

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2020.10.010

# ‘忠薯 1’薯皮过氧化物酶分离纯化及其理化性质研究

李丰茂<sup>1</sup>, 李佳欣<sup>1</sup>, 郭小路<sup>2</sup>, 傅玉凡<sup>1</sup>, 唐云明<sup>1</sup>

1. 西南大学 生命科学学院/重庆市甘薯工程技术研究中心, 重庆 400715; 2. 丰都县生态环境监测站, 重庆 丰都 408299

**摘要:** 经表皮组织匀浆抽提, 无水乙醇分级沉淀, DEAE-Sepharose 离子交换层析, Superdex-200 凝胶过滤层析, 获得电泳纯度的过氧化物酶。该酶比活力、纯化倍数及回收率分别为 571 975.93 U/mg, 51.72, 33.80%。该酶总分子量约为 37.2 kDa, 且为单聚体。该酶最适温度, pH 值分别为 65 °C, 6.2, 具有耐酸耐热特性。‘忠薯 1’过氧化物酶  $K_m$  值为 52.833 mmol/L, 且属于乒乓反应。Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> 对该酶有较强激活作用; Pb<sup>2+</sup> 是甘薯过氧化物酶的有效抑制剂。

**关键词:** 甘薯; 过氧化物酶; 分离纯化; 性质

**中图分类号:** Q946.5

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2020)10-0079-09

过氧化物酶(EC 1.11.1.7)是一类以铁卟啉为辅基的氧化还原酶, 该酶参与了植物的光合作用、呼吸作用、乙烯和木质素生物合成<sup>[1]</sup>, 对细胞的生长发育、细胞膜完整性、自身损伤修复、疾病抵抗、逆境胁迫抵抗都起到了积极的作用, 同时能催化大量酚类化合物以解除细胞毒性<sup>[2]</sup>。目前, 该酶在环境治理、免疫学、医学、食品产业等领域得到广泛应用<sup>[3-5]</sup>。

‘忠薯 1’(*Ipomoea batatas* L. Lam)又名甘薯, 为 1 年生旋花科植物。甘薯富含多种营养物质, 如淀粉<sup>[6]</sup>、蛋白质、膳食纤维<sup>[7]</sup>、维生素<sup>[8]</sup>、酚类<sup>[9]</sup>、黄酮<sup>[10]</sup>、花青素<sup>[11]</sup>等。甘薯具有提高免疫力、抗氧化、抗动脉硬化和抗肿瘤等生理功能<sup>[12-14]</sup>。随着人们生活水平的提高以及消费者对新鲜食材营养价值的日趋重视, 近年来, 鲜切甘薯因其营养丰富、便捷以及高利用率等特点迅速获得了广大消费者的青睐<sup>[15]</sup>。但是鲜切甘薯在生产过程中容易受到机械力伤害, 在氧气作用下, 过氧化物酶与酚类化合物迅速接触生成醌类物质, 醌类物质通过脱水以及自身聚合反应生成棕色或黑色聚合物形成甘薯褐变。褐变不仅会影响甘薯的外观, 降低营养价值, 还能导致甘薯变质腐烂和浪费, 从而制约着甘薯产业的发展。因此, 本实验以西南大学重庆市甘薯工程技术研究中心培育品种‘忠薯 1’为实验材料, 通过色谱技术成功从甘薯薯皮中分离纯化得到‘忠薯 1’过氧化物酶, 并对相关酶学特性以及酶促动力学进行探讨, 为进一步揭示过氧化物酶促褐变分子机理、设计出有效控制鲜切甘薯褐变方法以及筛选出高效褐变抑制剂提供针对性的理论参考, 也为甘薯产业的长远发展提供新的方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

‘忠薯 1’由西南大学重庆市甘薯工程技术研究中心提供。DEAE-Sepharose, Superdex-200, 凝胶过滤层析标准品, 美国 GE Healthcare 公司; SDS-PAGE 预制胶, 上海 Beyotime 公司; 蛋白质 SDS-PAGE 标

收稿日期: 2019-07-30

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-10-C20); 农作物种质资源保护与利用专项(2018NWB036-09-01)。

作者简介: 李丰茂(1993—), 男, 硕士研究生, 主要从事蛋白质与酶工程的研究。

通信作者: 唐云明, 教授, 硕士研究生导师。

准品, 上海 Beyotime 公司; 其余试剂均为国产分析纯.

## 1.2 仪器与设备

蛋白质低压分离纯化系统, 美国 Bio-Rad 公司; UV-2550 型紫外分光光度计, 日本岛津公司; 垂直蛋白质电泳槽和电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; 高速冷冻离心机, 美国 Thermo Scientific 公司; GL-21M 冷冻干燥机, 德国 Uni Equip 公司.

## 1.3 方法

### 1.3.1 粗酶液提取

‘忠薯 1’采摘后, 用双蒸水清洗, 削取表皮, 按照 1:5 的比例与磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH 值为 7.2)混合匀浆, 4 °C 条件下静置抽提 2.5 h; 8 层纱布过滤, 弃去滤液, 滤渣用预冷双蒸水重悬, 每隔 1 h 更换双蒸水, 重复多次, 直至重悬液滤液中检测不到可溶性过氧化物酶活性. 收集重悬液滤渣, 按照 1:5 的比例与磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L, 2 mol/L NaCl, pH 值为 7.2)重悬, 超声破碎 45 min(100 W), 在磁力搅拌器上搅拌过夜, 过滤后弃去滤渣, 滤液在 4 °C 条件下 7 000 r/min 离心 35 min, 分别测定溶液中过氧化物酶总活性以及蛋白质质量.

### 1.3.2 无水乙醇分级沉淀

向过氧化物酶提取液中加入预冷无水乙醇至 40% 饱和度, 4 °C 静置 2h 后, 5 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液; 再加入无水乙醇至 70% 饱和度, 4 °C 静置 2 h, 5 000 r/min 离心 20 min, 用缓冲液溶解沉淀, 分别测定溶液中过氧化物酶活性以及蛋白质质量.

### 1.3.3 DEAE-Sepharose 离子交换层析

用磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH 值为 7.2)平衡层析柱 24 h, 10 mL 初酶液作为上样液, 用磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH 值为 7.2, 1 mol/L NaCl)进行线性梯度洗脱, 流速 0.7 mL/min; 分别测定各管过氧化物酶活性和蛋白质质量, 收集活性较高的酶液, 透析脱盐, 冷冻干燥后进行 Superdex-200 凝胶过滤层析.

### 1.3.4 Superdex-200 凝胶过滤层析

用磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH 值为 7.2)平衡层析柱 24 h, 用磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH 值为 7.2)溶解离子交换层析纯化后活性最高部分, 上样量为 5 mL, 流速设为 0.27 mL/min; 分别测定各管过氧化物酶活性和蛋白质质量, 收集活性最高的酶液透析除盐, 冷冻干燥.

### 1.3.5 过氧化物酶活力测定

过氧化物酶活性采用庞学群等方法进行测定<sup>[16]</sup>, 2.775 mL 磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH 值为 7.2), 100 μL 愈创木酚(4%)和 100 μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(1%)与 25 μL 过氧化物酶酶液混合, UV-2550 型分光光度计记录 120 s 内光密度 OD<sub>470</sub> 的变化. 酶活力单位(U)指在该反应条件下, 每分钟发生光密度 OD<sub>470</sub> 改变 0.01 所需的酶量为 1 个酶活力单位.

### 1.3.6 蛋白质质量测定

采用 Bradford 法测定蛋白质质量. 使用牛血清蛋白(Sigma Chemical, St. Louis, USA)作为蛋白质标准品, 测定过氧化物酶提取物中蛋白质质量<sup>[17]</sup>.

### 1.3.7 SDS-PAGE 和总分子量测定

利用 12% 分离胶, 5% 浓缩胶, 10 μL 样品在 80 V 电压下电泳 30 min, 120 V 电压下电泳 60 min, 电泳结束后, 用考马斯亮蓝超快染液染色 15 min, 用去离子水脱色 1 h, 直至条带清晰. 利用凝胶过滤试剂盒测定过氧化物酶总分子量, 其计算公式为

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

式中  $K_{av}$  为分配系数,  $V_e$  为洗脱体积,  $V_o$  为外水体积,  $V_t$  为柱床总体积.

### 1.3.8 酶学性质测定

#### 1.3.8.1 最适 pH 值和 pH 稳定性

将纯化后并经过稀释的过氧化物酶酶液与最适温度不同 pH 值(2~6, 梯度为 1; 6~7, 梯度为 0.2; 7~10, 梯度为 1)缓冲液, 100 μL 愈创木酚(4%)和 100 μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(1%)混合测定酶活力, 最高酶活力设定为 100%, 从而确定反应最适 pH 值. 将 Superdex-200 凝胶过滤后稀释的酶液与不同 pH 值(3.0~8.0)的

缓冲溶液等体积混合, 室温放置 6 h 后, 每 1 h 测定 1 次相对酶活力, 通过该酶在不同 pH 值、不同时间条件下的相对酶活力变化情况, 确定该酶的 pH 稳定性。

### 1.3.8.2 最适温度和温度稳定性

将纯化后并经稀释的过氧化物酶酶液与最适 pH 不同温度(20~30 °C, 梯度为 10 °C; 30~70 °C, 梯度为 5 °C; 70~90 °C, 梯度为 10 °C)缓冲液, 100 μL 愈创木酚(4%)和 100 μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(1%)混合, 测定各温度下过氧化物酶相对酶活力, 确定最佳反应温度. 将 Superdex-200 凝胶过滤后并经过稀释的过氧化物酶酶液置于(25~75 °C)下孵育 0~6 h, 每间隔 1 h 测定 1 次过氧化物酶相对酶活力, 通过该酶在不同温度、不同时间条件下的相对酶活力变化情况, 确定该酶的温度稳定性。

### 1.3.8.3 金属离子对过氧化物酶影响

分别将 100 mmol/L 不同金属离子(Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>)按一定比例与反应液混合, 使得各金属离子在反应体系中最终浓度为 10, 20, 30, 40, 50 mmol/L, 在最适条件下测定酶活力, 以不含金属离子时的反应液酶活力为 100%, 计算在不同浓度金属离子条件下过氧化物酶的相对酶活力。

### 1.3.8.4 过氧化物酶米氏常数( $K_m$ )和最适底物测定

在最适温度和最适 pH 值条件下, 以不同浓度的愈创木酚(5, 10, 20, 30, 40, 50 mmol/L)为底物, 利用 UV-2550 型紫外分光光度计测定过氧化物酶的速率, 采用 Lineweaver-Burk 方程求出该反应速率常数  $K_m$ 。

### 1.3.8.5 过氧化物酶双底物反应类型鉴定

分别固定愈创木酚浓度为 1, 2, 4 mmol/L, 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 0.1, 0.2, 0.4, 0.5 mmol/L 条件下测得酶促反应速率; 分别固定 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 0.2, 0.3, 0.4 mmol/L, 愈创木酚浓度为 1, 2, 3, 4, 5 mmol/L 条件下测得酶促反应速率. 通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 根据酶动力学确定过氧化物酶双底物反应类型<sup>[18]</sup>。

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$$

式中  $V$  为反应速率,  $K_m$  为米氏常数,  $V_{\max}$  为最大反应速率,  $S$  为底物浓度。

## 2 结果分析

### 2.1 过氧化物酶分离纯化

‘忠薯 1’过氧化物酶初酶液经 DEAE-Sepharose 层析后, 过氧化物酶酶活力集中在第 10~20 管, 蛋白质集中在第 10~30 管, 图 1 显示了 1 个酶活力峰和 2 个蛋白质质量峰, 可知粗酶液中不存在过氧化物酶同工酶. 在 10~20 管范围内, 蛋白质质量曲线与酶活力曲线趋势范围相似, 表示在此范围内酶活力和蛋白质质量均较高, 且存在非目标蛋白质, 非目标蛋白质会影响后续过氧化物酶纯化以及过氧化物酶纯度, 而在 20~30 管范围内过氧化物酶酶活力较低, 蛋白质质量较高, 说明 20~30 管大部分均为非目标蛋白质. 因此, 还需进一步通过 Superdex-200 凝胶过滤层析分离纯化除去非目标蛋白质。

图 2 显示, 过氧化物酶酶活力集中在第 25~40 管, 蛋白质集中在 25~45 管, 其中酶活力最高峰位于第 35 管, 此时蛋白质质量最低, 表明过氧化物酶纯度较高, 纯化效果较好。

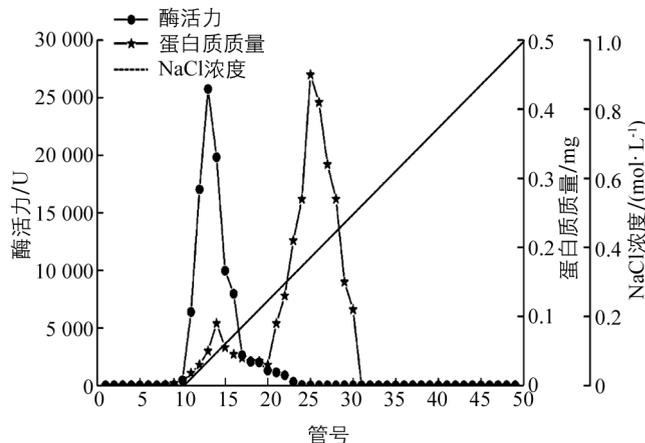


图 1 ‘忠薯 1’过氧化物酶 DEAE-Sepharose 离子交换层析

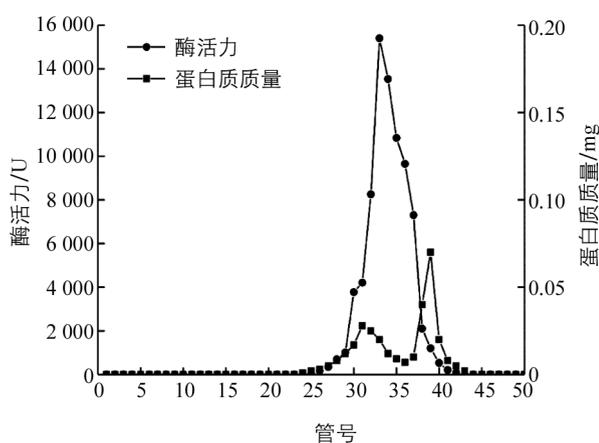


图 2 ‘忠薯 1’过氧化物酶 Superdex-200 凝胶过滤层析

甘薯过氧化物酶的分离纯化结果见表 1, 该酶的粗酶液经过分离纯化后, 比活力为 571 975.93 U/mg, 纯化倍数为 51.72, 活性回收率为 33.80%, 表明该酶具有较高纯度和酶活性, 可以继续利用该酶深入探究相关酶学性质和酶促动力学。

表 1 ‘忠薯 1’分离纯化结果

纯化步骤	总蛋白/ mg	总酶活/ U	比活力/ (U · mg <sup>-1</sup> )	回收率/ %	纯化倍数
粗酶液	20.35	225 020.0	11 057.49	100.00	1.00
乙醇沉淀	3.50	205 500.0	58 714.28	91.32	5.82
DEAE-Sepharose 层析	0.36	95 060.0	259 726.77	42.24	23.48
Superdex-200 层析	0.13	76 072.8	571 975.93	33.80	51.72

## 2.2 过氧化物酶分子质量测定

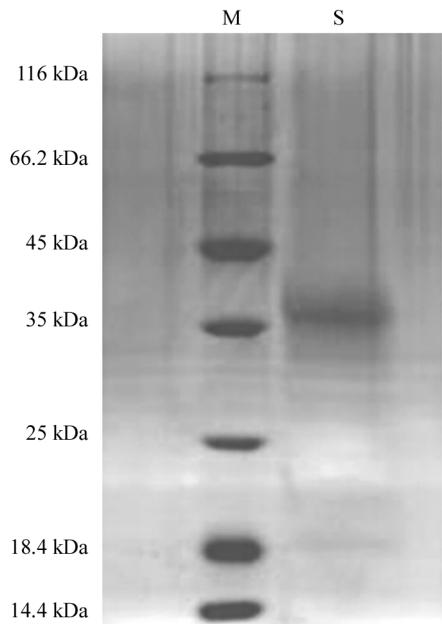
收集经 Superdex-200 纯化后活性最高的过氧化物酶酶液, 利用透析袋透析 24 h, 冷冻干燥后样品经 SDS-PAGE 电泳分析(图 3)。聚丙烯酰胺凝胶上标准蛋白质和样品均显示为单一的条带, 说明该过氧化物酶纯度超过 95%, 凝胶成像系统根据与标准蛋白质迁移率计算得到过氧化物酶亚基分子质量为 37.0 kDa。

Superdex-200 凝胶过滤层析根据蛋白质分子质量与洗脱顺序成正比的原理, 将过氧化物洗脱体积与试剂盒中标准蛋白洗脱体积比较, 计算得到过氧化物酶总分子量为 37.2 kDa, 表明‘忠薯 1’过氧化物酶是由单一亚基组成的蛋白质(图 4)。

## 2.3 最适 pH 和 pH 稳定性

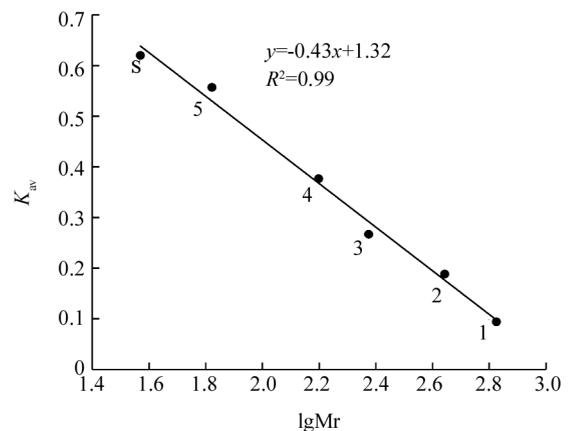
在不同 pH 条件下测得甘薯过氧化物酶的相对酶活力(图 5)。“忠薯 1”过氧化物酶相对酶活力随 pH 增加先上升后下降。过氧化物酶在 pH 值为 2.0~3.0 范围内相对酶活力低于 5%, pH 值为 8.0~10.0 范围内相对酶活力低于 50%, 表明强酸强碱环境都可以使酶的空间结构破坏, 引起酶的构象改变, 酶活性降低。而在 pH 值为 4.0~7.0 范围内活性较高, 其最适 pH 值为 6.2, 表明‘忠薯 1’过氧化物酶在弱酸性环境中较稳定。

将酶与不同 pH 值缓冲液混合(图 6), 在 pH 值为 3.0, 7.0, 8.0 时相对酶活力随着时间逐渐降低; 5 h 时其相对酶活力不及 20%, 而在 pH 值为 4.0~6.0 范围内相对酶活力均保持在 100% 水平, 表明‘忠薯 1’过氧化物酶在弱酸性环境中具有良好的稳定性。



M 为 SDS-PAGE 蛋白质标准品; S 为‘忠薯 1’过氧化物酶。

图 3 ‘忠薯 1’过氧化物酶 SDS-PAGE 图谱



标准蛋白质分子质量: 1 为甲状腺球蛋白 669 kDa; 2 为铁蛋白 440 kDa; 3 为过氧化氢酶 237 kDa; 4 为醛缩酶 158 kDa; 5 为牛血清蛋白 66.4 kDa; S 为‘忠薯 1’过氧化物酶 37.2 kDa。

图 4 ‘忠薯 1’过氧化物酶 Superdex-200 凝胶过滤标准曲线

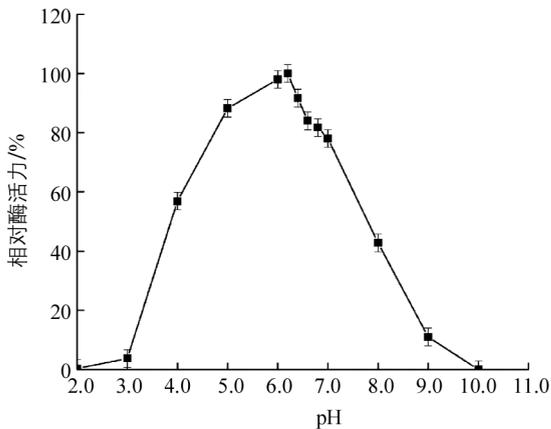


图 5 pH 对‘忠薯 1’过氧化物酶活性影响

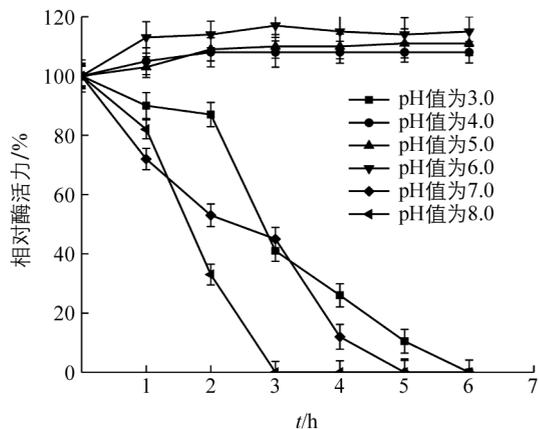


图 6 忠薯 1’过氧化物酶 pH 稳定性

2.4 最适温度和温度稳定性

在不同温度条件下测得‘忠薯 1’过氧化物酶的相对酶活力(图 7), 显示其相对酶活力随温度增加先上升后下降. 在 20 °C 和 80 °C 时, 相对酶活力分别为 39.7%, 17.3%. 而在 30~70 °C 相对酶活力均高于 50%, 温度升高能提高分子运动速率以及分子间的碰撞, 提高了反应速率. 其最适反应温度为 65 °C, 表明‘忠薯 1’过氧化物酶在 30~70 °C 范围内较为稳定.

将酶液在不同温度下孵育(图 8), 在 25~65 °C 范围内相对酶活力均未受影响, 表明过氧化物酶有良好的热稳定性; 75 °C 时酶活力迅速下降, 2 h 时酶活性仅有 50%, 5 h 后活性丧失, 表明酶已经完全变性失活.

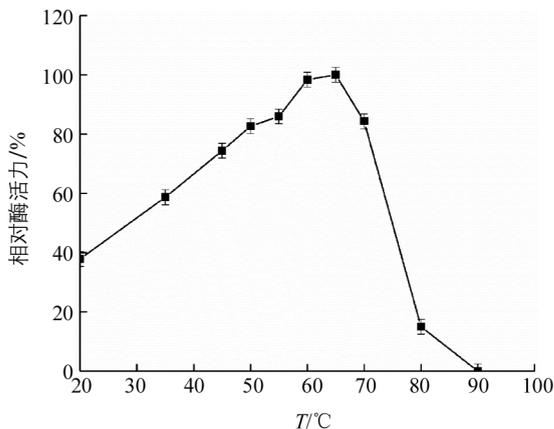


图 7 温度对‘忠薯 1’过氧化物酶活性影响

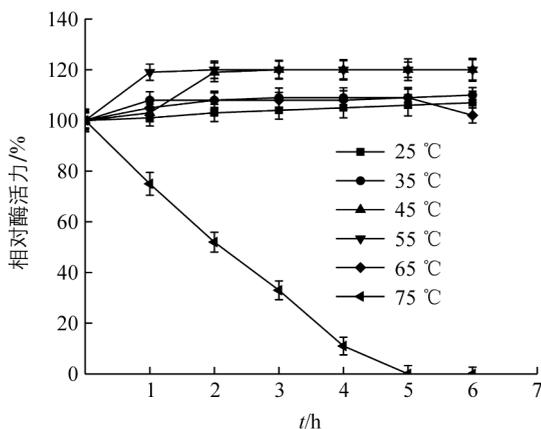


图 8 ‘忠薯 1’过氧化物酶热稳定性

2.5 金属离子对过氧化物酶影响

当  $Co^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Ca^{2+}$  逐渐增加时, 该酶相对酶活力均大于 100% (图 9), 最高分别能达到 230.76%, 169.23%, 298.07%, 156%, 138.46%, 显示  $Co^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  对该酶有很强的激活作用. 当  $Ca^{2+}$  为 60 mmol/L 时, 相对酶活力为 103%, 表明  $Ca^{2+}$  对该酶激活作用较弱.  $Pb^{2+}$  作为重金属对植物过氧化物酶具有很强抑制作用, 当浓度为 10 mmol/L 时相对酶活力低于 10%, 说明  $Pb^{2+}$  是酶促褐变反应的有效抑制剂.

2.6  $K_m$  和反应速率测定

在最适条件下, 以 (10~50 mmol/L) 愈创木酚 S 作为底物, 通过 UV-2550 型紫外分光光度计得

到相应的反应速率  $V$ , 将米氏方程两侧取双倒数, 以  $1/V \sim 1/S$  线性拟合分析, 得到‘忠薯 1’过氧化物酶 Lineweaver-Burk 双倒数图(图 10), 当  $1/V=0$  时, 横坐标截距为  $-1/K_m$ , 求得该酶的  $K_m$  值为  $52.833 \text{ mmol/L}$ .

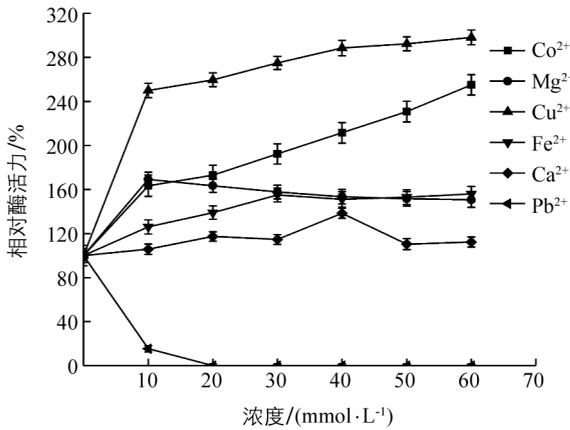


图 9 金属离子对‘忠薯 1’过氧化物酶影响

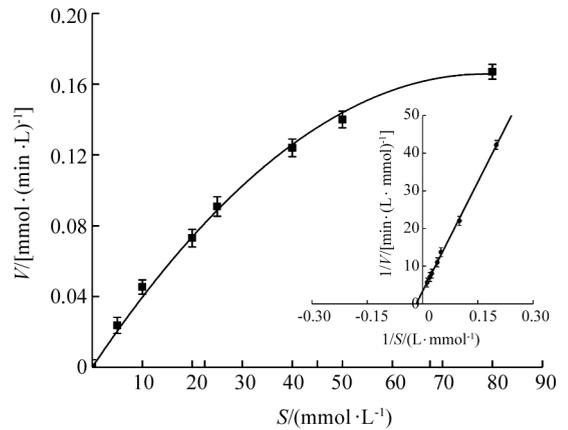


图 10 ‘忠薯 1’过氧化物酶反应速率和双倒数方程

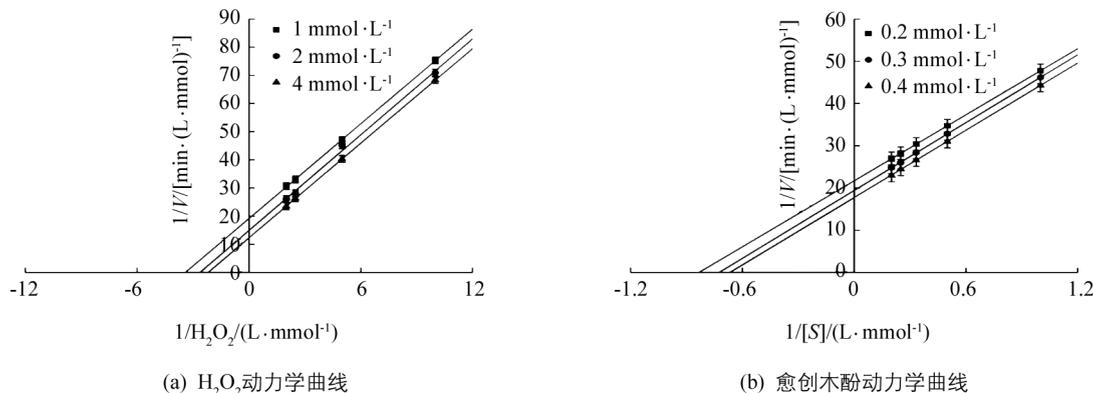
## 2.7 过氧化物反应类型鉴定

酶促双底物反应按照动力学机制分为序列反应和乒乓反应. 乒乓反应类型特征是将其中一个底物固定在几个不同浓度范围内, 用另一个底物浓度与反应速率作图, 可以获得几组相互平行的直线, 而在序列反应中, 得到的却是相交的直线. 通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图可知, 当固定不同浓度愈创木酚, 过氧化氢浓度与反应速率的双倒数曲线相互平行; 当固定不同浓度过氧化氢, 愈创木酚浓度与反应速率的双倒数曲线相互平行(图 11a, b), 表明在酶促动力学方面‘忠薯 1’过氧化物酶的双底物酶促反应类型为乒乓反应且与底物反应存在先后顺序(图 11c).

## 3 讨论与结论

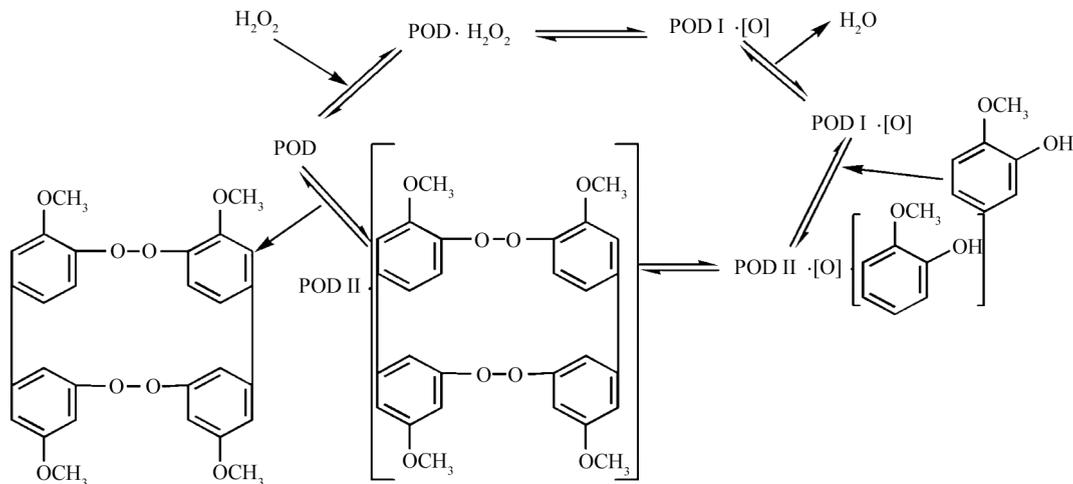
本实验以‘忠薯 1’为实验材料, 通过一系列分离纯化技术后得到高纯度的过氧化物酶, 与其他研究报道的过氧化物酶相比具有以下特点: 取材便捷, 原材料品质较高; 成本低廉, 纯化操作快速简便. 由于纯化过程中, 乙醇分级沉淀以及色谱层析柱纯化会除去一部分过氧化物酶, 酶活力会有所下降. 透析袋透析以及冷冻干燥会使酶暴露在外界环境中, 会影响酶活性. 纯化后该酶比活力为  $571\,975.93 \text{ U/mg}$ , 高于藕带过氧化物酶比活力( $1\,272.74 \text{ U/mg}$ )<sup>[19]</sup>, 高于大豆过氧化物酶比活力( $4\,432.52 \text{ U/mg}$ )<sup>[20]</sup>. 纯化倍数为 51.72, 高于羊蹄叶(4.8)<sup>[21]</sup>, 沙田柚(26.22)<sup>[22]</sup>. 回收率为 33.80%, 高于韭菜(10.85%)<sup>[23]</sup>, 甘薯叶<sup>[24]</sup>(1.59%). 鉴于纯化后‘忠薯 1’薯皮过氧化物酶比活力较高, 无其他同工酶且纯化易操作等优点, 可考虑充分利用废弃资源薯皮制备成商品化过氧化物酶出售, 也为后续深入研究甘薯酶促褐变打下基础.

本实验提取的‘忠薯 1’过氧化物酶在 pH 值为 4.0~7.0 以及温度在 30~70 °C 时都表现出较好的酶活性, pH 值为 4.0~6.0 和温度在 25~65 °C 范围孵育 6 h, 酶活性均高出 100%, 表现出良好的稳定性, 表明该酶能够耐受一定的酸性和高温环境. 最适 pH 和温度分别为 6.2, 65 °C, 其最适 pH 高于香草豆荚(3.8)<sup>[25]</sup>, 茶叶(4.5)<sup>[26]</sup>, 油棕叶(5.0)<sup>[27]</sup>, 与龙须菜(6.0)<sup>[28]</sup> 较为接近. 最适温度高于藜麦麸(60 °C)<sup>[29]</sup>, 枇杷果肉(35 °C)<sup>[30]</sup>. 该结果表明不同实验材料中过氧化物酶的酶学性质稍有差异, 可以采用高温或热处理方式来控制甘薯褐变. 亚基分子量为 37.0 kDa, 总分子量为 37.2 kDa, 与黄瓜(40.21 kDa)<sup>[31]</sup>, 莲藕(41.0 kDa)<sup>[32]</sup> 接近.



(a) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>动力学曲线

(b) 愈创木酚动力学曲线



(c) 乒乓反应过程

图 11 ‘忠薯 1’ 过氧化物酶乒乓反应过程

Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> 对该酶有很强的激活作用, 原因可能是金属通过促进底物与酶结合位点结合激活该酶. Fe<sup>3+</sup> 是大多数植物过氧化物酶辅基卟啉环中心必不可少的部分, Fe<sup>3+</sup> 参与了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的结合和化合物 I 的形成<sup>[2]</sup>; Ca<sup>2+</sup> 作为一种辅助因子能维持酶活性位点的构象完整性, 对酶活性有激活作用; Pb<sup>2+</sup> 作为重金属离子对该酶活性影响最大, 原因是 Pb<sup>2+</sup> 容易破坏蛋白质的二硫键, 影响了酶的结构稳定性, 使得活性降低, 表明 Pb<sup>2+</sup> 是酶促褐变反应的有效抑制剂<sup>[33]</sup>. 该研究结果表明金属离子也能有效控制甘薯褐变.

通过动力学方法测得‘忠薯 1’过氧化物酶 K<sub>m</sub> 为 52.833 mmol/L, 通过分别固定双底物 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、愈创木酚浓度得到‘忠薯 1’过氧化物酶反应类型为乒乓机制. 此结论与棕树、大豆、鹰爪豆过氧化物酶反应类型一致<sup>[34-36]</sup>. 并对当前‘忠薯 1’过氧化物酶的研究起到了补充作用, 为控制甘薯酶促褐变提供了方向.

综上所述, 本实验通过生物化学手段从甘薯中成功分离出高活性、耐酸耐热的‘忠薯 1’过氧化物酶, 并对相关的酶学性质进行了研究, 掌握了‘忠薯 1’过氧化物酶的酶学特性. 研究结果将有助于开发出控制鲜切甘薯褐变的新工艺和方法, 为进一步揭示甘薯褐变分子机制和筛选出高效无毒害抑制剂提供了理论基础. 同时可以进一步充分利用废弃资源薯皮制备成商品化的过氧化物酶出售, 充分挖掘甘薯的潜在价值, 拓展了甘薯的应用范围.

## 参考文献:

- [1] SILVA E D A, LOURENCO E J, NEVES V A. Soluble and Bound Peroxidases from Papaya Fruit [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(4): 1051-1056.
- [2] ONSA G H, BIN SAARI N, SELAMAT J, et al. Purification and Characterization of Membrane-bound Peroxidases from *Metroxylon Sagu* [J]. *Food Chemistry*, 2004, 85(3): 365-376.
- [3] RUZGAS T, EMNÉUS J, GORTON L, et al. The Development of a Peroxidase Biosensor for Monitoring Phenol and Related Aromatic Compounds [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1995, 311(3): 245-253.
- [4] 陈 笛, 王存芳. 乳过氧化物酶的特性及其在羊乳产业中的应用 [J]. *乳业科学与技术*, 2018, 41(2): 42-46.
- [5] 张丽华. 辣根过氧化物酶在酚类废水中的应用 [J]. *山西大同大学学报(自然科学版)*, 2012, 28(3): 35-39.
- [6] 王佳佳, 杨春贤, 曾令江, 等. 高淀粉甘薯新品种“渝薯 1 号”的选育研究 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2019, 41(7): 30-35.
- [7] YOSHIMOTO M, YAMAKAWA O, TANOUE H. Potential Chemopreventive Properties and Varietal Difference of Dietary Fiber from Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) Root [J]. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 2005, 39(1): 37-43.
- [8] LOW J, JAARSVELD P V. The Potential Contribution of Bread Buns Fortified with  $\beta$ -Carotene-Rich Sweet Potato in Central Mozambique [J]. *Food and Nutrition Bulletin*, 2008, 29(2): 98-107.
- [9] TEOW C C, TRUONG V D, MCFEETERS R F, et al. Antioxidant Activities, Phenolic and  $\beta$ -Carotene Contents of Sweet Potato Genotypes with Varying Flesh Colours [J]. *Food Chemistry*, 2007, 103(3): 829-838.
- [10] LALUSIN A G, OHTA M, FUJIMURA T. Temporal and Spatial Expression of Genes Involved in Anthocyanin Biosynthesis During Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) Root Development [J]. *International Journal of Plant Sciences*, 2006, 167(2): 249-256.
- [11] CASALS B V A, ZEVALLOS L C. Stability of AnthocyaninBased Aqueous Extracts of Andean Purple corn and Red-Fleshed Sweet Potato Compared to Synthetic and Natural Colorants [J]. *Food Chemistry*, 2004, 86(1): 69-77.
- [12] KUMAR S, MOLINA-CRUZ A, GUPTA L, et al. A Peroxidase/Dual Oxidase System Modulates Midgut Epithelial Immunity in *Anopheles Gambiae* [J]. *Science*, 2010, 327(5973): 1644-1648.
- [13] PARK K H, KIM J R, LEE J S, et al. Ethanol and Water Extract of Purple Sweet Potato Exhibits Anti-Atherosclerotic Activity and Inhibits Protein Glycation [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2010, 13(1): 91-98.
- [14] SUGATA M, LIN C Y, SHIH Y C. Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of Taiwanese Purple-Fleshed Sweet Potatoes (*Ipomoea batatas* L. Lam) Extracts [J]. *Biomed Research International*, 2015(7): 1-10.
- [15] 王礼群, 刘 硕, 杨春贤, 等. 鲜切甘薯不同部位褐变机理差异 [J]. *食品科学*, 2018, 39(1): 285-290.
- [16] 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研究 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2004, 12(5): 449-454.
- [17] 陶 敏, 杨 浩, 白亚娟, 等.  $\beta$ -淀粉酶的分离纯化及酶学性质研究 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2018, 40(6): 1-8.
- [18] 罗 磊, 董金龙, 朱文学, 等. 金银花过氧化物酶的三相分离纯化及酶学性质 [J]. *食品科学*, 2017, 38(24): 20-27.
- [19] 邓 波, 邓放明. 藕带过氧化物酶的分离纯化及酶学性质 [J]. *食品与机械*, 2016, 32(2): 20-23.
- [20] 刘 力. 大豆过氧化物酶的提取与分离纯化研究 [J]. *绿色科技*, 2018(16): 256-258, 262.
- [21] 黄国文. 羊蹄叶过氧化物酶的纯化和酶学性质研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2015, 27(10): 1777-1782.
- [22] 张 朝, 李永生, 高秀峰. 沙田柚皮过氧化物酶的纯化及酶学性质的研究 [J]. *食品工业科技*, 2013, 34(12): 187-191.
- [23] 敬海明, 邓 玉, 成丽丽, 等. 韭菜过氧化物酶的分离纯化及性质 [J]. *食品科学*, 2012, 33(15): 226-230.
- [24] 付伟丽, 唐靓婷, 王 松, 等. 甘薯叶过氧化物酶的分离纯化及其部分性质研究 [J]. *食品科学*, 2010, 31(7): 223-227.
- [25] MÁRQUEZ O, WALISZEWSKI K N, OLIART R M, et al. Purification and Characterization of Cell Wall-bound Peroxidase from Vanilla Bean [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2008, 41(8): 1372-1379.
- [26] KVARATSKHELIA M, WINKEL C, THORNELEY R. Purification and Characterization of a Novel Class III Peroxidase Isoenzyme from Tea Leaves [J]. *Plant Physiology*, 1997, 114(4): 1237-1245.

- [27] DEEPA S S, ARUMUGHAN C. Purification and Characterization of Soluble Peroxidase from Oil Palm (*Elaeis Guineensis* Jacq.) Leaf [J]. *Phytochemistry*, 2002, 61(5): 503-511.
- [28] 李海燕, 靳艳, 张卫, 等. 龙须菜中溴过氧化物酶的分离纯化及酶学性质分析 [J]. *生物工程学报*, 2008, 24(4): 622-626.
- [29] 杨晓月, 李小平, 李晨. 藜麦麸过氧化物酶分离纯化及酶学特性研究 [J]. *山西农业科学*, 2019, 47(6): 977-981, 997.
- [30] 林建城, 吴智雄, 彭在勤. 枇杷果肉过氧化物酶的分离纯化及其性质研究 [J]. *四川农业大学学报*, 2007, 25(4): 419-424.
- [31] 胡瑞斌, 李星, 王红杨, 等. 黄瓜过氧化物酶的分离纯化及酶学性质 [J]. *食品科学*, 2014, 35(11): 168-173.
- [32] 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.
- [33] 王霞, 吴霞, 马亮, 等. 棉花幼苗受铅、镉胁迫的抗氧化酶反应 [J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(12): 105-107.
- [34] CUADRADO N H, ARELLANO J B, CALVETE J J, et al. Substrate Specificity of the *Chamaerops Excelsa* Palm Tree Peroxidase. a Steady-state Kinetic Study [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012, 74(1-2): 103-108.
- [35] HOLLENBERG P F. Mechanisms of Cytochrome P450 and Peroxidase-Catalyzed Xenobiotic Metabolism [J]. *The FASEB Journal*, 1992, 6(2): 686-694.
- [36] GALENDE P P, CUADRADO N H, KOSTETSKY E, et al. Kinetics of Spanish Broom Peroxidase Obeys a Ping-Pong Bi-Bi Mechanism with Competitive Inhibition by Substrates [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 81: 1005-1011.

## Separation and Purification of Peroxidase (POD) from the Skin of Sweet Potato cv. ‘Zhongshu 1’ and Study of Its Properties

LI Feng-mao<sup>1</sup>, LI Jia-xin<sup>1</sup>, GUO Xiao-lu<sup>2</sup>,  
FU Yu-fan<sup>1</sup>, TANG Yun-ming<sup>1</sup>

1. School of Life Science, Southwest University/Engineering & Technology Research Center for Sweet Potato of Chongqing, Chongqing 400715, China;

2. Fengdu Ecological Environmental Monitoring Station, Fengdu Chongqing 408299, China

**Abstract:** Peroxidase (POD) with electrophoretic purity from sweet potato cv. ‘Zhongshu1’ was obtained by homogenization, ethanol precipitation, DEAE-Sephrose ion exchange chromatography and Superdex-200 gel filtration chromatography. Its specific activity, purification fold and activity recovery were 571 975.93 U/mg, 51.72 and 33.80%, respectively. It had a molecular mass of 37.2 kDa and was a monomer by electrophoresis. Its optimum temperature and pH were 65 °C and 6.2, respectively, indicating its good tolerance to acidic and high temperature environments. The  $K_m$  value of the peroxidase was 52.833 mmol/L, which belonged to ping pong reaction.  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  and  $Fe^{3+}$  exerted strong positive effects to the enzyme, but  $Pb^{2+}$  could effectively inhibit its activity.

**Key words:** sweet potato; peroxidase; purification and isolation; property