

DOI:CNKI:61-1390/S.20120223.1721.003

网络出版时间:2012-02-23 17:21

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120223.1721.003.html>

# 牡丹多酚氧化酶的酶学特性

陈 静,符真珠,王 政,何松林

(河南农业大学 林学院,河南 郑州 450002)

【摘 要】 【目的】研究影响牡丹试管苗多酚氧化酶(PPO)酶学特性的因素,为牡丹的高效组培提供参考。【方法】以牡丹品种“乌龙捧盛”为供试材料,采用分光光度计比色法,研究温度、pH 值、PPO 提取液添加量及底物的类型和浓度对牡丹 PPO 活性的影响。【结果】以邻苯二酚为底物时,牡丹 PPO 的最适反应温度与最适 pH 分别为 25 ℃ 和 6.0,最适 PPO 提取液添加量为 1 mL。牡丹 PPO 的最适作用底物为咖啡酸,其最适浓度为 0.08 mol/L。【结论】通过选择合适的 pH 值和培养温度,同时结合化学抑制剂调控牡丹 PPO 活性,可以达到在牡丹组织培养中减少褐化现象、提高试管苗生根率的目的。

【关键词】 牡丹;多酚氧化酶;酶学特性

【中图分类号】 S685.110.4<sup>+</sup>3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)03-0154-04

## Study on characteristics of polyphenol oxidase in peony

CHEN Jing,FU Zhen-zhu,WANG Zheng,HE Song-lin

(College of Forestry, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

**Abstract:** 【Objective】 The research aimed to study the influence factors of the polyphenol oxidase characteristics of peony plantlet *in vitro*. 【Method】 With cultivar of “Wulongpengsheng” as experimental materials, the effects of temperature, pH value, PPO content, substrate type and concentration on PPO activity of *Paeonia suffruticosa* Andr were studied using spectrophotometry method. 【Result】 With catechol as substrate, the optimum reaction temperature and pH respectively were 25 ℃ and 6.0, the optimal adding amount of PPO 1 mL, the optimum substrate of PPO coffee acid, and the optimum concentration of coffee acid 0.08 mol/L. 【Conclusion】 Browning phenomenon can be induced and the rate of tissue culture plantlets can be improved by selecting the appropriate pH, temperature, and combining with the chemical inhibitors to regulate and control peony PPO enzymatic activity.

**Key words:** peony plantlet; polyphenol oxidase; enzymology characteristics

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)是我国的国花,被誉为“国色天香”、“花中之王”,具有特殊的药用价值及较高的观赏和经济价值<sup>[1]</sup>。但在牡丹的组织培养过程中,褐化现象普遍发生,不利于外植体、继代植株的正常生长与分化增殖及愈伤组织的诱导等,严重时甚至可以造成整株腐烂死亡<sup>[2]</sup>。有研究表明,褐化现象是牡丹外植体受伤后,其体内释

放的酚类物质在多酚氧化酶(PPO)的作用下被氧化成醌类物质的结果<sup>[3]</sup>。目前,国内外学者已对苹果<sup>[4]</sup>、番红花<sup>[5]</sup>、鸭梨<sup>[6]</sup>等植物的 PPO 活性进行了研究,但关于牡丹 PPO 活性及其影响因素的研究尚未见报道。为此,本研究以牡丹品种“乌龙捧盛”为供试材料,探讨温度、pH 值、PPO 提取液添加量及作用底物的种类和浓度等因素对 PPO 活性的影响,

\* [收稿日期] 2011-10-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31071816)

[作者简介] 陈 静(1985—),女,河南固始人,在读硕士,主要从事园林植物生物技术研究。E-mail:498520842@qq.com

[通信作者] 何松林(1965—),男,河南淮阳人,教授,博士,博士生导师,主要从事园林植物生物技术研究。E-mail:hsl213@163.com

以期对牡丹的高效组织培养提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

供试材料为牡丹品种“乌龙捧盛”的鳞芽,于2011-02采自洛阳土桥花木种苗有限公司的牡丹苗木基地。将牡丹鳞芽灭菌后接种到MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L(pH 5.8)的固体培养基上,在温度 $(24\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 、光强 $36\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、光照时间 12 h/d 的条件下诱导培养 35 d 后,取无根试管苗作为备用材料。

主要试剂有 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、邻苯二酚、没食子酸、没食子酸甲酯、4-羟基苯甲酸、咖啡酸、莽草酸、三氯乙酸、聚乙烯吡啶酮(PVP)等,均为国产分析纯。

### 1.2 方 法

1.2.1 PPO 提取液的制备 取牡丹无根试管苗 0.5 g 剪碎,加入 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)研磨,研碎后于 $4^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 条件下离心 15 min,上清液即为牡丹 PPO 提取液。

1.2.2 牡丹 PPO 活性的测定 参照杨昌鹏等<sup>[7]</sup>的分光光度计比色法并略作修改,在试管中分别加入 1 mL 0.05 mol/L 邻苯二酚、3.9 mL 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)和 0.1 mL PPO 提取液,混合均匀后放入 $30^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中保温 10 min,用体积分数 20%三氯乙酸终止反应,并立即测定 525 nm 波长处的 OD 值。将 OD 值每 min 增加 0.001 所需的酶提取液量定义为 1 个酶活力单位(U)。测定重复 3 次。

1.2.3 温度对牡丹 PPO 活性的影响 向试管中依次加入 1 mL 0.05 mol/L 邻苯二酚、3.9 mL 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)和 0.1 mL PPO 提取液,混匀后分别放入 15,20,25,30,35,40,45,50,55 和 $60^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中保温 10 min,然后测定不同温度下的 PPO 活性。

1.2.4 pH 值对牡丹 PPO 活性的影响 取 1 mL 0.05 mol/L 邻苯二酚和 0.1 mL PPO 提取液,分别加入 3.9 mL pH 值为 4.0,4.5,5.0,5.5,6.0,6.5,7.0,7.5 和 8.0 的磷酸盐缓冲液中,在 $25^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中保温 10 min 后,测定不同 pH 值下的 PPO 活性。

1.2.5 牡丹 PPO 提取液添加量对其活性的影响 取 1 mL 0.05 mol/L 邻苯二酚和 3.9 mL 磷酸盐缓冲液(pH 6.0),分别加入 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,1.0,1.5,2.0 mL PPO 提取液,测定不同提取液添加量下的 PPO 活性。

1.2.6 不同底物对牡丹 PPO 活性的影响 各取 1 mL 0.05 mol/L 的邻苯二酚、没食子酸、没食子酸甲酯、4-羟基苯甲酸、咖啡酸和莽草酸,分别加入 3.9 mL 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)和 0.1 mL PPO 提取液,测定 PPO 活性。

1.2.7 底物浓度对牡丹 PPO 活性的影响 将 3.5 mL 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)和 1 mL PPO 酶提取液加入浓度分别为 0.01,0.02,0.04,0.08,0.10,0.14,0.18 mol/L 的咖啡酸(1 mL)中,测定不同浓度咖啡酸中的 PPO 活性。

## 2 结果与分析

### 2.1 温度对牡丹 PPO 活性的影响

由图 1 可见,牡丹 PPO 活性随着温度的升高呈先上升后下降的变化趋势。其中牡丹 PPO 活性在 $25^{\circ}\text{C}$ 时最高,说明其最适反应温度为 $25^{\circ}\text{C}$ 。

由图 1 还可见,温度为 $15\sim 25^{\circ}\text{C}$ 时,PPO 活性随着温度的升高逐渐增加,即使在 $15^{\circ}\text{C}$ 下仍有较高活性;而当温度高于 $25^{\circ}\text{C}$ 后,PPO 活性随着温度的升高快速下降。这可能与温度升高使酶蛋白发生了变性有关。

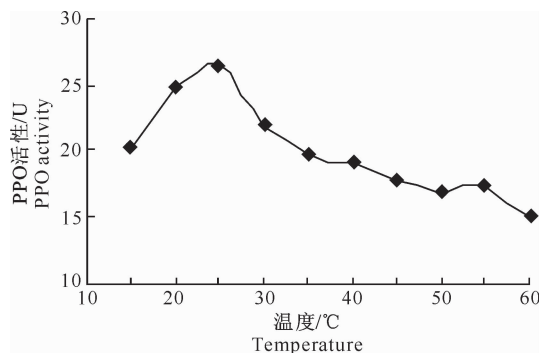


图 1 温度对牡丹 PPO 活性的影响

Fig. 1 Effect of temperature on PPO activity in peony

### 2.2 pH 值对牡丹 PPO 活性的影响

图 2 显示,磷酸盐缓冲液的 pH 值对牡丹 PPO 活性具有显著影响,pH 值过低或过高均会使 PPO 活性降低。当 pH 值为 4.0~6.0 时,PPO 活性随着 pH 值的增大而升高,并在 pH 值为 6.0 时达到最大;之后随 pH 值的升高,PPO 活性显著下降。因此,牡丹 PPO 酶促反应的最适 pH 为 6.0。

### 2.3 牡丹 PPO 提取液添加量对其活性的影响

由图 3 可知,在邻苯二酚用量为 1 mL 的情况下,PPO 提取液添加量为 1 mL 时其活性最大。当 PPO 提取液添加量为 0.1~1.0 mL 时,酶活性随着

提取液添加量的增加迅速增大,并在 1 mL 时达到最大值;之后继续增加提取液添加量,酶活性基本保持不变,这说明此时底物已经反应完毕。因此,底物用量为 1 mL 时,1 mL 为最适提取液添加量。

2.4 不同底物对牡丹 PPO 活性的影响

有研究表明,牡丹 PPO 是一种多底物酶,本研

究中所用的 6 种酚类物质均是牡丹 PPO 的作用底物。由图 4 可见,牡丹 PPO 对不同酚类底物的敏感性有明显差异,且常被用作 PPO 底物的邻苯二酚并不是牡丹 PPO 的最适底物,其最适底物应为咖啡酸,其次是没食子酸甲酯,其余 4 种依次为 4-羟基苯甲酸、邻苯二酚、莽草酸和没食子酸。

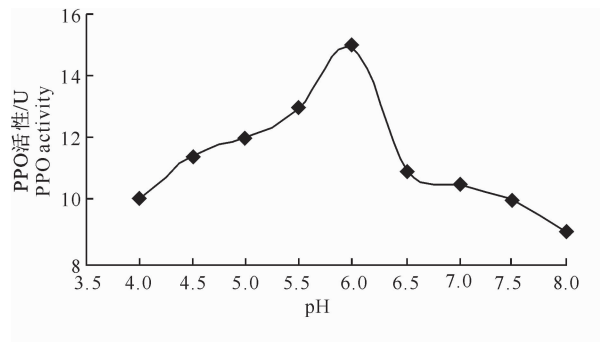


图 2 pH 值对牡丹 PPO 活性的影响

Fig.2 Effects of pH on PPO activity in peony

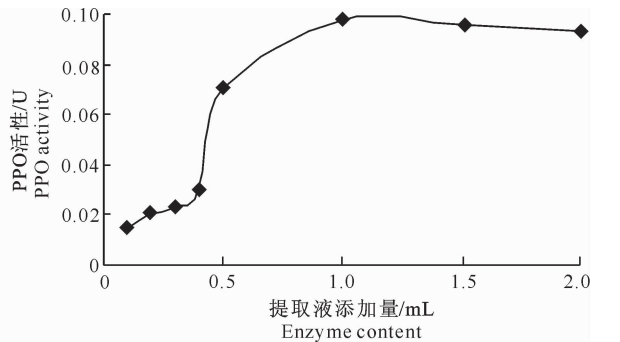


图 3 PPO 提取液添加量对牡丹 PPO 活性的影响

Fig.3 Effects of enzyme content on PPO activity in peony

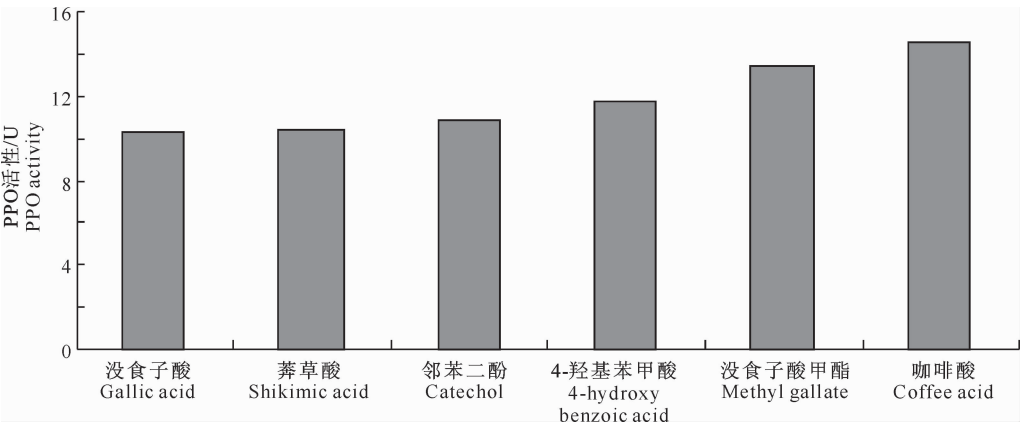


图 4 不同底物对牡丹 PPO 活性的影响

Fig.4 Effects of different substrates on PPO activity in peony

2.5 底物浓度对牡丹 PPO 活性的影响

以咖啡酸作为反应体系的底物时,牡丹 PPO 活性与底物浓度的关系见图 5。

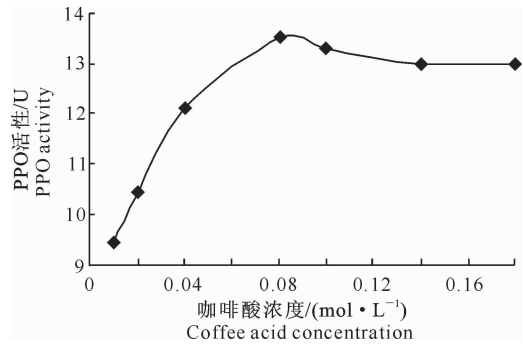


图 5 咖啡酸浓度对牡丹 PPO 活性的影响

Fig.5 Effect of coffee acid concentration on PPO activity

图 5 显示,当 PPO 提取液添加量为 1 mL 时,在

咖啡酸浓度增加的过程中,牡丹 PPO 活性呈现出先升后降的变化趋势,并在咖啡酸浓度达到 0.08 mol/L 时达到最大,说明此时酶已完全饱和,相对于 PPO 提取液而言,咖啡酸开始过量。

3 结论与讨论

有研究表明,不同植物 PPO 活性的最适反应温度不同,如蜜柚 PPO 的最适反应温度为 10 ℃<sup>[8]</sup>,枇杷的为 20 ℃<sup>[9]</sup>,而白玉菇<sup>[10]</sup>、刺苦草<sup>[11]</sup>的则分别为 35 和 50 ℃。本试验结果显示,牡丹 PPO 的最适反应温度为 25 ℃。不同植物 PPO 的最适反应温度不同可能与其生长环境及品种有关。此外,酶作为一种蛋白,温度对其活性具有较大的影响:一方面,提高温度可以加快酶促反应的速度;而另一方面,酶的本质是蛋白质,温度过高会引起酶蛋白的变性,使酶失活,所

以通过提高温度或者降低温度可以抑制酶的活力。

本研究中,牡丹 PPO 的最适 pH 为 6.0, pH 过低或过高均会显著影响 PPO 活性。这主要是由于 PPO 是一种含铜蛋白,  $\text{Cu}^{2+}$  又是酚类合成及氧化酶类的组成成分与辅助因子<sup>[12]</sup>。在强酸性环境下,酶中的铜会被解离出来,从而使 PPO 失去活性;而在强碱性环境中, PPO 蛋白质与铜解离成为不溶性氢氧化铜,也可使 PPO 变性失活<sup>[13]</sup>。

本研究结果显示,邻苯二酚底物用量为 1 mL 时,最适 PPO 提取液添加量为 1 mL;牡丹 PPO 的最适作用底物为咖啡酸,其次是没食子酸甲酯,而常被用作植物 PPO 酶反应底物的邻苯二酚并未显示出明显优势。朱永宝等<sup>[14]</sup>报道,梨品种“新梨 7 号”PPO 的最适作用底物为咖啡酸;高路<sup>[15]</sup>报道,紫甘薯 PPO 的最适作用底物为绿原酸。上述研究结果表明,不同植物 PPO 的最适反应底物不尽相同。在以咖啡酸为牡丹 PPO 的最适底物时,其最佳浓度为 0.08 mol/L,此后再增加咖啡酸浓度时, PPO 活性反而有下降趋势,其原因可能是由于反应产物浓度增大而产生了反馈抑制。

研究表明,褐变是由于酚类物质在 PPO 的催化作用下形成了醌类物质,并通过聚合作用而导致组织呈褐色<sup>[3]</sup>,因此 PPO 是引起植物褐变的基本条件之一。通过对 PPO 酶学特性的探讨,进一步探明植物褐变的生理机制,可为科学控制牡丹组织培养中的褐化发生提供理论基础。本试验初步探讨了温度、pH 值、PPO 提取液添加量及底物的类型和浓度对牡丹 PPO 活性的影响,结果提示,在牡丹的组织培养中,通过选择合适的 pH 值和培养温度等,同时结合化学抑制剂调控牡丹 PPO 活性,可以达到减少褐化现象发生、提高牡丹试管苗生根率的目的。而关于牡丹 PPO 的其他特性以及不同因素间的交互作用等,还有待于进一步研究。

## [参考文献]

- [1] 高志民,王 雁,王莲英.牡丹、芍药繁殖与育种研究的现状[J].北京林业大学学报,2001,23(4):75-79.  
Gao Z M, Wang Y, Wang L Y. The present situation of the research on breeding of *Paeonia suffruticosa* Andr. and *Paeonia lactiflora* [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2001, 23 (4): 75-79. (in Chinese)
- [2] 张俊琦,罗晓芳.牡丹组织培养中褐化的发生原因与防止方法的研究[J].沈阳农业大学学报,2006,37(5):720-724.  
Zhang J Q, Luo X F. Study of the cause and the prevent method of the browning in peony tissue culture [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2006, 37 (5): 720-724. (in Chi-

- nese)
- [3] 李 萍,成仿云,张颖星.防褐剂对牡丹组培褐化发生、组培苗生长和增殖的作用[J].北京林业大学学报,2008,30(2):71-76.  
Li P, Cheng F Y, Zhang Y X. The effect of brown agent on browning happen, tissue growth and proliferation of the peony seedling *in vitro* culture [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2008, 30(2): 71-76. (in Chinese)
- [4] Coseteng M Y, Lee C Y. Changes in apple polyphenol oxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning [J]. Journal of Food Science, 1987, 52(4): 985-989.
- [5] Shahriar S, Ezzatollah K, Jacqueline K. Polyphenol oxidase activity in dormant saffron (*Crocus sativus* L.) corm [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2007, 29(5): 463-471.
- [6] 高梦祥,杨雪莲.鸭梨多酚氧化酶的特性及抑制剂研究[J].食品研究与开发,2007,28(9):50-53.  
Gao M X, Yang X L. Research on characteristics of polyphenol oxidase and inhibitors of Ya pear [J]. Food Research and Development, 2007, 28(9): 50-53. (in Chinese)
- [7] 杨昌鹏,杨 静,藤田修二.番石榴多酚氧化酶的部分纯化及其特性研究[J].食品与发酵工业,2006,32(9):23-27.  
Yang C P, Yang J, Tengtian X E. Research on the part of purification and the characteristics of *Guava polyphenol oxidase* [J]. Food and Fermentation Industry, 2006, 32(9): 23-27. (in Chinese)
- [8] 纪淑娟,尹竞男,李家政.蜜柚多酚氧化酶的酶学特性与活性测定研究[J].北方园艺,2010(17):171-174.  
Ji S J, Yin J N, Li J Z. Research on characteristics and activity determination of Miyou polyphenol oxidase [J]. Northern Horticulture, 2010(17): 171-174. (in Chinese)
- [9] 史 辉,郑玉平,阮少江,等.枇杷多酚氧化酶酶学特性的研究[J].食品研究与开发,2010,31(7):9-13.  
Shi X, Zheng Y P, Ruan S J, et al. Research on characteristics of loquat polyphenol oxidase [J]. Food Research and Development, 2010, 31(7): 9-13. (in Chinese)
- [10] 周春梅,王 欣,王俊城,等.白玉菇多酚氧化酶的酶学特性[J].食品与发酵工业,2010,36(5):5-8.  
Zhou C M, Wang X, Wang J C, et al. Polyphenol oxidase characteristics in white jade mushroom [J]. Food and Fermentation Industry, 2010, 36(5): 5-8. (in Chinese)
- [11] 魏光锋,李梅青,于少梅,等.刺苦草根状茎多酚氧化酶的纯化及其特性的研究[J].食品与发酵工业,2009,35(12):47-51.  
Wei G F, Li M Q, Yu S M, et al. Research on polyphenol oxidase purification and its characteristics of Thorn bitter grass-roots shape stem [J]. Food and Fermentation Industry, 2009, 35(12): 47-51. (in Chinese)
- [12] 吴锦程,夏海玲,唐朝晖,等.白肉枇杷多酚氧化酶酶学特性研究[J].中国农学通报,2005,21(11):96-98.  
Wu J C, Xia H L, Tang C H, et al. Research on characteristics of white meat loquat polyphenol oxidase [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(11): 96-98. (in Chinese)