔬 POD 的分离纯化和酶学性质进行了大量研究,结果表明:不同类别和品种果蔬的 POD 性质差异较大。而关于藕带中 POD 分离纯化及其性质研究还未见报道,本试验拟以藕带为原料,采用硫酸铵沉淀和柱层析方法提取和纯化其过氧化物酶,并对其酶学性质进行研究,为了解藕带采后褐变原因和制定褐变预防措施提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与试剂

新鲜藕带:购自湖南岳阳华容县;

氢氧化钠、氯化钠、碳酸氢钠、碳酸氢二钠、过氧化氢、愈创木酚、硫酸铵、考马斯亮蓝 G-250、乙醇、磷酸、葡聚糖凝胶 G-75、DEAE-52、牛血清蛋白:分析纯,市售。

1.2 试验仪器

可见分光光度计:WF J 7200 型,尤尼柯(上海)仪器有限公司;

高速冷冻离心机:Centrifuge 5804 R 型,艾本德中国有限公司;

电子天平:CP214 型,上海奥豪斯仪器分析有限公司;

电热恒温水浴锅:YLJYE-100 型,北京市永光明医疗仪器厂;

冷冻干燥机:FB-1B 型,北京博医康实验仪器有限公司;

电冰箱:BCD-175KA M 型,青岛海尔股份有限公司;

移液枪:AJ50585型,广州吉尔森仪器贸易有限公司;
电泳仪器:DYY-6C型,北京六一仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 POD粗酶液的提取 取新鲜的藕带用蒸馏水洗净,切成碎块并置于研钵中,加入两倍藕带体积的0.05 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.2),研磨均匀后,于4℃浸提4 h。将酶液转移到离心管中,于4℃,10 000 r/min离心15 min,收集上清液作为粗酶液。

1.3.2 POD活性测定 采用分光光度法。在1 cm的比色皿中,加入0.05 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.0)2.775 mL,再加入4%愈创木酚0.1 mL、1%过氧化氢0.1 mL,迅速加入POD粗酶液0.025 mL,混匀。于470 nm波长处测定吸光度,每15 s记录1次吸光度(OD_{470})。一个酶的活力单位定义是:在测定条件下,每分钟所引起的吸光度的改变0.001所需要的酶量。

1.3.3 可溶性蛋白质含量的测定 采用考马斯亮蓝G-250比色法。

1.3.4 POD的纯化

(1) 硫酸铵盐析:取POD粗酶液100 mL,边搅拌边加入硫酸铵固体至40%的饱和度,静置10 min,然后置于4℃冰箱内,静置30 min。于4℃,10 000 r/min离心30 min。在收集的上清液中,缓慢加入硫酸铵固体至80%的饱和度,静置10 min,再置于4℃冰箱内,静置30 min。于4℃,10 000 r/min离心30 min,弃上清液,沉淀用pH 6.0、0.05 mol/L的磷酸缓冲液进行溶解。于4℃,10 000 r/min离心30 min,取上清液于4℃透析24 h,得经初步纯化的POD酶液。

(2) DEAE-52纤维素阴离子交换层析:将经初步纯化的POD酶液加入到DEAE-52纤维素阴离子层析柱。装柱后,先用pH 7.2、0.05 mol/L的磷酸缓冲液平衡层析柱。每次上样量为5 mL,用0.1、0.2、0.3 mol/L NaCl的磷酸缓冲液进行梯度洗脱(每个梯度洗脱剂为100 mL),流速控制在0.5 mL/min,每5 mL收集一管。测定每管的蛋白含量和POD活性,并收集活性高的酶溶液,透析、冷冻干燥后进行下一步凝胶层析。

(3) 葡聚糖凝胶G-75层析:将冷冻干燥后的酶用超纯水溶解,上葡聚糖凝胶G-75凝胶层析柱。装柱后,先用pH 7.2、0.05 mol/L的磷酸缓冲液平衡,每次上样量为2 mL,用pH 7.2、0.05 mol/L的磷酸缓冲液进行洗脱,流速为0.2 mL/min,每管收集3 mL,测定每管蛋白含量和POD活性,并收集活性较高部分的洗脱液。透析后冷冻干燥得到POD纯品,供电泳及酶学性质研究。

(4) POD的纯度鉴定:采用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行POD的纯度鉴定。

1.3.5 POD酶学性质研究

(1) 最适温度:取pH 7.2、0.05 mol/L的磷酸缓冲液2.775 mL,分别于20、30、40、50、60、70、80℃恒温水浴处理

15 min,然后加入过氧化氢0.1 mol,愈创木酚0.1 mol,酶液0.025 mol,于常温下测定POD活性。

(2) 热稳定性:将POD酶液分别于30、40、50、60、70、80℃恒温水浴处理1 h后,再于室温下测定POD活性。

(3) 最适pH值:分别在pH 2~8的磷酸缓冲液中,加入酶液,于最适温度下测定在不同pH值的POD活性。

(4) 酸碱稳定性:将POD酶液分别置于pH值2~8的缓冲液中,4℃下保存24 h后,于最适温度下测定不同pH值的POD活性。

(5) 化合物对POD活性影响:分别将抗坏血酸、SDS、尿素、KSCN、草酸5种化合物配置成0.1 mol/L的溶液,取0.1 mL于试管中,加入pH 7.2、0.05 mol/L的磷酸缓冲液2.775 mL,1%过氧化氢0.1 mL,4%愈创木酚0.1 mL混匀,立即加入酶液0.025 mL,于25℃反应30 min,在最适温度下测定POD活性。其活力大小以相对酶活性(与无相应化合物时酶活性的百分比)来表示。

2 结果与分析

2.1 藕带POD分离纯化试验结果

预试验结果表明,在硫酸铵饱和度为40%时,藕带POD粗酶液沉淀的蛋白质最少,而硫酸铵饱和度为80%时沉淀的蛋白质最多,且POD活性最高。所以蛋白质除杂时硫酸铵的饱和度控制在40%,有效蛋白质沉淀时硫酸铵的饱和度控制在80%。

硫酸铵分级沉淀和透析后所得的藕带POD酶液,经DEAE-52纤维素离子交换层析,所得结果见图1。

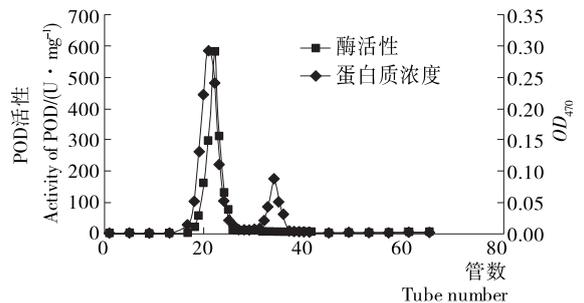


图1 POD的DEAE-52阴离子树脂洗脱图

Figure 1 Elution profiles from a DEAE-52 column for POD

由图1可知,第20管洗脱液的蛋白质含量和POD酶活性最高,表明POD主要存在于第20管洗脱液中。第35管洗脱液出现一个较小的蛋白质吸收峰,但基本没有POD酶活性,表明第35管洗脱液中含有少量蛋白质,但不是POD。从POD比活性(表1)可以看出,经过DEAE-52纤维素阴离子交换层析后,藕带POD酶活性比粗酶提高了15.02倍,蛋白质的产率为5.13%。

收集上述的酶活最高的POD,经葡聚糖凝胶G-75进行层析分离,结果见图2。

由图2可知,第5管洗脱液出现一个较小的蛋白质吸收峰,但是基本没有POD活性,表明第5管洗脱液中含有少量

蛋白质,但不是 POD。第 15 管洗脱液的蛋白质含量高而且 POD 活性高,表明 POD 主要存在于第 15 管洗脱液中。从 POD 比活性(表 1)可以看出,经过葡聚糖凝胶 G-75 的层析后,藕带中 POD 的比活性达到了 1 272.74 U/mg,比粗酶活性提高了 32.68 倍,蛋白质的产率为 2.11%。

2.2 藕带 POD 纯度检测和分子测定结果

葡聚糖凝胶 G-75 分离纯化后的酶液进行 SDS—PAGE 凝胶电泳,结果见图 3。由图 3 可知,藕带中的 POD 为清晰

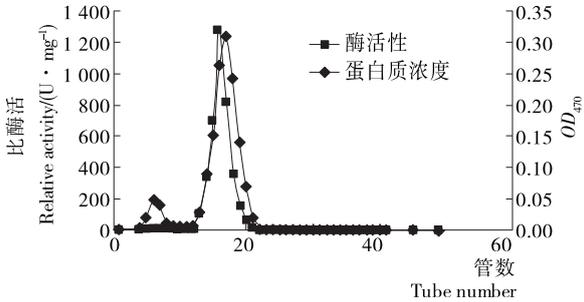
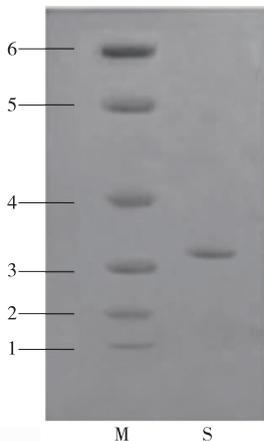


图 2 POD 的葡聚糖凝胶 G-75 柱层析洗脱图
Figure 2 Elution profiles from a sephadex G-75 column for POD

表 1 藕带 POD 的纯化效果表

Table 1 Purification of POD from lotus sprout

纯化步骤	蛋白质含量/mg	总活性/U	比活性/(U · mg ⁻¹)	纯化倍数	蛋白产率/%
提取粗酶液	172.16	6 705.60	38.95	1.00	100.00
硫酸铵沉淀	42.97	6 427.02	149.57	3.84	24.96
DEAE-52 层析	8.83	5 165.82	585.03	15.02	5.13
葡聚糖凝胶 G-52 层析凝胶	3.64	4 632.70	1 272.74	32.68	2.11



S. 藕带 POD M. 相对分子量标准品 1. 磷酸化酶 97.0 kD 2. 牛血清白蛋白 66.2 kD 3. 卵清蛋白 45.0 kD 4. 牛碳酸酐酶 31 kD 5. 胰蛋白酶抑制剂 20.1 kD 6. 溶酶菌 14.0 kD

图 3 藕带中过氧化物酶的 SDS—PAGE 的电泳图谱

Figure 3 Electrophoretogram of POD from lotus sprout on SDS—PAGE

的单一条带,表明藕带中的 POD 为单一的蛋白质组分,其分子量约为 42 kD,试验结果还表明上述藕带 POD 的纯化工艺是可行的。

2.3 POD 酶学性质研究结果

2.3.1 最适温度的确定 由图 4 可知,温度在 20~40 °C 时,藕带 POD 酶活性随温度的升高而升高,40 °C 时酶活性最高,之后 POD 酶活性随着温度的升高而降低,达到 80 °C 时,POD 基本失活。在其他果蔬的研究中,POD 的最适温度为番薯 70 °C^[8],莲藕 35 °C^[9],甘薯叶 60 °C^[10]¹⁷,荔枝果皮 35 °C^[12]。藕带 POD 的最适温度与莲藕和荔枝果皮的相近,与番薯和甘薯叶的差异较大。

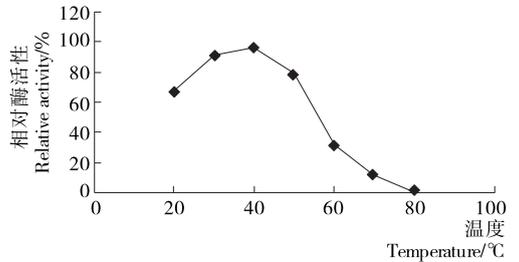


图 4 温度对 POD 活性的影响

Figure 4 Effect of temperature on activity of POD from lotus sprout

2.3.2 温度对 POD 的热稳定性的影响 由图 5 可知,POD 酶活性在 40~60 °C 时比较稳定,之后随着温度的升高酶活性迅速降低,80 °C 时已基本失活。在其他果蔬的研究中,番薯 POD 在 60 °C 时还能保持很高的活性^[8];莲藕 POD 在 20~50 °C 时酶的热稳定性比较好^[9];甘薯叶 POD 在 50 °C 还具有较高的酶活性,60 °C 以后酶活性开始降低^[10]¹⁷;荔枝果皮 POD 在 60 °C 时比较稳定,70 °C 后酶活性开始下降^[11];甘蔗苗 POD 在 55 °C 以上时酶活下降^[16]。藕带中 POD 的热稳定性与甘蔗苗、莲藕和甘薯叶的相似,与番薯、荔枝果皮中 POD 的有一定差异。

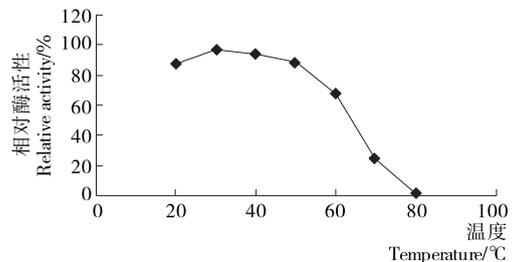


图 5 POD 的热稳定性

Figure 5 Stability of temperature of POD from lotus sprout

2.3.3 最适 pH 值的确定 由图 6 可知,当 pH 值在 2.0~5.0 时,藕带 POD 酶活性随着 pH 值升高而升高,5.0 时酶活性最高,之后 POD 酶活性降低;pH 值小于 2.0 或大于 8.0 时,POD 基本失活。在其他果蔬的研究中,POD 最适 pH 值为番薯 5.5^[8],甘薯叶 5.6^[10]¹⁸,荔枝果皮 6.5^[11],甘蔗苗 4.4^[16]。藕带 POD 的最适 pH 值与番薯和甘薯叶的相近,与荔枝果皮和甘蔗苗中的差异较大。

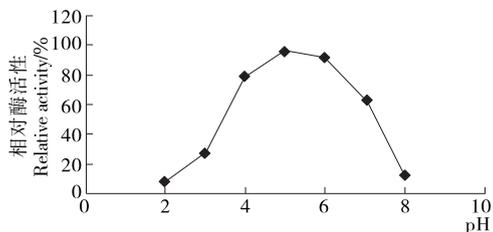


图6 pH对POD的活性的影响

Figure 6 Effect of pH on activity of POD from lotus sprout

2.3.4 pH值对POD酸碱稳定性的影响 由图7可知,藕带POD酶活性在pH值为5.0~8.0时比较稳定,pH值为2.0时不能检测出POD活性。在其他果蔬的研究中,番薯POD在pH值为6.0~10.0稳定性好^[8];莲藕POD在pH值为6.0~7.0时稳定性好^[9];甘薯叶^{[10]18-19}和荔枝果皮^[11]POD在pH值为4.0~8.0时稳定性好。藕带中POD的酸碱稳定性比莲藕碱性稳定性范围广,与番薯、荔枝果皮、甘薯叶的不同。

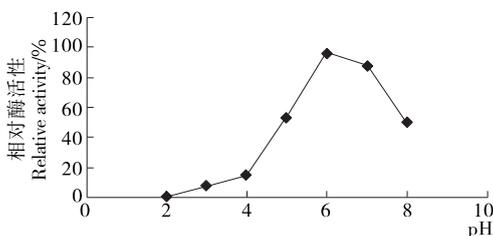


图7 POD的酸碱稳定性

Figure 7 pH stability of POD from lotus sprout

2.3.5 化合物对POD酶活性的影响 由图8可知,化合物种类及其浓度对藕带POD酶活性有不同的影响。草酸在低浓度时对POD活性有一定的激活作用,但随着浓度升高,草酸对POD活性表现出明显的抑制作用,达到0.03 mol/L时,酶活性被完全抑制;尿素、SDS、KSCN对POD活性均表现出轻微的抑制作用;抗坏血酸对POD活性有明显的抑制作用,在浓度为0.01 mol/L时能完全抑制酶的活性。

3 结论

本试验对POD的分离纯化以及酶学性质方面进行了研究。结果表明:藕带中POD的分子量约为42 kD,纯化倍数

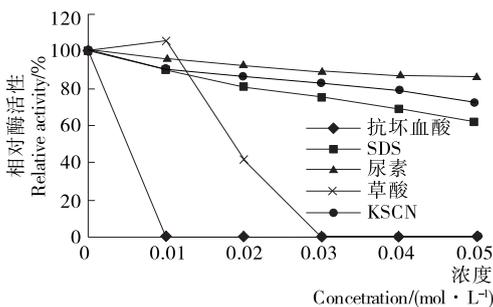


图8 化合物对藕带POD的影响

Figure 8 Effects of various compounds on activity of POD from lotus sprout

及蛋白质产率分别为32.68和2.11%。最适温度为40℃,最适pH值为5.0。温度高于80℃基本失活,pH值小于2.0或大于8.0也基本失活。抗坏血酸对POD有明显的抑制作用;尿素、SDS、KSCN具有轻微的抑制作用;草酸在低浓度时对POD具有激活作用,高于0.01 mol/L时有明显的抑制作用。

在过氧化氢存在的条件下,果蔬中的POD能够催化多种酚类物质氧化产生褐色物质,影响果蔬的风味。因此,果蔬中的POD与新鲜产品的风味和品质有关。新鲜的藕带保鲜可以考虑选择合适的pH值、温度以及结合使用不同的化合物抑制POD的活性,使藕带的褐变程度降到最低。本试验有助于进一步了解藕带中过氧化物酶的催化反应、本身的特性以及运输保鲜方法的研究,以便改进藕带运输和贮藏保鲜的方法。

参考文献

- [1] 刘玉蝶, 张长峰, 高梦祥, 等. 藕鞭褐变与软化的控制及其机理的研究[J]. 食品科技, 2007(5): 95-99.
- [2] Hamid M, Khaalil-ur-Rehman. Potential applications of peroxidases[J]. Food Chemistry, 2009, 115(4): 1 177-1 186.
- [3] 田国忠, 李怀方, 裘维蕃. 植物过氧化物酶研究进展[J]. 武汉植物学研究, 2001, 19(4): 332-344.
- [4] Walker J R, Ferrar P H. Diphenol oxidase, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance[J]. Biotechn. Gen. Eng. Rev., 1998, 15: 457-498.
- [5] 金定樑, 夏文水. 柠檬酸亚锡二钠对鲜切莲藕护色作用的研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(4): 129-132.
- [6] 张华, 董月强, 李星科, 等. 高密度二氧化碳技术对鲜切莲藕酶活性的影响[J]. 食品与机械, 2013, 29(1): 170-172.
- [7] 张慧君, 宋春丽, 李文娟, 等. 微波钝化马齿苋过氧化物酶活力的研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(3): 199-202.
- [8] 韩风, 谢恬. 番薯过氧化物酶的纯化及其性质研究[J]. 杭州师范大学学报, 2011, 10(3): 253-257.
- [9] 阙瑞琦, 张丽丽, 郭小路, 等. 莲藕过氧化物酶的分离纯化及性质研究[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2007, 29(12): 63-67.
- [10] 付伟丽, 唐云明. 甘薯叶过氧化物酶的分离纯化、部分性质及固定化研究[D]. 重庆: 西南大学, 2010.
- [11] 刘金磊, 苏涛, 李典鹏, 等. 苦瓜过氧化物酶的提取分离及性质测定[J]. 广西科学, 2007, 14(4): 407-410.
- [12] 庞学群, 段学武, 张昭其, 等. 荔枝果皮过氧化物酶的纯化及部分酶学性质的研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2004, 12(5): 449-454.
- [13] 王红扬. 蕹菜叶片过氧化物酶的分离纯化、酶学性质及固定化研究[D]. 重庆: 西南大学, 2015: 11-20.
- [14] 王倩, 刘伟, 刘成梅, 等. 苹果POD酶学性质及动态高压微射流对POD的影响[J]. 食品与机械, 2011, 27(2): 4-7.
- [15] 叶宏宇, 许学勤, 舒枝, 等. 软包装水芹菜绿保鲜工艺研究[J]. 食品与机械, 2013, 29(2): 163-166.
- [16] 何平, 施伟平, 傅雪琳, 等. 甘蔗苗过氧化物酶的分离、纯化及性质测定[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2003, 21(2): 131-134.