

文章编号: 1004 - 7271(2002)04 - 0353 - 04

乌贼墨多酚氧化酶的部分特性

江津津, 戚晓玉, 周培根

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

摘要:以乌贼墨为材料,用 0.05mol/L pH7.2 的磷酸盐缓冲液提取多酚氧化酶(PPO),30%~80%的硫酸铵分级沉淀后通过 DEAE-Sephrose CL-6B 层析柱分离,合并具有较高酶活性的洗脱液,透析、浓缩后用于酶的特性研究。通过金属离子对该酶活性影响的研究表明,在 mmol/L 水平,铜离子和铅离子对该酶具有强烈抑制作用,但铜离子在 20 μ mol/L 浓度时,对酶却有显著激活作用。在 mmol/L 水平,Na⁺、K⁺、Mg²⁺ 和 Ca²⁺ 对 PPO 活性无显著影响。在无机阴离子中 HSO₃⁻ 对酶活性有强烈抑制作用,在 10 mmol/L 时抑制效率达 100%,而 Cl⁻、Br⁻、I⁻ 和 SO₄²⁻ 则对 PPO 活性无显著影响。

关键词:多酚氧化酶(PPO);乌贼墨;酶促褐变

中图分类号:S986.2 **文献标识码:**A

Some properties of polyphenol oxidase from cuttlefish (*Sepia esculenta* Hoyle) ink

JIANG Jin-jin, QI Xiao-yu, ZHOU Pei-gen

(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Polyphenol oxidase (PPO) was extracted from cuttlefish ink with 0.05mol/L pH 7.2 sodium phosphate extraction buffer. The crude extract was fractionated with solid ammonium sulfate of 30% - 80% saturation. After dialysis and concentration, The enzyme solution was purified by DEAE-Sephrose CL-6B column chromatography and a 12.2 fold purification of PPO was obtained. Cu²⁺ and Pb²⁺ at level of mmol/L inhibited PPO activity while Na⁺, K⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺ have little effect on PPO activity, however PPO was apparently activated by Cu²⁺ at 20 μ mol/L. PPO activity was strongly inhibited by HSO₃⁻ and the activity was completely inhibited at 10mmol/L. Cl⁻, Br⁻, I⁻ and SO₄²⁻ have almost no effect on PPO activity.

Key words: polyphenol oxidase(PPO); cuttlefish ink; enzymatic browning

多酚氧化酶(polyphenol oxidase, 简称 PPO, E. C. 1.14.18.1)分布广泛,是果蔬褐变和甲壳类黑变的关键酶^[1,3]。乌贼墨中的多酚氧化酶活性很大^[4],许多学者已对其他物种中的多酚氧化酶的抑制剂、激活剂等进行过研究^[1-10],但目前对乌贼墨中多酚氧化酶的研究报道很少。实验主要研究金属离子对乌贼墨 PPO 活性的影响以及无机阴离子对该酶的效应。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

新鲜乌贼(金乌贼 *Sepia esculenta* Hoyle)购自上海当地市场,带回实验室后,迅速取墨囊中墨汁,4℃下保藏备用。

1.2 PPO 的提取及纯化

以下操作均在 4℃下进行。

主要参考 Chen 等^[2,8]和 Simpson and Marshall^[6,7]的方法并加以改进。取乌贼墨 50g,加 200 mL 0.05 mol/L pH7.2 的磷酸钠缓冲液(内含 1mol/L 的 NaCl 和 0.2% Brij35)提取,于 15,000g 离心 30min,取上清液,30%~80%的硫酸铵分级沉淀后,沉淀溶于少量缓冲液中并在相同溶液中透析,透析后在聚乙二醇(PEG)20,000 中浓缩,浓缩后的酶液采用 DEAE-Sepharose CL-6B 层析柱纯化。梯度洗脱后合并含高 PPO 活性的各管,同样进行透析并浓缩。

1.3 PPO 活性测定及蛋白质含量的测定

参考 Zhou^[1]和杨昌凤^[5]的方法并略加改动。

以 2.98mL5mmol/L 的多巴溶液为底物,加入 0.02 mL 酶液后混匀,分光光度计在波长 475nm 处测吸光度每分钟的变化。一个酶活力单位定义为:在 30℃,pH6.5 时每分钟引起 A_{475nm} 变化 0.001 所需的酶量。蛋白质含量的测定采用 Hartree 法以计算比活力^[11],标准蛋白质用牛血清白蛋白(BSA)。

1.4 金属离子对 PPO 活性的影响

酶液分别加入 Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺、Pb²⁺ 和 Co²⁺ 使其浓度达 5mmol/L,再加入底物溶液,30℃反应 2min,测定 PPO 活力。酶液中分别加入从 10μmol/L~10mmol/L 的不同浓度的 Cu²⁺,在冰浴中放置 30 min 后,立即加入底物溶液(预平衡到 30℃)。30℃反应 2min,测定 PPO 活力。

1.5 无机阴离子对 PPO 活性的影响

向底物溶液中加入 Cl⁻、Br⁻、I⁻、HSO₃⁻、SO₄²⁻ 使其浓度分别为 0.1 mmol/L、1 mmol/L、10 mmol/L、100 mmol/L。取上述各溶液 2.98 mL 分别再加入 0.02 mL 酶液,30℃反应 2min,测定 PPO 活力。

2 结果与讨论

2.1 乌贼墨 PPO 的提取与纯化结果

乌贼墨 PPO 的纯化步骤与效果见表 1。采用 DEAE-Sepharose CL-6B 柱层析,并用浓度为 0~1.0 mol/L 的 NaCl 进行梯度洗脱的洗脱曲线见图 1。图 1 中第一个蛋白峰的酶活力十分微弱,故将对应于第二个洗脱峰的各管合并再透析除盐,经此步骤,去除了 97% 的杂蛋白,,即得到较高纯度的 PPO 酶液。

表 1 乌贼墨 PPO 纯化结果

Tab.1 Purification of the cuttlefish ink PPO

纯化步骤	体积(mL)	总活力(u)	总蛋白含量(mg)	比活力(u/mg)	产率(%)	纯化倍数
粗酶液	170	573 750	242.64	2364.6	-	1
30%~80%硫酸 铵沉淀	38	384800	50.28	7653.1	67.1	3.24
透析除盐后浓缩						
DEAE-Sepharose CL-6B 柱层析						
主峰 I	28	4200	6.84	614	1.1	-
主峰 II	32	185600	6.43	28865	48.2	12.2

2.2 金属离子对酶活性的影响

不同的金属离子对酶活性的影响见图 2, 在 mmol/L 浓度水平, Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对 PPO 活性无显著影响。 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 对 PPO 活性有一定的抑制, 使酶活性降低到原来的 67% 和 59%, Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 对 PPO 活性的抑制最为强烈。

PPO 一向被认为活性中心含 Cu^{2+} [10], 但在 mmol/L 浓度水平, Cu^{2+} 对乌贼墨 PPO 活性却有抑制作用, 根据文献推测可能是铜离子浓度过高所致, 故以不同的铜离子浓度来探讨铜离子与 PPO 的关系[12]。实验结果见图 3, 在 $20\mu\text{mol/L}$ 的铜离子的作用下, PPO 的活力比原来提高 46%。在 $30\mu\text{mol/L}$ 的铜离子的作用下, 该酶的活力为原来的 104%。当铜离子浓度大于 $80\mu\text{mol/L}$ 时, 则开始表现出对活力的抑制, 所以乌贼墨 PPO 活性中心可能含铜离子。萧等人在 1989 年发现, 当铜离子浓度为 $11.25\mu\text{mol/L}$ 时, 对大头红虾 PPO 有最大的活化作用, 而高浓度的铜离子却对 PPO 有抑制作用[12]。

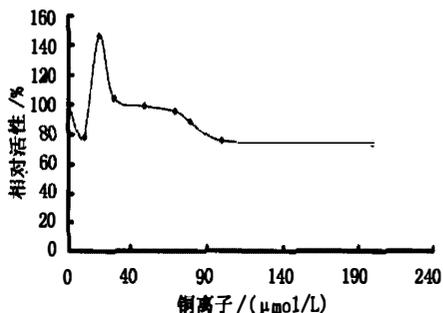


图 3 铜离子浓度对 PPO 活性的影响
Fig.3 Effect of the copper ion concentration on PPO activities

2.5 无机阴离子对 PPO 活性的影响

由图 4 可见, 在 mmol/L 水平, Cl^- 、 Br^- 、 I^- 和 SO_4^{2-} 对 PPO 活性无显著影响, 而 HSO_3^- 则表现出很强的抑制性, 0.1 mmol/L 浓度时即能使酶活丧失 30%, 10 mmol/L 时的抑制效率达到 100%, 表明 HSO_3^- 是 PPO 的强烈抑制剂。

多酚氧化酶抑制剂可用于红茶制造[13], 对乌贼墨 PPO 抑制剂、激活剂的研究, 可直接应用于防止食品不良褐变的保鲜和酶制剂的保藏, 同时也有助于探讨乌贼墨的研发和利用。

参考文献:

[1] Zhou P G, Smith N L, Lee C Y. Potential purification and some properties of Monroe apple peel polyphenol oxidase[J]. J Agric Food Chem, 1993, 41(4): 532 - 536.

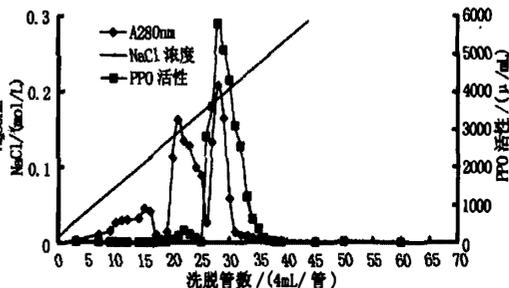


图 1 PPO 的 DEAE-Sepharose CL-6B 柱层析洗脱曲线
Fig.1 Elution profile of PPO from DEAE-Sepharose CL-6B column

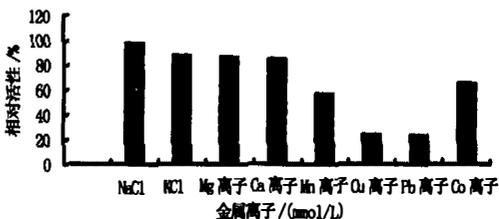


图 2 金属离子对 PPO 酶活的影响
Fig.2 Effect of metal ion on PPO activity

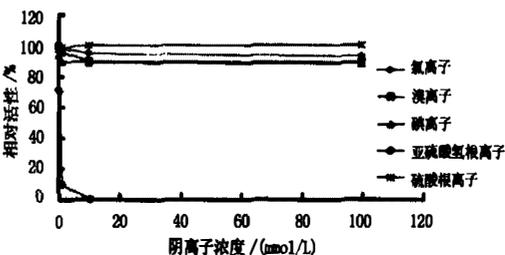
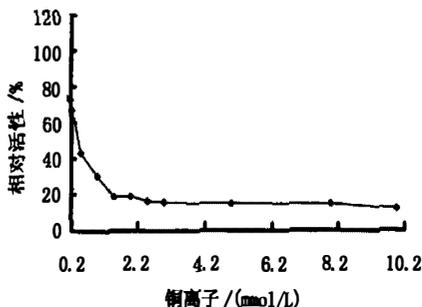


图 4 无机阴离子对 PPO 活性的影响
Fig.4 Effect of various inorganic anion on PPO activity

- [2] Chen J S, Rolfe R S, Marshall M R, et al. Comparison of Phenoloxidase activity from Florida Spiny Lobster and Western Australian Lobster[J]. *Journal of food science*, 1991, 56(1): 154 - 157.
- [3] Krol E S, Daniel C L. Photoprotective Actions of Natural and Synthetic Melanins[J]. *Chem Res Toxicol*. 1998, 11(12): 1434 - 1440
- [4] 松江一, 高谷芳名, 内泽秀光, 等. イカ墨を科学する[J]. *バイオサイエンスとインダストリ*, 1995, 53(5): 31.
- [5] 杨昌凤. 酪氨酸酶活性的微量分析[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1990, 17(3): 217 - 218.
- [6] Simpson B K, Marshall M R, Otwell W S. Phenoloxidase from Shrimp: Purification and Some Properties[J]. *J Agric Food Chem*, 1987, 35(6): 918 - 921.
- [7] Simpson B K, Marshall M R, Otwell W S. Phenoloxidase from pink and white Shrimp: Kinetic and other Properties[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 1988, 12: 205 - 217.
- [8] Chen J S, Charest D J, Marshall M R, et al. Comparison of Two Treatment Methods on the Purification of Shrimp Polyphenol Oxidase[J]. *J Sci Food Agric*, 1997, 75: 12 - 18.
- [9] 萧介夫, 朱惠玲, 孙宝年. 大头红虾酪氨酸酶异构酶的纯化[J]. *中国农业化学会志*, 1989, 27(3): 350 - 359.
- [10] 王君玲, 口如琴, 成 汇, 等. 马铃薯酪氨酸酶的部分纯化及理化性质的研究[J]. *山西大学学报*, 1995, 18(2): 184 - 189.
- [11] Hartree E F. Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method That Gives a Linear Photometric Response[J]. *Analytical Biochemistry*. 1972, (48): 422 - 427.
- [12] 萧介夫, 朱惠玲, 孙宝年. 大头红虾酪氨酸酶异构酶的生化特性[J]. *中国农业化学会志*, 1989, 27(3): 360 - 372.
- [13] 凌关庭. 天然食品添加剂手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000, 187 - 188.