

高灌蓝越橘多酚氧化酶的提取和纯化

杨 萌

(无锡轻工大学中央研究所, 无锡 214036)

B. Rovel M. M etche

(法国国立洛林理工学院应用生物化学实验室)

摘要 采用丙酮粉沉淀抽滤法、硫酸铵分级沉淀法及苯基琼脂糖疏水性层析法对高灌蓝越橘多酚氧化酶进行提取和纯化。在提取和纯化中,用加入不同的酚吸收剂和抑制剂并比较酶活性的高低来确认最佳方法。结果表明在粗提中加入酚吸收剂、增溶剂和抑制剂提取效果较好,苯基琼脂糖疏水性层析法对此类酶纯化效果较佳并为后来的辅酶的分离提供了较高的纯化倍数。

关键词 多酚氧化酶; 提取; 纯化; 丙酮粉; 疏水性层析; 酚吸收剂

中图分类号 TQ 925.9

0 前 言

较有效的提取高灌蓝越橘 (*Vaccyniun Corybosum* L.) 多酚氧化酶(PPO)的方法,是采用果实总体破碎经丙酮粉沉淀,在适量酚吸收剂、还原剂和抑制剂存在下,缓冲液提取活性酶,获得较高粗酶活性。经硫酸铵分级沉淀,苯基琼脂糖(PenlysepharoseCL4B)疏水性层析,纯化倍数最后可达19倍,再经聚丙烯酰胺电泳,结果可分出2个辅酶。而酶活性高低与其前期提取方法有很大关系,困难的是如何防止PPO的氧化失活反应的进行。笔者就前期提取和纯化方法进行了研究,旨在为从自然资源中提取酶提供一些方法。

1 材料和方法

1.1 材料

供试果实来自法国东部山区,采集于1994年7月,4℃下运到法国洛林理工学院(INP L)农业和食品工业高等联合学校(ENS A I A)的应用生化实验室,速冻于-30℃的冷库。

苯基琼脂糖(PenlysepharoseCL4B)由瑞典Pharmacia-LKB提供。

1.2 制备丙酮粉

操作前,-30℃的果实在4℃环境下解冻1h,随后的全部过程在4℃下操作。150g果实用200mL体积比80:20的丙酮-蒸馏水混合,由捣碎器(BraunM×32)粉碎,用100~160μm的石英板式过滤器抽滤,滤渣用-30℃的丙酮冲洗,冲洗后滤渣为丙酮和滤渣混合物,

既为丙酮粉,置于室温下晾干。

1.3 活性酶的提取

用 pH7.4 的磷酸缓冲液作为溶剂,将上述丙酮粉充分溶解,4℃ 下 19 700 r/min 离心 30 min,沉淀可再用 pH7.4 的磷酸缓冲液作为溶剂反复提取 1 次,合并 2 次离心后上清液,用氮气压膜式超过滤器浓缩,浓缩液为粗酶 E 1。

1.4 (NH₄)₂SO₄ 分级沉淀

200 ~ 900 g/L (NH₄)₂SO₄ 质量浓度进行 9 个分级,加入粗酶液中。在 0℃ 环境下静置 2 h, 48 400 r/min 离心 30 min,上清液再加入下一级的 (NH₄)₂SO₄ 浓度,静置,离心,测定每次沉淀的酶活性和蛋白含量。

1.5 疏水性层析

1.5.1 装柱 用蒸馏水、酒精、正丁醇、20% 的酒精使柱材料再生,缓冲液 A [50 mmol/L、NaH₂PO₄、pH6~8 含 1 mol/L (NH₄)₂SO₄、1 mol/L KCl] 平衡后加入 20 cm × 1.1 cm 柱中。

1.5.2 层析洗脱 已装柱好的 PenlysepharoseCL4B 柱,用高盐缓冲液 A 预平衡,9~10 mL 的酶液借助梯级蠕动泵 (Manipuls2, Gilson) 加在柱上,洗脱液以 0.5~1.5 mL/min 的流速,从高盐缓冲液 A 减弱至低盐缓冲液 B [10 mmol/L NaH₂PO₄、pH= 6.5 含 0.1 mol/L (NH₄)₂SO₄],最后以 50% 的乙二醇进行洗脱。层析状态由紫外监控器 (280 nm) 监控 (ISCO),调节分级收集器 (ISCO, Lincoln-Nebraska) 以流速 2.5~3 mL/min 收集。

1.6 酶活性测定

测定波长视底物而定,测定温度为 25℃,反应液由 800 μL、pH4 的柠檬磷酸缓冲液、测定底物 100 μL 和酶液 100 μL 组成,一个酶活力单位为测定条件下,每分钟引起光密度改变 0.001 所需的酶量^[1]。

1.7 蛋白质测定

LOWRY 法^[2],以牛血清蛋白为标准。

2 结果与讨论

2.1 多酚氧化酶 (PPO) 的提取

果实中存在大量酚底物、低蛋白含量及高浓度的果胶物质,这些都是造成多酚氧化酶难提取、低活性的原因^[3]。笔者采用过不同的提取方法,但在提取过程中酶活性很易丧失,在制备丙酮粉时,用还原剂抗坏血酸可还原一部分醌,保护一部分在反应中失活的酶。用某些酚作吸收剂,如:聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、聚二乙烯吡咯烷酮 (PVPP)、聚乙二醇 (PEG) 也同样可以增加 PPO 的活性^[4,5]。报道指出^[6],在大多数情况下,PPO 在植物体中是与细胞内的线粒体和叶绿体的膜结合在一起的形式存在,我们在制备丙酮粉和提取酶时分别用了丙酮、TritonX-100 增加膜的溶解性,提高 PPO 的提取效率^[1,6]。结果见表 1。

表1 多酚氧化酶(PPO)的提取方法比较

200 mL 提取液 所加化合物	10 g 丙酮粉溶于 pH7.4 的缓冲液中所加化合物	粗酶比活力/ (MU/g)
TritonX-100 3 mL	PVPP 10 g	0.800
抗坏血酸 3 g	TritonX-100 3 mL+ PVPP	0.935
聚乙二醇 50 g	TritonX-100 3 mL	1.500
聚乙二醇 50 g 抗坏血酸 3 g	TritonX-100 3 mL, 半胱氨酸 0.6 g	2.496

从表 1 中可以看出在提取液中加入聚乙二醇和抗坏血酸, pH7.4 的缓冲液中加入 TritonX-

100、半胱氨酸获得粗酶比活力最高, 其中半胱氨酸可以还原醌成为含氧二酚化合物, 也可以直接抑制PPO, 在提取物加入中半胱氨酸是很必要的。

2. 2 硫酸铵分级沉淀

用200~900 g/L 的饱和硫酸铵浓度分级沉淀粗酶, 同时测定离心后上清液和沉淀物中的酶活性及蛋白含量, 见图1, 可以看出在400~900 g/L 的饱和硫酸铵浓度沉淀时, 其酶活性大部分在这个区间内, 而小于300 g/L 饱和硫酸铵含较多的杂蛋白, 我们选择300~400 g/L 浓度的饱和硫酸铵一次性沉淀去除杂蛋白和一部分杂质, 同时保持较高的酶活性。

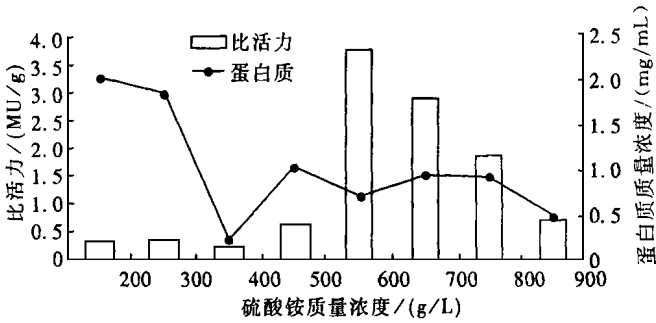


图1 沉积物中的酶活性及蛋白含量的关系

2. 3 疏水性层析

硫酸铵浓度分级沉淀粗酶后的酶液, 可作为E2, 加到层析柱上, PPO从层析柱上洗脱状态如图2所示, 以高盐缓冲液A 和低盐缓冲液B 为洗脱液形成一个盐浓度梯度进行洗脱, 收集全部试管测定酶活力, PPO 的活性与其紫外吸收峰之间关系见图2. 从图2可看出, PPO 的活性存在于第3个紫外吸收峰值内, 在低盐强度下呈单峰洗脱下来. 前两峰为杂蛋白和果胶, 最后还有一些已褐变的二酚物质可牢固结合在层析材料上, 这些可被50% 的乙二醇移走, 收集在26~30号的试管中。

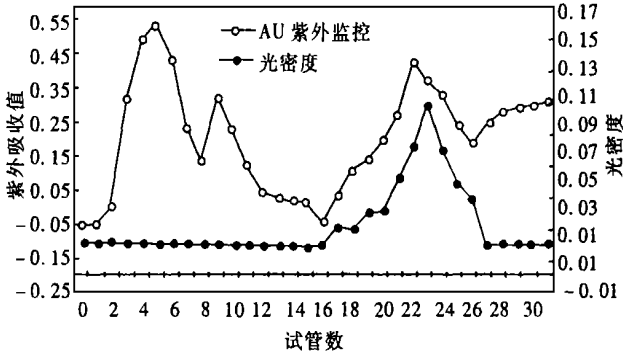


图2 PPO 的活性与其紫外吸收峰之间关系

疏水性层析曾被认为是快速、不变性、有效的多酚氧化酶纯化方法, 曾有报道^[1] 苹果的多酚氧化酶用此方法可纯化161倍, 纯化倍数的高低取决于提取方法和层析条件, 在这项实验中, PPO 可纯化19倍, 见表2. 并在此之后的聚丙烯酰胺电泳中, 由 FARIND 等人成功的分出2个辅酶。

表2 PPO 提取、纯化的酶活力比较

提取和纯化	比活力/ (M U / g)	纯化倍数	回收效率/ %
粗酶	2. 496	1	100
硫酸铵沉淀后透析液	3. 510	1. 5	95
层析后透析液	44. 675	18. 7	49

3 结 论

在比较不同的提取方法后, 发现在制备丙酮粉并加入酚吸收剂 PEG、还原剂抗坏血酸在溶剂中, 加 TritonX-100和半胱氨酸在 pH7. 4的缓冲液中提取活性酶是有效的。在硫酸铵分级沉淀中, 用30%~40% 饱和硫酸铵溶液一次性沉淀去除杂蛋白和部分杂质, 用 Phenyl-SepharoseCL-4B 疏水性层析可有效的去掉杂蛋白和果胶, 同时50% 的乙二醇可移走牢固结

合在层析材料上的物质, PPO 可纯化19倍, 回收效率在49%, 并在此之后的聚丙烯酰胺电泳中, 可成功地分出2个辅酶。

致 谢

在此感谢无锡轻工大学丁霄霖教授的指导。

参 考 文 献

- 1 Kancsi G. Contribution a l'étude de l'inhibition du brunissement enzymatique des vegetaux par les composés a fonction thiol, [mémoire de DEA] France Nancy: en sciences agronomiques présente a l'INPL, 1992
- 2 Lowry oH. Protein measurement with the phenol reagent. J Biol Chem, 1951, 193(38): 66
- 3 Janovitz-Klapp A H, Richard F, Nicolas J. Polyphenol oxidase from apple, partial purification and some properties, Phytochemistry, 1989, 2903 ~ 2907
- 4 Wesche-Ebeling P A, Montgomery-Morris W. Strawberry polyphenol oxidase: extraction and partial characterization. J Food Sci, 1990b, 55: 1320
- 5 Vámos-Vigyazo L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. Critical Review Food Sci and Nutr, 1981, 15: 49
- 6 Wesche-Ebeling P A, Montgomery-Morris W. Strawberry, polyphenol oxidase: Purification and characterization. J Food Sci, 1990a, 55: 1315

Purification and Extraction of Highbush Blueberry Polyphenol Oxidase

Yang Meng

(Research Center Institute, Wuxi University of Light Industry Wuxi 214036)

B. Rovel M. Metche

(Institut National Polytechnique de Lorraine, Laboratoire de Biochimie Appliquée)

Abstract This paper describes an acetone powder method for the extraction of polyphenol from blueberry fruits. The enzyme was further purified by using ammonium sulfate fractionation and hydrophobic chromatography on Phenylsepharose CL4B. To find the best method, different kinds of phenolic adsorbents and inhibitors have been used in the extraction and purification process. The results show that the activity of the polyphenol can be increased by adding the agent and the phenolic adsorbents in the extracting media. The PPO has been purified 19-fold by using hydrophobic chromatography on Phenylsepharose CL4B and it has provided a high purification rate for the isoenzymes.

Key words polyphenol oxidase; extraction; purification; acetone powder; hydrophobic chromatography; phenolic adsorbents

(责任编辑:陈 娇)